

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Influência do ultrassom de baixa frequência na penetração cutânea de formulações de zinco ftalocianina e seu potencial para a terapia sonodinâmica de tumores cutâneos

Yugo Araújo Martins

Ribeirão Preto 2019

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

YUGO ARAÚJO MARTINS

Influência do ultrassom de baixa frequência na penetração cutânea de formulações de zinco ftalocianina e seu potencial para a terapia sonodinâmica de tumores cutâneos

> Ribeirão Preto 2019

YUGO ARAÚJO MARTINS

Influência do ultrassom de baixa frequência na penetração cutânea de formulações de zinco ftalocianina e seu potencial para a terapia sonodinâmica de tumores cutâneos

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos

Orientador:

Prof. Dra. Renata Fonseca Vianna Lopez

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas em 10/09/2019. A versão original encontrase disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

> Ribeirão Preto 2019

Martins, Yugo Araújo

Influência do ultrassom de baixa frequência na penetração cutânea de formulações de zinco ftalocianina e seu potencial para a terapia sonodinâmica de tumores cutâneos. Ribeirão Preto, 2019.

168 p. : il. ; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas

de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Medicamentos e Cosméticos

Orientador: Profa Dra. Renata Fonseca Vianna Lopez

1. Sonoforese de baixa frequência 2. Terapia sonodinâmica. 3. Micela polimérica

FOLHA DE APROVAÇÃO

Yugo Araújo Martins

Influência do ultrassom de baixa frequência na penetração cutânea de formulações de zinco ftalocianina e seu potencial para a terapia sonodinâmica de tumores cutâneos

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr		
Instituição:	Assinatura:	
Prof. Dr		
Instituição:	Assinatura:	
Prof. Dr		
Instituição:	Assinatura:	

Dedicatória

À lei fundamental do universo que também é a essência de nossa própria vida.

Aos meus pais Carlos e Sara e meu irmão Yuri pelo incentivo e força durante essa caminhada.

À minha orientadora, Profa. Dra. Renata Fonseca Vianna Lopez pela orientação.

Agradecimento

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo pelo apoio e suporte durante a etapa do mestrado.

À minha orientadora, professora Dra. Renata Fonseca Vianna Lopez, por sua dedicação, compromisso e amor pela sua profissão. Obrigado pelo incentivo e confiança, por ter contribuído imensuravelmente com a minha formação acadêmica, por ser uma orientadora presente e por ter me ensinado a pensar criticamente e a fazer pesquisa científica de forma conscienciosa e autêntica.

À Patrícia Simão, técnica do laboratório de Tecnologia Farmacêutica, pela amizade, pelos ensinamentos compartilhados e apoio nos experimentos.

Aos colegas do laboratório NanoTop Danielle Nishida, Camila Cubayachi, Camila Lemos, Raquel Eloy, Abayomi Ogunjimi, Talita Mota, Cynthia Oliveira, Gabriela Fávero, Paula Bredarioli, Íris Camilo, Bianca Martins, Isabela Carvalho, Júlia Darini. Em especial, a Luciana Dalmolin, pelas discussões científicas e trocas de experiências no laboratório, pela solicitude e disponibilidade.

Aos meus pais Carlos e Sara e meu irmão Yuri pelo amor, apoio e incentivo incondicionais em todas as minhas empreitadas. Obrigado por sempre acreditarem em meu potencial e constituírem meu alicerce e serem meu exemplo de força, perseverança e altruísmo.

Ao Murilo e a Shaiani pela presença diária e pelo afago que tornaram esta caminhada mais aprazível.

Aos companheiros da BSGI de Ribeirão Preto e de Fortaleza pelos incentivos mútuos e pela contínua luta em prol da própria revolução humana e de uma sociedade melhor.

Ao professor Dr. Theo Zeferino Pavan pelas discussões científicas e contribuições com relação ao ultrassom.

À professora Dra. Maria José Vieira Fonseca e ao técnico José Roberto Jabor, do laboratório de Controle de Qualidade, pelas contribuições com os experimentos de peroxidação lipídica.

Ao professor Dr. Roberto Santana da Silva e à técnica Juliana Cristina Biazotto Morais, do laboratório de Química Inorgânica, pelas contribuições com os experimentos de detecção de ROS.

Ao professor Dr. Luís Alexandre Pedro de Freitas pelas discussões científicas sobre *design* de experimentos.

Ao técnico Eduardo Tozatto do laboratório de Imagens de Alta Resolução e Estudos Celulares pelas análises de microscopia confocal.

Ao professor Dr. Flávio da Silva Emery, coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP e aos demais funcionários do serviço de pós-graduação Eleni, Henrique e Rosana pelo suporte oferecido e compromisso profissional.

Ao Programa de Aperfeiçoamento de Ensino, à professora. Márcia Mendes Ruiz Cantano, à professora Dra. Renata Fonseca Vianna Lopez e aos outros professores da disciplina de Farmacotécnica III pela preparação pedagógica e aprendizado extraído durante o estágio supervisionado em docência.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de mestrado (Processo 2017/17442-7) e pelo auxílio financeiro por meio de projetos regulares de auxílio à pesquisa (Processo 2014/22451-7).

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio técnico e financeiro à pesquisa brasileira.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

"A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém nunca pensou sobre aquilo que todo mundo vê"

Arthur Schopenhauer

RESUMO

MARTINS, Y.A. Influência do ultrassom de baixa frequência na penetração cutânea de formulações de zinco ftalocianina e seu potencial para a terapia sonodinâmica de tumores cutâneos. 2019. 168 F. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

Introdução: A terapia sonodinâmica (TSD) é uma nova modalidade terapêutica que envolve o ultrassom e um agente sonossensibilizante para o tratamento não invasivo do câncer de pele. Através de mecanismos dependentes da cavitação acústica, ainda não totalmente esclarecidos, a TSD resulta na morte celular. O objetivo desse trabalho foi avaliar a influência do ultrassom de baixa frequência (LFU) na penetração cutânea de um agente sonossensibilizante modelo, a zinco ftalocianina (ZnF), e na geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e radicais livres importantes para a eficácia da TSD. O domínio do sistema carreador da ZnF nas respostas decorrentes da aplicação do LFU também foi investigado. Métodos: Micelas, como sistemas carreadores da ZnF, à base de 1,2-distearoil-sn-glicero-3fosfoetanolamina conjugado ao polietilenoglicol 2000 (DSPE-PEG) foram obtidas após a determinação de sua concentração micelar crítica (CMC) pelo método do pireno. As micelas de ZnF foram preparadas pelo método de hidratação do filme lipídico, otimizadas pelo delineamento experimental de Box-Behnken (BBD) e caracterizadas físico-química e morfologicamente. A atividade cavitacional dos meios de acoplamentos usados nos experimentos de penetração in vitro foi estimada usando o método do dosímetro de KI. Estudos de penetração cutânea passiva e sob influência do LFU no protocolo de prétratamento e tratamento simultâneo foram realizados e a distribuição da ZnF nas diferentes camadas da pele foi quantitativamente monitorada e qualitativamente demonstrada por microscopia confocal. No pré-tratamento, usou-se como meio de acoplamento gel de hidroxietilcelulose (HEC). Para investigar o efeito da formulação, após esse tratamento e no tratamento simultâneo a pele foi tratada com as micelas contendo ZnF e com emulsões de composição semelhante. Os parâmetros de aplicação do LFU foram 20 KHz, a 10 W/cm² e ciclo de trabalho de 5 s ligado e 5 s desligado. A pele foi irradiada até atingir a resistividade de 1 kΩ.cm². A geração de radicais hidroxila, oxigênio singleto e peroxidação lipídica da pele produzidas pelo LFU na presença da ZnF também foi avaliada. Resultados: A CMC do DSPE-PEG em solução tampão HEPES 20 mmol/L (pH 7,4) foi de 2x10⁻⁵ mol/L. As micelas contendo ZnF apresentaram tamanho de partícula, índice de polidispersão (PdI), potencial zeta e concentração de ZnF de 138±10 nm, 0,25±0,01, -27±1 mV e 13±2 µa/mL. respectivamente e com morfologia esférica. O gel de HEC e as micelas brancas usadas como meio de acoplamento aumentaram 2,6 e 1,8 vezes, respectivamente, a atividade cavitacional do LFU em relação a solução aquosa. A guantidade de ZnF recuperada da derme após 6 h de permeações passiva foi aproximadamente 4 vezes maior quando a emulsão foi utilizada como carreador em relação a micela. No pré-tratamento e tratamento simultâneo com LFU, no entanto, as micelas aumentaram, respectivamente, 21 e 7 vezes mais a penetração da ZnF do que a emulsão. O tratamento simultâneo da pele com LFU e as micelas contendo ZnF resultou na maior quantidade e distribuição homogênea da ZnF em todas as camadas da pele. A irradiação do LFU aumentou em mais de 26 vezes a oxidação dos íons iodeto pelos radicais hidroxila gerados pelo LFU e significativamente gerou oxigênio singleto em comparação aos respectivos grupos controle. Além disso, a irradiação do LFU na pele, submetida a permeação passiva com as micelas contendo ZnF por 6 h, dobrou a peroxidação lipídica, indicando o potencial do LFU em produzir espécies reativas de oxigênio (ROS) e radicais livres na TSD. Conclusão: O potencial do LFU associado a micelas contendo ZnF em promover a penetração cutânea da ZnF e gerar ROS e radicais livres para a TSD de tumores cutâneos foi demonstrado.

Palavras chaves: Micelas poliméricas; Zinco ftalocianina; Ultrassom de baixa frequência; Terapia sonodinâmica

ABSTRACT

MARTINS, Y.A. Influence of the low-frequency ultrasound on the skin penetration of zinc phthalocyanine formulations and its potential for the sonodynamic therapy of skin tumors. 2019. 168 F. Dissertation (Master's degree). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

Introduction: Sonodynamic therapy (TSD) is a new therapeutic modality for the noninvasive treatment of skin cancer based on the association of ultrasound and sonosensitizing agents. TSD results in cell death through acoustic cavitation-dependent mechanisms, which are not yet fully understood. This study aimed to evaluate the influence of the low-frequency ultrasound (LFU) on the skin penetration of a model sonosensitizing agent, zinc phtalocyanine (ZnF) and on the generation of oxygen reactive species (ROS) and free radicals, which are important for the TSD efficacy. The characteristics of the ZnF carrier systems in the LFU-mediated penetration were also investigated. Methods: Micelles of ZnF polyethylene glycol 2000-conjugated 1,2-distearoyl-sn-glycero-3based on phosphoethanolamine (DSPE-PEG) were obtained after determining the critical micellar concentration (CMC) of DSPE-PEG by the method of pyrene. Micelles of ZnF were prepared by hydration method of the lipid film, optimized by the Box-Behnken experimental design and physicochemical and morphologically characterized. The cavitation activity of the coupling media used in the *in vitro* penetration experiments was estimated using the KI dosimeter method. Studies of passive penetration in porcine skin under the influence of LFU in the pretreatment and simultaneous protocols were carried out, and the distribution of ZnF in the different layers of the skin was quantitatively monitored and qualitatively demonstrated by confocal microscopy. In the pre-treatment, hydrogel of hydroxyethylcellulose (HEC) was used as coupling medium. After pre-treatment and simultaneous protocols, the micelles and the emulsion containing ZnF were put in contact with the LFU-treated skin in order to investigate the effect of the characteristics of the formulations on the drug penetration. The LFU parameters used in the experiments were 20 kHz, 10 W/cm² in the pulsatile mode set in 5 s on and 5 s off. The skin was irradiated until the resistivity of the stratum corneum reached 1 $k\Omega$.cm².The generation of hydroxyl radicals, singlet oxygen and lipid peroxidation by the LFU in the presence of ZnF was also evaluated. Results: The CMC value of the DSPE-PEG in 20-mmol/L HEPES buffer solution (pH 7,4) was 2,0 x 10⁻⁵ mol/L. The micelles of ZnF showed particle size, polydispersion index (PdI), zeta potential and ZnF concentration of 138±10 nm, 0,25±0,01, -27±1 mV e 13±2 µg/mL, respectively, and spherical shape. The hydrogel of HEC and the blank micelles used as coupling media increased the cavitation activity by 2.6 and 1.8-fold, respectively, in comparison to the aqueous solution. The amount of ZnF quantified in the dermis after 6h-passive permeation was approximately 4-fold higher when delivery by the emulsion in comparison to the micelles. However, in the pre-treatment and simultaneous protocols with LFU, micelles increased in 21 and 7-fold the penetration of ZnF compared to the emulsion. The simultaneous treatment of the skin with the micelle of ZnF yielded the highest amount and more homogeneous distribution of the drug in all skin layers. The LFU irradiation increased the oxidation of iodide ions by the ultrasound-generated hydroxyl radicals in 26-fold and significantly generated singlet oxygen compared to the respective control groups. Moreover, LFU irradiation in the skin, previously underwent to 6h-passive permeation with the micelles of ZnF, duplicated the lipid peroxidation. Conclusion: The potential of the LFU associated with the micelles of ZnF to promote the skin penetration of the drug and generate ROS and free radicals for the sonodynamic therapy of skin tumors has been demonstrated.

Key words: Polymeric micelles; Zinc phthalocyanine; Low-frequency ultrasound; Sonodynamic therapy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura da pele dividida em suas três camadas principais: a epiderme, a
derme e o tecido subcutâneo (A) e suas células, estruturas e apêndices (B)27
Figura 2. Representação esquemática das vias de penetração da pele
Figura 3. As principais estratégias usadas para aumentar a permeação de fármacos
através da pele32
Figura 4. Representação esquemática dos processos de cavitação acústica do tipo
estável e inercial
Figura 5. Representação esquemática do tratamento sonoforérico da pele: A)
Simultâneo e B) Pré-tratamento38
Figura 6. Representação esquemática das regiões localizadas de transporte (LTRs)
formadas pela aplicação do LFU na pele41
Figure 7. Os prováveis mecanismos de ação que geram ROS e radicais livres na
terapia sonodinâmica e os principais fenômenos e eventos intracelulares que
resultam da irradiação do ultrassom na célula na presença de um agente
sonossensibilizante55
Figura 8. Medida da frequência do ultrassom usando o hidrofone75
Figura 9. Curva analítica da ZnF em DMSO (n=3)84
Figura 10. Comparação dos espectros de emissão de fluorescência de uma solução
de ZnF a 50 ng/mL e da micela branca diluída em DMSO (λ exc = 610 nm, fenda
5/5)
Figura 11. Determinação da concentração micelar crítica do DSPE-PEG em solução
tampão HEPES 20 mmol/L pH7,4 pelo método do pireno
Figura 12. Tamanho médio das micelas preparadas pela técnica de hidratação do
filme lipídico a partir de 15 mg de DSPE-PEG, 140 μg de ZnF e solução de
hidratação do filme lipídico composta por 1% Tween 80/Span 80 (1:3 mol/mol)
em tampão HEPES 20 mmol/L pH 7,491
Figura 13. Gráficos de superfície de resposta 2D e 3D mostrando o efeito das
variáveis independentes sobre o tamanho das micelas: a. Em função da massa
de DSPE-PEG e da % de agentes estabilizantes; b. Em função da massa de
ZnF e da % de agentes estabilizantes95
Figura 14. Gráficos de superfície de resposta 2D e 3D mostrando o efeito das
variáveis independentes sobre o PdI: c. Em função da massa de DSPE-PEG e

da % de agentes estabilizantes; d. Em função da massa de ZnF e da % de Figura 15. Gráficos de superfície de resposta 2D e 3D mostrando o efeito das variáveis independentes sobre o potencial zeta: e. Em função da massa de DSPE-PEG e da % de agentes estabilizantes; f. Em função da massa de ZnF e da % de agentes estabilizantes......98 Figura 16. Gráficos de superfície de resposta 2D e 3D mostrando o efeito das variáveis independentes sobre a concentração de ZnF: g. Em função da massa de DSPE-PEG e da % de agentes estabilizantes; h. Em função da massa de Figura 17. Gráfico do espaço de interesse (em amarelo) em função da Figura 19. Avaliação da atividade de cavitação inercial pelo dosímetro de KI em diferentes formulações......110 Figura 20. Influência do meio receptor 1% SLS (m/v) em solução tampão PBS pH 7,4 Figura 21. Efeito das características da formulação na penetração da ZnF na A) epiderme viável e B) derme (n≥5), passivamente e sob os protocolos de prétratamento e tratamento simultâneo......115 Figura 22. Imagens representativas de cortes transversais da pele obtidas em microscópio confocal após os experimentos de penetração passiva e sonoforética de micelas contendo ZnF.....126 Figura 23. Produção de radicais hidroxila quantificados por dosímetro de KI em solução tampão HEPES 20 mmol/L, pH 7,4.....131 Figura 24. Investigação da geração sonodinâmica de oxigênio singleto com LFU Figure 25. Investigação da geração de oxigênio singleto pelo LFU através do método indireto do p-nitrosodimetilanilina e imidazol (A) e porcentagem da concentração Figura 26. Efeito da peroxidação lipídica em pele pela terapia sonodinâmica com Figura 27. Espectro de absorção da Ce6 em água deionizada pH 4,5 (linha preta),

- Figura 28. Espectro de fluorescência da Ce6 em água deionizada pH 4,5 (linha preta), em solução tampão HEPES pH 7,4 (linha azul) e DMSO (linha vermelha).142

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Variáveis, além da frequência, que podem ser alteradas para modular a
permeabilização da pele na sonoforese
Tabela 2 - Sistemas de liberação de fármacos nanoparticulados estudados em
associação com o LFU para a administração tópica49
Tabela 3 - Delineamento experimental do tipo Box-Behnken para o preparo, pela
técnica de hidratação do filme lipídico, de 3,0 mL de micelas contendo ZnF em
solução tampão HEPES 20 mmol/L, pH 7,470
Tabela 4 - Avaliação da exatidão para os padrões de ZnF em DMSO (n=3)85
Tabela 5 - Resultados dos testes de precisão intra-ensaio e inter-ensaio para
amostras de ZnF em DMSO (n=3)86
Tabela 6 - Resultados do estudo de recuperação de ZnF da pele de suínos utilizando
DMSO como solvente extrator (n=3)87
Tabela 7 - Características físico-químicas e concentração de ZnF das micelas
preparadas com o delineamente do tipo Box-Behnken apresentado na Tabela 392
Tabela 8 - Resultados da análise por ANOVA para os modelos, termos da equação e
falta de ajuste e um sumário com as equações dos modelos e os coeficientes de
correlação ajustado e predito93
Tabela 9 - Otimização das micelas de ZnF101
Tabela 10 - Composição da formulação, para o preparo de 3,0 mL de micelas, para
se obter as respostas desejadas e os intervalos estatísticos de predição para
confirmação do modelo103
Tabela 11 - Caracterização físico-química das micelas contendo ou não ZnF e da
emulsão de ZnF104
Tabela 12 - Quantidade de ZnF acumulada nas diferentes camadas da pele após 6 h
de contato das micelas com a pele sem tratamento (permeação passiva) e após
o tratamento com LFU nos protocolos de pré-tratamento e tratamento
simultâneo119
Tabela 13 - Quantidade de ZnF acumulada nas diferentes camadas da pele após 6 h
e 24 h de contato da formulação micelar de ZnF sem tratamento com LFU
(permeação passiva)120
Tabela 14 - Contribuição do fluxo convectivo e da transmissão acústica induzidos
pelo LFU simultâneo na penetração da ZnF nas diferentes camadas da pele a
partir das micelas124

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância		
CAPES	Coordenação de Aperfeiçomento de Pessoal de Nível Superior		
Ce6	Clorina e-6		
СМС	Concentração micelar crítica		
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico		
CV	Coeficiente de variação		
DLS	Espalhamento dinâmico da luz		
DMSO	Dimetilsufóxido		
DNA	Ácido desoxirribonucleico		
DSPE-PEG	1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine conjugado ao		
	polietilenoglicol 2000		
EE%	Eficiência de encapsulação		
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo		
Fc	Fator de correção		
FCFRP	Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto		
HEC	Hidroxietilcelulose		
HEPES	Ácido 2-[4-(2-hidroxietil)1-piperazinil]-etanosufônico		
I _A	Intensidade de absorção		
I _F	Intensidade de fluorescência		
KI	lodeto de potássio		
LD	Limite de detecção		
LFU	Ultrassom de baixa frequência		
LQ	Limite de quantificação		
LTR	Região localizada de transporte		
MDA	Malondialdeído		
МЕТ	Microscopia eletrônica de transmissão		
ММ	Massa molecular		
NTA	Análise de rastreamento de nanopartículas		
p-NMDA	p-nitrosodimetilanilina		
PAMAM	Poli(amidoamina)		
PBS	Tampão fosfato-salino		
Pdl	Índice de polispersão		

PEG	Polietilenoglicol
рН	Potencial hidrogeniônico
PTFE	Politetrafluoretileno
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SLS	Laurial sulfato de sódio
SOSG	Sensor verde de oxigênio singleto
SOSG-PE	Endoperóxido do sensor verde de oxigênio singleto
ТВА	Ácido tiobarbitúrico
TFD	Terapia fotodinâmica
TPGS	d-α-tocopheryl polyethylene glycol 1000 succinate
TSD	Terapia sonodinâmica
TSFD	Terapia sonofotodinâmica
ZnF	Zinco ftalocianina
λ_{abs}	Comprimento de onda de absorção
λ _{em}	Comprimento de onda de emissão
λ _{ex}	Comprimento de onda de excitação

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE TABELAS	vi
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	v
1. INTRODUÇÃO	.22
2. REVISÃO DE LITERATURA	27
2.1 Estrutura da pele e vias de penetração de fármacos	.27
2.2 Administração tópica de antineoplásicos	.31
2.3 Sonoforese	.34
2.3.1. Diferenças entre os protocolos de tratamento sonoforético da pele e se	eus
mecanismos	.38
2.3.2 Sonoforese de alta e baixa frequencia	.39
2.3.3 O ultrassom de baixa frequencia e as regiões localizadas de transporte	na ⊿∩
2.3.4 Estudos clínicos com o LEU obietivando a acão tónica de fármacos	. 40
2.4 Terapia sonodinâmica (TSD)	.50
2.4.1 Mecanismos da TSD	.51
2.4.2 Associação da TSD a outras terapias para o tratamento do câncer	. 58
2.4.3 Nanopartículas como sensibilizantes intrínsecos	. 60
3 OBJETIVOS	63
3.1 Objetivo geral	.63
3.2 Objetivos específicos	.63
4 METODOLOGIA EXPERIMENTAL	64
4.1 Método analítico para guantificação da ZnF	.64
4.1.1 Especificidade	.64
4.1.2 Linearidade	. 64
4.1.3 Exatidão	. 65
4.1.4 Precisão	. 65
4.1.6 Recuperação da ZnF da pele de orelha de suínos	.66
4.2 Determinação da CMC	.66
4.3 Desenvolvimento e otimização das micelas contendo ZnF	.67
4.3.1 Preparação das micelas pela tecnica de dissolução direta do DSPE-P com o fármaco	'EG .67
4.3.2 Preparação das micelas pelo técnica da hidratação do filme lipídico	. 67
4.3.3 Delineamento experimental de Box-Behnken	. 68
4.3.4 Análise estatística	. 69
4.4 Caracterização das formulações	.71
4.4.1 Tamanho médio, PdI, Potencial zeta e Concentração de nanopartículas.	.71
4.4.2 Determinação da concentração de ZNF solubilizada	. 72
4.4.3 Uaracterização monologica	. 72
4.4.4 Andrise estatistica	. / Z 72
TIVI VITTUIAÇÕES AVAITAVAS TIVS EXPETITIETITUS COTT O LEO	2

4.5.1 Hidrogel de hidroxietilcelulose (HEC)	
4.5.2 Solução de lauril sulfato de sódio (SLS)	72
4.5.3 Micelas brancas	72
4.5.4 Micelas contendo ZnF	73
4.5.5 Emulsão contendo ZnF	73
4.6 Aparato do LFU	73
4.6.1 Medida da frequência do ultrassom	74
4.6.2 Calibração da intensidade	75
4.7 Atividade cavitacional nos meios de acoplamento do LFU	76
4.7.1 Análise estatística	76
4.8 Ensaios in vitro de penetração cutânea passiva e sonoforética	76
4.8.1 Medida de resistividade elétrica da pele	76
4.8.2 Influência do meio receptor sobre a resistividade da pele	77
4.8.3 Estudos de penetração cutânea passiva da zinco ftalocianina	77
4.8.4 Influência do LFU na penetração cutânea da ZnF	78
4.8.5 Análise estatística	80
4.8.6 Distribuição da ZnF na pele por microscopia confocal	80
4.9 Avaliação da produção de ROS visando a terapia sonodinâmica co	om LFU
	80
4.9.1 Detecção da geração de radicais hidroxila	80
4.9.2 Detecção da geração de oxigênio singleto	81
4.9.3 Detecção da peroxidação lipídica no tecido cutâneo de suínos	
4.9.4 Análise estatística	83
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	
5 1 Método analítico nara quantificação de ZnE	84
5.2 Determinação da CMC	
5.2 Determinação da CMC 5.3 Desenvolvimento e otimização das micelas contendo ZnF	
5.2 Determinação da CMC 5.3 Desenvolvimento e otimização das micelas contendo ZnF 5.3.1 Preparação das micelas pela técnica de dissolução direta do fá	
 5.2 Determinação da CMC 5.3 Desenvolvimento e otimização das micelas contendo ZnF 5.3.1 Preparação das micelas pela técnica de dissolução direta do fá DSPE-PEG 	
 5.2 Determinação da CMC 5.3 Desenvolvimento e otimização das micelas contendo ZnF 5.3.1 Preparação das micelas pela técnica de dissolução direta do fá DSPE-PEG 5.3.2 Preparação das micelas pela técnica de hidratação do filme lipídico 	88 89 rmaco e 89
 5.2 Determinação da CMC 5.3 Desenvolvimento e otimização das micelas contendo ZnF 5.3.1 Preparação das micelas pela técnica de dissolução direta do fá DSPE-PEG 5.3.2 Preparação das micelas pela técnica de hidratação do filme lipídico 5.3.3 Delineamento experimental de Box-Behnken 	88 89 rmaco e 89 90 91
 5.2 Determinação da CMC 5.3 Desenvolvimento e otimização das micelas contendo ZnF 5.3.1 Preparação das micelas pela técnica de dissolução direta do fá DSPE-PEG 5.3.2 Preparação das micelas pela técnica de hidratação do filme lipídico 5.3.3 Delineamento experimental de Box-Behnken 5.3.4 Otimização da formulação micelar 	88 89 rmaco e
 5.2 Determinação da CMC. 5.3 Desenvolvimento e otimização das micelas contendo ZnF. 5.3.1 Preparação das micelas pela técnica de dissolução direta do fá DSPE-PEG. 5.3.2 Preparação das micelas pela técnica de hidratação do filme lipídico 5.3.3 Delineamento experimental de Box-Behnken 5.3.4 Otimização da formulação micelar 5.4 Caracterização das formulações contendo ZnF. 	88 89 rmaco e
 5.2 Determinação da CMC 5.3 Desenvolvimento e otimização das micelas contendo ZnF 5.3.1 Preparação das micelas pela técnica de dissolução direta do fá DSPE-PEG 5.3.2 Preparação das micelas pela técnica de hidratação do filme lipídico 5.3.3 Delineamento experimental de Box-Behnken 5.3.4 Otimização das formulação micelar 5.4 Caracterização físico-química 	88 89 777777777777777777777777777777777
 5.2 Determinação da CMC. 5.3 Desenvolvimento e otimização das micelas contendo ZnF 5.3.1 Preparação das micelas pela técnica de dissolução direta do fá. DSPE-PEG 5.3.2 Preparação das micelas pela técnica de hidratação do filme lipídico 5.3.3 Delineamento experimental de Box-Behnken 5.3.4 Otimização das formulação micelar	88 89 rmaco e
 5.2 Determinação da CMC 5.3 Desenvolvimento e otimização das micelas contendo ZnF 5.3.1 Preparação das micelas pela técnica de dissolução direta do fá DSPE-PEG 5.3.2 Preparação das micelas pela técnica de hidratação do filme lipídico 5.3.3 Delineamento experimental de Box-Behnken 5.3.4 Otimização da formulação micelar 5.4 Caracterização das formulações contendo ZnF 5.4.1 Caracterização físico-química 5.4.2 Concentração de ZnF solubilizada nas micelas 5.5 Influência dos meios de acoplamento na atividade cavitacional 	88 89 rmaco e
 5.2 Determinação da CMC. 5.3 Desenvolvimento e otimização das micelas contendo ZnF 5.3.1 Preparação das micelas pela técnica de dissolução direta do fá. DSPE-PEG 5.3.2 Preparação das micelas pela técnica de hidratação do filme lipídico 5.3.3 Delineamento experimental de Box-Behnken 5.3.4 Otimização das formulação micelar 5.4 Caracterização das formulações contendo ZnF 5.4.1 Caracterização físico-química 5.4.2 Concentração de ZnF solubilizada nas micelas 5.5 Influência dos meios de acoplamento na atividade cavitacional 	88 89 77777777777777777777777777777777
 5.2 Determinação da CMC. 5.3 Desenvolvimento e otimização das micelas contendo ZnF 5.3.1 Preparação das micelas pela técnica de dissolução direta do fá DSPE-PEG 5.3.2 Preparação das micelas pela técnica de hidratação do filme lipídico 5.3.3 Delineamento experimental de Box-Behnken	88 89 rmaco e
 5.2 Determinação da CMC 5.3 Desenvolvimento e otimização das micelas contendo ZnF 5.3.1 Preparação das micelas pela técnica de dissolução direta do fá. DSPE-PEG 5.3.2 Preparação das micelas pela técnica de hidratação do filme lipídico 5.3.3 Delineamento experimental de Box-Behnken 5.3.4 Otimização das formulação micelar	
 5.2 Determinação da CMC 5.3 Desenvolvimento e otimização das micelas contendo ZnF	88 89 rmaco e
 5.2 Determinação da CMC 5.3 Desenvolvimento e otimização das micelas contendo ZnF	88 89 rmaco e
 5.2 Determinação da CMC	88 89 77777777777777777777777777777777
 5.2 Determinação da CMC 5.3 Desenvolvimento e otimização das micelas contendo ZnF	88
 5.2 Determinação da CMC	88 89 rmaco e
 5.2 Determinação da CMC. 5.3 Desenvolvimento e otimização das micelas contendo ZnF	
 5.2 Determinação da CMC 5.3 Desenvolvimento e otimização das micelas contendo ZnF 5.3.1 Preparação das micelas pela técnica de dissolução direta do fá DSPE-PEG 5.3.2 Preparação das micelas pela técnica de hidratação do filme lipídico 5.3.3 Delineamento experimental de Box-Behnken 5.3.4 Otimização das formulação micelar 5.4 Caracterização das formulações contendo ZnF 5.4.1 Caracterização físico-química 5.4.2 Concentração de ZnF solubilizada nas micelas 5.5 Influência dos meios de acoplamento na atividade cavitacional 5.6.5 Estudos de permeação cutânea da ZnF 5.6.1 Resistividade do estrato córneo frente ao contato com o meio recep 5.6.2 Influência do tratamento sonoforético na penetração da ZnF a princelas 5.6.4 Influência do fluxo convectivo e transmissão acústica induzidso p na penetração da ZnF a partir das micelas 	
 5.2 Determinação da CMC. 5.3 Desenvolvimento e otimização das micelas contendo ZnF 5.3.1 Preparação das micelas pela técnica de dissolução direta do fá. DSPE-PEG 5.3.2 Preparação das micelas pela técnica de hidratação do filme lipídico 5.3.3 Delineamento experimental de Box-Behnken	88 89 rmaco e
 5.2 Determinação da CMC. 5.3 Desenvolvimento e otimização das micelas contendo ZnF	
 5.2 Determinação da CMC	

5.7.2 Avaliação da produção de oxigênio singleto	
5.7.3 Avaliação da peroxidação lipídica pela terapia sonodinâmica o	com o LFU
na pele de suínos	137
6.CONCLUSÃO	140
7. DIFICULDADES ENCONTRADAS	141
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGÁFICAS	144

1. INTRODUÇÃO

A cada ano no Brasil e no mundo os casos de câncer vêm aumentando e, segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA, 2018), estima-se que entre os anos de 2018 e 2019 ocorram cerca de 600 mil novos casos de câncer no Brasil. Destes, o de maior incidência é o câncer de pele, cujas ocorrências nas últimas 3 décadas ultrapassam a soma das ocorrências de todos os outros tipos de tumores (INCA, 2018)

As terapias convencionais indicadas para o tratamento do câncer de pele incluem a intervenção cirúrgica, a radioterapia e a quimioterapia, as quais podem ser combinadas. Todas apresentam desvantagens, como os riscos de desconfiguração e comprometimento funcional, no caso da cirurgia, e muitos efeitos adversos, como no caso da radioterapia e da quimioterapia, a qual geralmente requer um extenso período de infusões intravenosas. Em conjunto, esses problemas podem acarretar em falhas ou abandono do tratamento pelos pacientes (CHUMMUN; MCLEAN, 2017; CRAYTHORNE; AL-NIAMI, 2017).

Por isso, métodos alternativos para o tratamento de tumores de pele são cada vez mais aplicados. Dentre eles, destaca-se a terapia fotodinâmica (TFD) tópica (BLANCO et al., 2017; CHUMMUN; MCLEAN, 2017). Ela consiste na interação entre luz, agente fotossensibilizante e oxigênio para gerar espécies reativas de oxigênio (ROS), como o oxigênio singleto e radicais livres altamente tóxicos para as células tumorais, que suprimem o crescimento do tumor, além de estimular o sistema imunológico do hospedeiro contra o câncer (ROSENTHAL; SOSTARIC; RIESZ, 2004; MCHALE et al., 2016; PANG et al., 2016; RENGENG et al., 2017). No entanto, a penetração da luz na pele, em diferentes comprimentos de onda, é limitada pela sua espessura e composição. Especificamente, muitas das substâncias que compõem o tumor, principalmente a melanina no caso do câncer de pele tipo melanoma, além de componentes da pele, absorvem parte da luz necessária para o agente fotossensibilizante iniciar as reações fotoquímicas que desencadeiam a produção de ROS, limitando assim a eficácia da TFD (MCEWAN et al., 2016).

A terapia sonodinâmica (TSD) surge então como uma alternativa à TFD. Nela, a luz é substituída pela aplicação de ultrassom e o agente fotossensibilizante, por um agente sonossensibilizante. A TSD vem se mostrando mais vantajosa do que a TFD devido a maior capacidade do ultrassom em penetrar a pele em grandes profundidades, possibilitando o tratamento não invasivo de tumores localizados em camadas profundas da pele (MCEWAN et al., 2016b).

Os mecanismos pelos quais a TSD leva a morte das células tumorais ainda são pouco conhecidos. Um dos mecanismos mais prováveis e discutidos para essa ação é a formação de ROS. Acredita-se que ela decorra da cavitação acústica gerada pela aplicação do ultrassom. A cavitação envolve a formação, o crescimento e o colapso de bolhas de ar gerando luz (sonoluminescência) e energia. Estima-se que essa energia seja capaz de ativar os agentes sonossensibilizadores presentes no tumor para o estado excitado e, à medida que esse sensibilizante regressa ao estado fundamental, a energia é transferida para o oxigênio circundante para a produção de ROS, com consequente morte celular. Ademais, o colapso das bolhas formadas durante a cavitação podem causar distúrbios diretos no potential da membrana mitocondrial, danos na membrana celular e fragmentação do DNA, induzindo a morte celular por apoptose. A via mitocôndria-caspase parece ser o mecanismo fundamental que induz a apoptose (ROSENTHAL; SOSTARIC; RIESZ, 2004; PANG et al., 2016; RENGENG et al., 2017; PAN et al., 2018; YANG et al., 2019).

A frequência do ultrassom é o principal fator que influencia o fenômeno da cavitação acústica. O ultrassom de alta frequência gera um número maior de microbolhas, de menores tamanhos no meio em que é aplicado do que o ultrassom de baixa frequência (LFU, do inglês *low frequency ultrasound*). No entanto, as bolhas produzidas pelo o LFU são maiores e acabam por liberar mais energia no meio do que as produzidas pelo ultrassom de alta frequência (entre 1 e 2 MHz), no entanto, o mais estudado para a TSD (WOOD; SEHGAL, 2015; PAN et al., 2018; YANG et al., 2019) devido a sua maior disponibilidade no cenário clínico. Ele é usado, por exemplo, para o diagnóstico por imagem e tratamentos fisioterápicos (BAILEY et al., 2003). São poucos os estudos que avaliaram o efeito do LFU na TSD e os mecanismos pelos quais o LFU influencia na TSD são ainda menos conhecidos e explorados do que àqueles causados pelo ultrassom de alta frequência.

Um dos componentes da TSD que podem influenciar na sua eficácia, além da frequência, é o agente sonossensibilizante. A zinco ftalocianina (ZnF) é um dos agentes sonossensibilizantes mais estudados devido ao sucesso que apresenta como agente sensibilizante na TFD. Como ele é muito eficaz em gerar ROS na

presença da luz (HODGKINSON et al., 2017), estima-se que o mesmo ocorra na presença do ultrassom (MILOWSKA; GABRYELAK, 2005; XU et al., 2015b).

Para ser efetivo, no entanto, tanto na TFD como na TSD, o agente sonossensibilizante precisa estar confinado no local do tratamento, ou seja, nos tumores que se pretende tratar. Como o próprio nome infere, os tumores de pele ficam confinados na pele do paciente; muitas vezes em suas camadas mais profundas (CHUMMUN; MCLEAN, 2017; CRAYTHORNE; AL-NIAMI, 2017). Como a maioria dos agentes sensibilizantes, a ZnF pertence a classe IV de fármacos do sistema de classificação biofarmacêutica, sendo caracterizada pela baixa solubilidade em água e baixa permeabilidade. Em função da baixa solubilidade, a ZnF tende a se agregar em meio aquoso após a administração intravenosa e reduzir sua bioatividade contra tumores. Mesmo se a ZnF fosse solubilizada na sua forma livre em um veículo aquoso, como em uma solução, o fármaco se distribuiria não especificamente pelo organismo, induziria efeitos adversos como fotossensibilidade ocular ou cutânea, e como resultado, reduziria a qualidade de vida de pacientes tratados com o fármaco (MD et al., 2017). Para evitar os efeitos adversos da administração sistêmica da ZnF, sua admnistração tópica é avidamente almejada para o tratamento do câncer de pele. Dessa forma, a aplicação tópica da ZnF pode melhorar a efetividade da TFD ou da TSD por ser uma via de administração não invasiva, de aplicação simplificada, de fácil acessibilidade ao estímulo físico (luz ou ultrassom), por aumentar a concentração do fármaco no sítio-alvo da doença e por restringir a fotossensibilidade residual do fármaco apenas ao local de aplicação. Entretanto, a sua elevada lipofilicidade limita demasiamente a penetração da ZnF livre administrada topicamente na pele, a qual precipitaria em contato com o estrato córneo, a principal barreira a penetração cutânea de fármacos, na forma de agregados ou cristais lipofílicos. Para promover, então, sua penetração através do estrato córneo até as camadas profundas da pele, onde estão localizados a maioria dos tumores cutâneos, são necessários sistemas de liberação e/ou métodos físicos (DALMOLIN; LOPEZ, 2018), como o próprio LFU.

O LFU é o mais utilizado dos tratamentos sonoforéticos para aumentar a permeabilidade cutânea, sendo que o FDA já aprovou o seu uso para a aplicação local de anestésicos (POLAT; BLANKSCHTEIN; LANGER, 2010; POLAT et al., 2011b, 2012a; DRAGICEVIC; MAIBACH, 2018). Existem duas modalidades de aplicação do LFU na pele. O pré-tratamento, em que o ultrassom é aplicado antes da

administração do fármaco, e o tratamento simultâneo. No pré-tratamento, com um meio de acoplamento adequado, pode-se controlar a extensão da perturbação da pele e a criação de regiões localizadas de transporte (LTRs). A permeabilidade dessas regiões pode também ser modulada em função das características do meio de acoplamento, possibilitando direcionar a liberação do fármaco posteriormente aplicado para um local específico da pele (PEREIRA; RAMOS; LOPEZ, 2017) ou para a circulação sistêmica (POLAT; BLANKSCHTEIN; LANGER, 2010). No tratamento simultâneo, a aplicação do LFU já na formulação que contém o fármaco tem a vantagem de unir os benefícios da formação das LTRs ao fluxo convectivo induzido pelo ultrassom, podendo assim "empurrar" uma maior concentração de fármaco por conveção diminui tão logo o ultrassom seja desligado (MITRAGOTRI; KOST, 2004; POLAT et al., 2011b).

A combinação de sistemas de liberação com outros métodos promotores da penetração, com o objetivo de melhorar a liberação de fármacos para a pele ou para a circulação sanguínea, tem sido objeto de inúmeras investigações (DRAGICEVIC; MAIBACH, 2018). Dentre os diferentes métodos promotores da penetração cutânea, os métodos físicos tem atraído interesse para serem aplicados em conjunto com sistemas de liberação, já que essas duas abordagens, usadas para melhorar a penetração de fármacos, atuam através de mecanismos distintos. Assim, supõe-se que esses métodos atuam sinergicamente para vencer a baixa permeabilidade da camada mais apical da pele, o estrato córneo, levando a maior penetração do fármaco (DRAGICEVIC; MAIBACH, 2018).

Dessa forma, a associação do LFU com sistemas de liberação nanoparticulados, visando direcionar a liberação cutânea ou trandérmica de fármacos na pele tem sido alvo de estudos de vários grupos de pesquisa (WEIMANN; WU, 2002; PALIWAL; MENON; MITRAGOTRI, 2006; EL-KAMEL; AL-FAGIH; ALSARRA, 2008; DAHLAN; ALPAR; MURDAN, 2009; LOPEZ et al., 2011; KASETVATIN; RUJIVIPAT; TIYABOONCHAI, 2015; RANGSIMAWONG et al., 2015; HEGDE et al., 2017; MANIKKATH et al., 2017a), pois ainda não se conhece completamente as particularidades e os mecanismos do transporte sonoforético dos fármacos associados a sistemas de liberação com a aplicação do LFU. Nesse aspecto, temos a hipótese de que a natureza das nanopartículas usadas como carreadores de fármacos, aliada à natureza das LTRs formadas quando o LFU é aplicado, pode ditar a extensão da penetração cutânea do fármaco.

Neste contexto, acredita-se que sistemas de liberação micelares sejam mais efetivos do que os lipídicos na permeação cutânea de fármacos lipofílicos, uma vez que o baixo teor de lipídios dos primeiros podem manter as LTRs mais disponíveis e melhorar a penetração de fármacos enquanto que o elevado teor lipídico dos últimos podem levar a oclusão das LTRs e desfavorecer a penetração do fármaco. As micelas são sistemas de liberação constituídos basicamente por substâncias anfifílicas, como tensoativos, fosfolipídios ou polímeros anfifílicos, associados ou não. Dentre os tipos de micelas, as micelas poliméricas apresentam características únicas que as fazem interessantes como sistema de liberação de fármacos para a via tópica como a baixa concentração micelar crítica, alta estabilidade, adequada encapsulação de fármacos e acúmulo específico e aumentado do fármaco no tecidoalvo (KORE et al., 2014). Micelas poliméricas constituídas pelo polímero anfifílico 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine conjugado ao polietilenoglicol 2000 (DSPE-PEG) tem sido reportadas na literatura como sistemas de liberação para a veiculação intravenosa de fármacos lipofílicos antineoplásicos (LUKYANOV; TORCHILIN, 2004). Dessa forma, é provável que essas micelas administradas topicamente na pele aumentem a solubilidade da ZnF no meio e colaborem com sua difusão através do estrato córneo pelas LTRs hidrofílicas formadas após a aplicação do LFU na pele (PALIWAL, MENON; MITRAGOTRI, 2006).

Assim, um dos objetivos desse trabalho é investigar a influência da característica hidrofílica ou lipofílica de formulações para a administração tópica da ZnF por LFU. Para verificar a possibilidade de aliar a ação promotora de penetração cutânea do LFU à sua atividade sonodinâmica, o outro objetivo é avaliar a capacidade do LFU em estimular a formação de ROS e radicais livres na pele, além do impacto do agente sonossensibilizante e da formulação nessa atividade. Visa-se, desta forma, estudar o potencial do LFU para a TSD tópica de tumores cutâneos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Estrutura da pele e vias de penetração de fármacos

A pele é o maior órgão do corpo humano, com área superficial entre 1,5 e 2 m² e aproximadamente 15% do peso corpóreo total. Esta é a principal interface entre o corpo e o ambiente, desempenhando diversas funções como a de termorregulação, proteção do corpo contra agentes químicos, físicos e microbiológicos, prevenção de perda de água e nutrientes. Sua estrutura consiste em duas camadas principais, a epiderme e a derme, acompanhada por um tecido subcutâneo gorduroso (LOPEZ; GRATIERI; GELFUSO, 2012; LAI-CHEONG; MCGRATH, 2017) (Figura 1).

Figura 1. Estrutura da pele dividida em suas três camadas principais: a epiderme, a derme e o tecido subcutâneo (A) e suas células, estruturas e apêndices (B).



Fonte: autoria própria.

O tecido subcutâneo ou hipoderme (Figura 1), composto por lipócitos e tecido conectivo, acomoda os nervos e vasos sanguíneos de maior calibre da pele. Os lipócitos estão organizados em lóbulos de gordura, os quais são separados uns dos outros por septos fibrosos. Feixes de fibras que se originam da derme e se estendem

para o tecido subcutâneo fortalecem a conexão entre esses dois tecidos. A hipoderme dá, portanto, sustentação à pele e é importante para a regulação da temperatura corporal. A gordura nesta região também desempenha função endócrina, produzindo hormônios como a leptina, que contribui com a regulação do apetite e controle de energia metabólica (LAI-CHEONG; MCGRATH, 2017).

A derme é a camada da pele localizada acima do tecido subcutâneo, com 0,5 a 5,0 mm de espessura, dependendo do local do corpo. Ela é composta por material intersticial (fibras de colágeno, elásticas e reticulares) e por células (fibroblastos, mastóctios, plasmócitos, linfócitos, células dendríticas e histiócitos). Cerca de 70% do peso seco da pele é composto por fibras de colágeno, das quais os tipos predominantes são o tipo I e o tipo III. Tanto o colágeno como as fibras elásticas são produzidas e depositadas na pele pelos fibroblastos. Existem diferentes subpopulações de fibroblastos na derme, as quais contribuem de forma específica para a homeostase da pele, a cicatrização e a formação dos folículos pilosos.

A derme também contém estruturas especializadas, como vasos sanguíneos, canais linfáticos, nervos sensoriais, folículos pilosos, glândulas sebáceas, sudoríparas e glândulas apócrinas associadas aos folículos. Os folículos pilosos invadem a epiderme, desembocando na superfície da pele. Esta camada da pele é, portanto, responsável por conferir a estruturação da pele, pelas sensações de dor, calor, pressão e toque, pelo suprimento de água, nutrientes e remoção de metabólitos celulares, homeostase e defesa imunológica (LOPEZ; GRATIERI; GELFUSO, 2012; LAI-CHEONG; MCGRATH, 2017).

A epiderme é a camada avascularizada mais externa da pele, cuja espessura pode variar enormemente, dependendo do local do corpo, de 0,05 mm nas pálpebras até 1,50 mm nas palmas da mão ou solas do pé. Enquanto os queratinócitos são as principais células da epiderme (95%), os melanócitos, as células de Langerhans e as células de Merkel constituem os 5% das células restantes (LAI-CHEONG; MCGRATH, 2017).

A epiderme pode ser subdividida em duas camadas principais: o estrato córneo e a epiderme viável. A epiderme viável possui células em constante divisão e renovação. Dependendo do estado de diferenciação celular dos queratinócitos, a epiderme viável pode ser sub dividida em três camadas: a camada basal ou estrato germinativo, o estrato espinhoso e o estrato granuloso, da região mais interna para a

mais externa da pele, respectivamente (LOPEZ; GRATIERI; GELFUSO, 2012; LAI-CHEONG; MCGRATH, 2017).

A camada basal, próxima a derme, consiste em uma única camada de células-tronco colunares indiferenciadas, sendo ela a responsável pela proliferação e renovação constante dos queratinócitos. Outros tipos de células também são encontradas na membrana basal da epiderme viável, como as células de Langerhans, que são células dendríticas apresentadoras de antígenos, as células de Merkel, que transmitem informações sensoriais da pele para os nervos sensoriais, e os melanócitos (LAI-CHEONG; MCGRATH, 2017).

De todas essas células altamente especializadas presentes na epiderme viável, deve-se atentar para a importante função que os melanócitos desempenham no tecido cutâneo. Os melanócitos são células dendríticas derivadas da crista neural que sintetizam a melanina. Um vez produzida, a melanina é empacotada em vesículas, os melanossomas, que posteriormente são transportados para os queratinócitos da camada basal. Os melanossomas formam uma capa de melanina que protege os núcleos dos queratinócitos da radiação ultravioleta, conferindo proteção contra os efeitos mutagênicos da radiação. Os melanócitos também são responsáveis por conferir a cor da pele do indivíduo, sendo determinada pelo número e tamanho dos melanossomas e pelo tipo de melanina produzida (eumelanina ou feomelanina) (LAI-CHEONG; MCGRATH, 2017).

O processo de diferenciação da epiderme viável ocorre então a partir da camada basal, a partir da qual os queratinócitos se dividem e se diferenciam, empurrando as células já formadas para as camadas mais superiores. Como resultado dessa diferenciação, os queratinócitos se achatam devido a ação da filagrina, um componente proteico dos grânulos de querato-hialina, sobre os filamentos de queratina. Enquanto as células crescem na direção das camadas mais superiores, elas também produzem e secretam substâncias lipídicas (como colesterol, ceramidas e ácidos graxos de cadeia longa) para o espaço intercelular, perdem o núcleo e organelas e, finalmente morrem. Essas profundas alterações na estrutura celular dos queratinócitos resultam na transformação dessas células nos corneócitos, as células do estrato córneo, e marcam o estágio final de diferenciação queratinocítica. Todo esse processo dura, geralmente, cerca de 40 dias na pele saudável.(LAI-CHEONG; MCGRATH, 2017).

O estrato córneo é, portanto, a camada mais externa da pele. Ele possui de 15 a 20 µm de espessura e é a principal barreira de proteção do corpo humano contra a perda excessiva de água e danos ocasionados por agentes tóxicos e microrganismos. Os corneócitos que compõem o estrato córneo são células mortas, achatadas, anucleadas, compostas principalmente de filamentos de queratina. A membrana plasmática dos corneócitos contem envelopes cornificados, formados pela reticulação de precursores proteicos solúveis em água, a involucrina e a loricrina (LAI-CHEONG; MCGRATH, 2017).

Os corneócitos encontram-se embebidos em uma matriz lipídica extracelular, muito bem organizada, composta por ácidos graxos, colesterol e ceramidas, secretada pelos corpos lamelares dos queratinócitos da epiderme viável. Essa estrutura de corneócitos e matriz lipídica, organizados em 15 a 20 camadas, confere ao estrato córneo uma permeabilidade muito baixa a substâncias (LOPEZ; GRATIERI; GELFUSO, 2012; LAI-CHEONG; MCGRATH, 2017).

Nesse aspecto, para permear o estrato córneo as substâncias podem utilizar, dependendo de suas características físico-químicas, três diferentes vias ou rotas (GRATIERI et al., 2008; MAIBACH; DRAGICEVIC, 2016), as quais estão representadas na Figura 2:

a) via intercelular lipídica, entre os corneócitos;

b) via transcelular, atravessando tanto os corneócitos quanto a matriz lipídica;

c) via apêndices da pele.



Figura 2. Representação esquemática das vias de penetração da pele.

Fonte: autoria própria.

A permeação da maioria das substâncias ocorre principalmente pela via intercelular lipídica, circundando os corneócitos. Apesar desta rota de permeação ser mais longa do que a transcelular, ela previne múltiplas partições da molécula permeante entre os corneócitos e os lipídios intercelulares. Contudo, a permeação de algumas substâncias pelo espaço intracelular pode ocorrer principalmente quando agentes promotores da penetração desnaturantes, como a ureia, que modificam a estrutura da queratina que forma os corneócitos, são usados (LOPEZ; GRATIERI; GELFUSO, 2012).

A entrada de substâncias pelos apêndices da pele também pode ocorrer, mas ela é limitada devido a pequena área superficial ocupada por eles, cerca de 0,1%. Mas dependendo das características físico-químicas da molécula permeante e do veículo ela pode ter um papel importante (LOPEZ; GRATIERI; GELFUSO, 2012). Alguns sistemas nanoparticulados, por exemplo, podem se acumular nos folículos pilosos e possibilitar uma liberação sustentada de fármacos dentro da pele (MAIBACH; DRAGICEVIC, 2016; DRAGICEVIC; MAIBACH, 2018).

2.2 Administração tópica de antineoplásicos

A administração tópica de agentes antineoplásicos pode ser vantajosa para o tratamento de diferentes tipos de neoplasias cutâneas, mas é limitada pela função barreira da pele à penetração de substâncias. Apesar de alguns tipos de câncer de pele possuírem baixa letalidade, como o carcinoma de célula basal e de célula escamosa (classificados como tumores de pele do tipo não-melanoma), esses tumores podem causar extrema desconfiguração a órgãos como o nariz, a orelha e os lábios dos pacientes. Portanto, é imperativo que essas lesões sejam preferencialmente tratadas com técnicas não invasivas, como a administração tópica de medicamentos (ITA, 2016).

Embora existam algumas abordagens de tratamento convencionais do câncer de pele como a curetagem, cirurgia, crioterapia e quimioterapia, essas abordagens terapêuticas podem levar a graves eventos adversos, como inflamação severa, dor, cicatrizes desagradáveis e risco de comprometimento funcional. Todos esses problemas comumente resultam em falha terapêutica e abandono do tratamento pelo paciente. Dessa forma, tem se buscado desenvolver ou melhorar modalidades não invasivas, mais efetivas e mais toleráveis de tratamento para o câncer de pele, como a imunoterapia, a bioquimioterapia, a terapia gênica e a terapia fotodinâmica. Esses tratamentos alternativos para o câncer de pele podem proporcionar uma melhor adesão do paciente, eliminar o problema da desconfiguração estética e reduzir os custos com cirurgia, particularmente nos casos em que o câncer se espalhou por grandes áreas do corpo (ITA, 2016).

Entretanto, os fármacos atualmente usados para o tratamento do câncer de pele, como o 5-fluoracil, o imiquimode e a doxorrubicina, não apresentam as características físico-químicas apropriadas que possibilitem sua penetração cutânea em quantidade e profundidade adequadas para efetuar uma resposta terapêutica satisfatória. Além disso, tais agentes antineoplásicos podem causar efeitos adversos graves na pele como reação inflamatória local, prurido, vermelhidão, edema ou até ulceração. Essas desvantagens relacionadas ao tratamento tópico para o câncer de pele enfatizam a necessidade de desenvolver novas formulações ou métodos para aumentar a penetração desses fármacos na pele, visando aumentar a eficácia e efetividade do tratamento do câncer de pele (PEREIRA, 2015). Neste aspecto, com a finalidade de aumentar a permeação cutânea de fármacos e melhorar o tratamento tópico do câncer de pele a combinação de métodos químicos, farmacotécnicos e físicos (Figura 3) deve ser utilizada (NEVES BORGHETI-CARDOSO et al., 2016).

Figura 3. As principais estratégias usadas para aumentar a permeação de fármacos através da pele (Adaptado de NEVES BORGHETI-CARDOSO et al., 2016).



De forma geral, dentre as estratégias de promoção da penetração cutânea de fármacos, o uso de sistemas nanoparticulados associado a um método físico se mostra bastante interessante para o tratamento de tumores de pele porque permitem o controle inteligente da liberação do fármaco e da extensão de perturbação da pele (PEREIRA; RAMOS; LOPEZ, 2017; DALMOLIN; LOPEZ, 2018; PETRILLI et al., 2018; AHMED et al., 2019).

Recentemente, em estudos *in vitro* com pele de suínos, Petrilli et al. (2008) observaram que a iontoforese aumentou a penetração do 5-fluoracil quando em solução aquosa ou incorporado em lipossoma convencional ou funcionalizado com cetuximabe (imunolipossoma). O acúmulo de 5-fluoracil na epiderme viável, onde os tumores são encontrados duplicou quando o fármaco estava encapsulado no imunolipossoma em relação ao lipossoma. Os resultado *in vivo* corroboraram os resultados *in vitro*, demonstrando o potencial dos imunolipossomas e da iontoforese para o tratamento do carcinoma celular escamoso de pele (PETRILLI et al., 2018).

Dalmolin e Lopez (2018) também demonstraram o aumento da penetração cutânea de nanoemulsões contendo o agente fotossensibilizante ZnF na presença da iontoforese. As autoras reportaram um aumento de quase 16 vezes da ZnF na pele de suíno, *in vitro*, após 30 min de iontoforese da nanoemulsão. Os experimentos *in vivo* mostraram que a iontoforese permitiu que a ZnF alcançasse o melanoma induzido sob a pele de camundongos (DALMOLIN; LOPEZ, 2018). Verificaram ainda que a iontoforese da nanoemulsão contendo, além da ZnF, um anticorpo (bevacizumabe) foi mais efetiva do que a injeção intratumoral para a imunofototerapia do melanoma induzido no animal (DALMOLIN, 2019).

Ahmed et al. (2019) investigaram o uso de microagulhas (Derma roller) na penetração cutânea de doxorrubicina e celecoxib encapsulados em gel lipossomal para o tratamento do melanoma. Os resultados mostraram que o pré-tratamento da pele com as microagulhas seguido da administração do gel lipossomal aumentou a penetração da doxorrubicina em quase duas vezes quando comparado com a permeação passiva (sem estímulo da microagulha). A administração dos lipossomas contendo ambos doxorrubicina e celecoxib, após aplicação das microagulhas, aumentou significativamente o efeito antitumoral do melanoma induzido em ratos quando comparada com a administração de apenas um dos fármacos (AHMED et al., 2019).

Huber e colaboradores encontraram resultados positivos com a iontoforese de nanopartículas lipídicas sólidas contendo doxorrubicina. Os autores mostram que a iontoforese da solução do fármaco aumentou a penetração da doxorrubicina na epiderme viável em quatro vezes. Entretanto, quando o fármaco foi incorporado nas nanopartículas, a iontoforese aumentou sua penetração em aproximadamente 50 vezes. Os estudos em animais com a estratégia mostraram a inibição efetiva do crescimento tumoral, acompanhada de aumento da queratinização e morte celular tumoral (HUBER et al., 2015).

Pereira, Ramos e Nishida (2017), investigando a influência do ultrassom e diferentes meios de acoplamento na penetração da doxorrubicina em modelo *in vitro* com pele suína, também encontraram efeitos benéficos na utilização do ultrassom como método físico promotor da penetração cutânea. Os resultados mostraram que a utilização de um gel aniônico como meio de acoplamento permitiu que quatro vezes mais doxorrubicina ficasse retida na pele do que o uso de um gel não iônico (PEREIRA; RAMOS; LOPEZ, 2017). Contrariamente do que foi encontrado por Huber et al. (2015) na presença da iontoforese, a penetração da doxorrubicina a partir de nanopartículas lipídicas na pele pré-tratada com ultrassom diminuiu sua penetração. As autores propuseram que possivelmente o alto teor lipídico das nanopartículas recompunha os caminhos abertos na pele (LTRs) pelo ultrassom, diminuindo a permeabilidade adquirida com o tratamento físico (PEREIRA, 2015).

2.3 Sonoforese

A sonoforese é um método físico que utiliza o ultrassom para permeabilizar a pele e promover a permeação cutânea de fármacos. Ela pode se mostrar mais vantajosa do que os outros métodos físicos com relação a alguns aspectos particulares, como (POLAT et al., 2011b):

- a modulação da extensão de permeabilidade da pele, sem danos à integridade do tecido cutâneo;
- (ii) a liberação do fármaco para um local específico da pele, para uma região do corpo ou para a circulação sistêmica;
- (iii) a penetração de uma gama de fármacos lipofílicos e hidrofílicos, tanto de baixa como alta massa molecular.

Resumidamente, o mecanismo físico de geração das ondas ultrassônicas acontece a partir de uma fonte de alimentação que converte a energia elétrica em vibrações mecânicas. Essa energia elétrica é primeiramente transmitida para um transdutor piezoelétrico, presente na sonda do ultrassom, o qual amplifica essa energia e a transforma em vibrações mecânicas, criando ondas de pressão no meio. Quando aplicado em um meio líquido, a oscilação das ondas do ultrassom forma áreas de contração (alta pressão) e de expansão (baixa pressão) no meio que resultam na formação, expansão e colapso de microbolhas de gás, fenômeno este conhecido como cavitação acústica. Essas microbolhas formadas podem oscilar, crescer e se fragmentar ou interagir entre si (POLAT et al., 2011b, 2012a; ITA, 2017). De forma geral, a cavitação acústica é categorizada em dois tipos (Figura 4):

- a) Cavitação estável em que as microbolhas de cavitação oscilam em torno de um diâmetro de bolha durante vários ciclos acústicos, sem haver o colapso das bolhas (POLAT et al., 2011b, 2012b; ITA, 2017).
- b) Cavitação inercial em que as microbolhas de cavitação crescem rapidamente durantes vários ciclos acústicos, resultando no colapso violento das mesmas (POLAT et al., 2011b, 2012b; ITA, 2017).

Figura 4. Representação esquemática dos processos de cavitação acústica do tipo estável e inercial.



Fonte: autoria própria.

Se a cavitação inercial ocorre no meio líquido, o colapso das bolhas pode resultar na formação de bolhas menores e formação de novas bolhas de cavitação a partir das recém-formadas. Por outro lado, se o colapso das bolhas ocorre próximo a uma superfície sólida, como a pele, pode haver a formação da microjatos localizados na interface líquido-pele como resultado do colapso assimétrico das bolhas de cavitação ao encontrarem uma superfície sólida (POLAT; BLANKSCHTEIN; LANGER, 2010; POLAT et al., 2012b; ITA, 2017).

A cavitação sofre influência de vários parâmetros do ultrassom, mas principalmente de sua frequência. O raio ressonante da bolha de cavitação apresenta uma relação inversa com a frequência do ultrassom. Especificamente, o raio da bolha ressonante linear é definido pela equação $r_{res}x f = C$, onde $r_{res} e f$ são o raio da bolha ressonante e a frequência do ultrassom, respectivamente, e C é a constante que dependente das propriedades da solução na qual a cavitação está ocorrendo. Portanto, o ultrassom de baixa a frequência gerará microbolhas de maior o diâmetro em comparação ao ultrassom de alta frequência.

Desta forma, dependendo da frequência do ultrassom, a sonoforese pode ser classificada em: (i) a sonoforese de alta frequência, cuja frequência do ultrassom pode variar de 0,7 até 16 MHz, o qual é corriqueiramente usado para diagnóstico e fisioterapia. (MITRAGOTRI et al., 1995; ASANO et al., 1997); e (ii) a sonoforese de baixa frequência (LFU), de 20 a 100 kHz (UEDA; SUGIBAYASHI; MORIMOTO, 1995; FANG et al., 2000; BOUCAUD et al., 2001; MORIMOTO et al., 2005), que é o tipo de sonoforese mais estudado como método promotor de absorção cutânea (POLAT et al., 2011a, 2011b).

A causa da perturbação da pele durante o tratamento sonoforético tem sido principalmente atribuída ao processo de cavitação inercial, o qual é influenciado, além da frequência, pela intensidade de aplicação do ultrassom, ciclo de trabalho, distância entre a sonda do ultrassom e a pele, tempo de aplicação e meio de acoplamento (Tabela 1) (MITRAGOTRI, 2000; TERAHARA et al., 2002; MITRAGOTRI; KOST, 2004; POLAT; BLANKSCHTEIN; LANGER, 2010).
Tabela 1 - Variáveis, além da frequência, que podem ser alteradas para modular a permeabilização da pele na sonoforese.

Intensidade	É proporcional a amplitude de vibração da fonte ultrassônica. A intensidade de aplicação do ultrassom para tratamentos sonoforéticos pode variar de poucos mW/cm ² até 50 W/cm ² (MITRAGOTRI et al., 1995; ASANO et al., 1997; WEIMANN; WU, 2002; BAJI et al., 2018);
Ciclo de trabalho	Também definido como a proporção de tempo do ultrassom no modo <i>on</i> em relação ao tempo total de tratamento. Os ciclos de trabalhos mais comumente usados são 10 % (0,1 s <i>on</i> e 0,9 s <i>off</i>), 50% (5 s <i>on</i> e 5 s <i>off</i>) ou 100% (aplicação contínua). O modo pulsátil de aplicação do ultrassom em ciclos <i>on</i> e <i>off</i> é usado com a finalidade de reduzir os efeitos térmicos associados ao ultrassom, já que permite algum tempo para a dissipação do calor do meio de acoplamento durante o tratamento (ASANO et al., 1997; BOUCAUD et al., 2001; TERAHARA et al., 2002; ALVAREZ-ROMÁN et al., 2003; HERWADKAR et al., 2012; HUANG et al., 2015; BAJI et al., 2018)
Distância entre a pele e a sonda	Esse parâmetro pode variar de 0 mm, isto é, da sonda em contato direto com a pele, até 4.0 cm.
do ultrassom	Entretanto, as distâncias mais comumente utilizadas variam entre 0,3 cm a 1,0 cm (JOHNSON et al.,
	et al., 2018).
Duração da aplicação	Geralmente, a aplicação do ultrassom varia de poucos segundos até alguns minutos, mas pode haver aplicação por horas a até poucos dias até que o equilíbrio de penetração e distribuição do fármaco (ou <i>stady state</i>) seja alcançado (ASANO et al., 1997; FANG et al., 2000; HERWADKAR et al., 2012; HUANG et al., 2015).
Meio de acoplamento	Algumas variáveis relacionadas ao meio de acoplamento, como a presença e concentração de tensoativos, viscosidade, tensão superficial, densidade e impedância acústica, podem desempenhar um papel importante na extensão da elevação da permeabilidade da pele. O próprio meio de acoplamento pode conter o fármaco ou um promotor químico de penetração (JOHNSON et al., 1996; POLAT et al., 2011b; HUANG et al., 2015; PEREIRA; RAMOS; LOPEZ, 2017).

2.3.1. Diferenças entre os protocolos de tratamento sonoforético da pele e seus mecanismos

A administração de fármacos através da pele pode ser realizada usando sonoforese sob dois protocolos (Figura 5):

- a) Simultaneamente (definido neste trabalho como tratamento sonoforético simultâneo ou sonoforese simultânea) quando o fármaco é incorporado ao meio de acoplamento ou quando a formulação contendo o fármaco funciona como meio de acoplamento (Figura 5A). Nesse protocolo, o ultrassom, geralmente o de alta frequência, é aplicado durante todo o período de tratamento (MITRAGOTRI; KOST, 2004).
- b) Pré-tratamento quando o ultrassom, mais usualmente o LFU, é aplicado ao meio de acoplamento previamente a aplicação do fármaco (Figura 5B). A formulação que contém o fármaco é colocada em contato com a pele pré-tratada e o fármaco permeia a pele passivamente, principalmente através das regiões de transporte localizadas (LTRs) criadas pelo LFU. O protocolo pré-tratamento costuma ser mais utilizado do que o tratamento simultâneo devido a duração reduzida de aplicação do ultrassom para a permeabilização da pele, de apenas poucos segundos, seguido pela permeação transdérmica sustentada do fármaco (MITRAGOTRI; KOST, 2004).

Figura 5. Representação esquemática do tratamento sonoforérico da pele: A) Simultâneo e B) Pré-tratamento.



A) Tratamento simultâneo



Fonte: autoria própria

2.3.2 Sonoforese de alta e baixa frequência

Na sonoforese de alta frequência, as microbolhas derivadas da cavitação possuem raio na ordem de menos de 1 µm, que é comparável à espessura das bicamadas lipídicas do estrato córneo. Isso sugere que a cavitação ocorra majoritariamente dentro do estrato córneo, principalmente nos espaços que se formam entre conjuntos de corneócitos (espaços lacunares), e nos apêndices cutâneos (hastes dos folículos pilosos e glândulas sudoríparas) (POLAT et al., 2011b, 2012a). Além da cavitação acústica, o efeito térmico e o transporte convectivo induzido pelo ultrassom também podem contribuir com o transporte sonoforético de fármacos pelo aumento da partição e mobilidade molecular no estrato córneo na sonoforese de alta frequência (MITRAGOTRI et al., 1995; POLAT et al., 2011b).

Historicamente, os tipos mais comuns de fármacos administrados topicamente com a sonoforese de alta frequência são os anti-inflamatórios esteroidais tópicos para dores articulares, como cortisol, dexametasona ou predinisolona, e nos últimos anos, os anti-inflamatórios não-esteroidais orais (AINES) orais, como diclofenaco, ibuprofeno, cetoprofeno, cetoralaco, nimesulida e piroxicam. Essa tendência recente da associação da sonoforese de alta frequência com AINES visa a eliminação dos efeitos adversos gastrointestinais apresentados por essa classe de fármacos quando administrados oralmente. como náuseas. azia. inflamação úlceras е gastrointestinais, snagramente gastrointestinal, doença inflamatória intestinal e colite inespecífica. Assim, além de aumentar a eficácia de ação desses fármacos com sua administração tópica no local específico que devem atuar, a utilização da sonoforese de alta frequência também leva a a redução de graves efeitos colaterais sistêmicos

dos AINES. Apesar da sonoforese de alta frequência ter um efeito benéfico no aumento da penetração desses fármacos em relação a permeação passiva, é provável que continue sendo empregada como um método viável apenas para penetração de fármacos com baixa massa molecular (<1000 Da), ligeiramente hidrofóbicos, visando o tratamento de doenças inflamatórias localizadas como artrite, reumatismo e lesões musculares e de tendões (POLAT et al., 2011b).

Diferentemente da sonoforese de alta frequência, uma enorme variedade de fármacos podem ser administrados tópica e transdermicamente com o LFU, incluindo fármacos hidrofílicos (com coeficiente de partição Ko/a negativo), hidrofóbicos (Ko/a positivo), de baixa massa molecular (< 1000 Da), alta massa molecular (≥ 1000 Da) e até nanopartículas de tamanhos nano e micrométricos. Na sonoforese de baixa frequência (LFU), a cavitação acústica também é o mecanismo primário que induz o aumento da permeabilidade da pele a fármacos, sendo ela capaz de aumentar o transporte de fármacos através da pele em até 1000 vezes em relação à sonoforese de alta frequência (MITRAGOTRI; BLANKSCHTEIN; LANGER, 1996). Dessa forma, o advento da sonoforese com LFU realmente aumentou tanto o tipo como a extensão da administração tópica de farmacos a níveis terapêuticos, em comparação com a sonoforese de alta frequência.

Entretanto, LFU é capaz de gerar microbolhas de cavitação com diâmetro maiores (entre 100 e 150 µm) do que o ultrassom de alta frequência e a permeabilização do estrato córneo parece acontecer sobre a pele por meio do colapso assimétrico das bolhas de cavitação, com formação de microjatos ao colidirem contra a superfície da pele (WOLLOCH; KOST, 2010). Esses fenômenos causariam a maior perturbação da estrutura da pele com o LFU, com formação de regiões altamente permeabilizada sobre a pele, denominadas regiões localizadas de transportes. Assim, o LFU é capaz de promover a permeação de uma variedade de fármacos hidrofílicos tanto de baixa como de alta massa molecular, com a possibilidade de liberação tanto local quanto sistêmica de fármacos (POLAT; BLANKSCHTEIN; LANGER, 2010).

2.3.3 O ultrassom de baixa frequência e as regiões localizadas de transporte na pele

Estudos conduzidos com LFU mostraram que a cavitação inercial, a qual ocorre no meio de acoplamento durante a aplicação do LFU, aumenta a

permeabilidade da pele de forma heterogênea, levando a formação das regiões localizadas de transporte (LTRs).

As LTRs são canais ou poros tortuosos, de caráter hidrofílico, com tamanho micrométrico onde ocorre uma alta desorganização ou perturbação do estrato córneo da pele induzida pela ação do LFU (Figura 6). Pelas LTRs íons, fármacos e sistemas nanoparticulados podem adentrar a pele e ganhar acesso a circulação sistêmica. É provável que tais canais transientes também sejam formados em toda a extensão da epiderme viável e derme (WEIMANN; WU, 2002; PALIWAL; MENON; MITRAGOTRI, 2006; POLAT; BLANKSCHTEIN; LANGER, 2010; POLAT et al., 2011a, 2012a).

Figura 6. Representação esquemática das regiões localizadas de transporte (LTRs) formadas pela aplicação do LFU na pele.





As LTRs se distribuem de forma heterogênea na pele, mas seu padrão pode ser alterado em função das características do meio de acoplamento (PEREIRA; RAMOS; LOPEZ, 2017). Em experimentos usando marcador específico para corar as LTRs, quando o meio de acoplamento era constituído apenas por água, houve a formação de uma única LTR na área imediatamente abaixo do transdutor (TEZEL et al., 2001; TANG et al., 2002). Por outro lado, quando o meio de acoplamento era composto por 1% de lauril sulfato de sódio (SLS) (m/v), tratamento este conhecido hoje como LFU/SLS, as LTRs formadas variaram bastante em número, distribuição e localização entre as amostras, recobrindo de 5 a 25% da área da superfície da pele (TEZEL et al., 2001, 2002; KUSHNER IV; BLANKSCHTEIN; LANGER, 2004, 2008a).

Mitragotri e colaboradores mostraram que o LFU/SLS aumentou a permeabilidade do manitol na pele em 200 vezes após 90 min de tratamento enquanto que um aumento de aproximadamente 77 vezes foi observado com o LFU sozinho. Os autores também observaram que a densidade de energia mínima requerida para causar perturbação na pele reduzia de 141 J/cm² para 18 J/cm² com a inclusão do SLS no meio de acoplamento. Além disso, essa desestruturação da pele aumentou proporcionalmente com o aumento da concentração de SLS (a qual variou de 0 a 1% (m/v)), com o tempo de aplicação do ultrassom e com a diminuição da frequência do ultrassom (MITRAGOTRI, 2000).

Ademais, não só a concentração, mas o tipo de tensoativo influencia a permeabilidade da pele com LFU. Tezel e colaboradores estudaram o sinergismo entre LFU de 20 kHz e vários tensoativos de diferentes cargas (aniônicos, catiônicos e não-iônicos) e tamanhos de cadeias carbônicas lineares (de 8 a 16 carbonos). Para o favorecimento do efeito sinérgico do LFU com tensoativos, os resultados mostraram que os tensoativos iônicos foram os mais efetivos em aumentar a permeabilidade da pele e que o comprimento ótimo da cadeia de hidrocarbonetos dos tensoativos foi o de 12 carbonos (TEZEL et al., 2002).

Usando o LFU/SLS, as LTRs se mostram aproximadamente 80 vezes mais permeáveis do que as regiões que contornam as LTRs, chamadas de não-LTRs. Corroborando esse aumento de permeabilidade, a resistividade elétrica da pele nas LTRs é cerca de 5000 vezes menor do que a resistividade elétrica encontrada nas não-LTRs. Mas a resistividade elétrica das não-LTRs também é menor, 170 vezes, do que a resistividade da pele sem tratamento com LFU. Sendo assim, as não-LTRs são mais permeáveis do que a pele intacta. Dessa forma, a inclusão de tensoativos como promotores químicos no meio de acoplamento durante o tratamento da pele com LFU resulta no aumento da permeabilidade da pele em dois níveis, maior nas LTRs e menor, mas ainda maior do que na pele não tratada, nas não-LTRs (KUSHNER IV; BLANKSCHTEIN; LANGER, 2004).

O aumento da permeabilidade da pele nas LTRs mantem uma estreita relação com o tamanho das microbolhas de cavitação, que por sua vez, dependem da frequência do ultrassom. De forma geral, quanto menor a frequência do ultrassom, maiores as bolhas de cavitação e maior o impacto dos microjatos na superfície da pele quando essas bolhas colapsam. Por outro lado, as não-LTRs parecem ser independentes do fenômeno de cavitação e o aumento da permeabilidade nessas áreas está relacionado a penetração do tensoativo pela convecção induzida pelo LFU (POLAT et al., 2011b, 2011a, 2012b).

Sendo assim, o principal mecanismo relacionado ao sinergismo observado entre o LFU/SLS parece ser a capacidade do LFU em aumentar a concentração e dispersão do tensoativo dentro do estrato córneo num curto período de aplicação (MITRAGOTRI, 2000; MITRAGOTRI; KOST, 2004; POLAT et al., 2011b). Dentro do estrato córneo, o promotores de permeação químico, no caso o SLS, aumenta a fluidez e diminui a organização dos lipídios da matriz lipídica, diminui a tortuosidade do estrato córneo e aumenta o coeficiente de difusão da pele. Na presença do LFU, o SLS aumenta ainda o coeficiente de difusão do meio de acoplamento para a pele (POLAT; BLANKSCHTEIN; LANGER, 2010; POLAT et al., 2011a, 2011b, 2012b).

Dessa forma, tem sido demonstrado que o tempo de tratamento e a densidade de energia requerida para induzir uma desorganização significante na pele são diminuídos por cerca de uma ordem de magnitude quando o SLS é associado ao LFU (MITRAGOTRI, 2000; 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.

Resumidamente, o pré-tratamento da pele com LFU/SLS apresenta duas características importantes:

- (i) o transporte heterogêneo;
- (ii) o sinergismo do LFU com o tensoativo promotor da penetração.

A relação existente entre cavitação acústica, que ocorre no meio de acoplamento com o LFU, e a formação das LTRs tem levado a estudos de modificações no meio de acoplamento visando a maior homogeneidade de distribuição das LTRs. Usando hidrogéis semi-sólidos como meio de acoplamento, Pereira, Ramos e Lopez (2017) mostraram um aumento de pelo menos três vezes na porcentagem de LTRs formadas após aplicação do LFU quando comparada ao tratamento tradicional com SLS (PEREIRA, 2015; PEREIRA; RAMOS; LOPEZ, 2017). Além disso, os autores demonstraram que alterações no potencial zeta do gel

de acoplamento modificavam as interações do fármaco com o estrato córneo, alterando a penetração cutânea do fármaco. Especificamente, o pré-tratamento da pele com LFU usando um gel catiônico como meio de acoplamento reduziu a penetração cutânea subsequente da doxorrubicina na sua forma catiônica. Por outro lado, o uso de gel de acoplamento aniônico aumentou significativamente sua penetração e acúmulo no estrato córneo. Dessa forma, a associação de géis com o LFU pode simultaneamente aumentar a extensão de permeabilidade da pele e entregar fármacos ionizados para camadas específicas da pele, dependendo do potencial zeta do gel.

As alterações provocadas na pele pelo uso de géis semi-sólidos como meio de acoplamento do LFU são justificadas em função da (i) menor taxa de dissolução das microbolhas de cavitação em virtude das maiores viscosidade e tensão interfacial do gel, que quando colapsam possivelmente geram microjatos de maior energia e causam maior perturbação a pele e pela (ii) alteração das características do estrato córneo com a penetração dos componentes do próprio gel de acoplamento, que alteram a partilha e difusão do fármaco na pele (PEREIRA, 2015; PEREIRA; RAMOS; LOPEZ, 2017).

2.3.4 Estudos clínicos com o LFU objetivando a ação tópica de fármacos

O LFU tem sido avaliado como método promotor da penetração de fármacos na pele em estudos em humanos (MARUANI et al., 2010a, 2010b). Maruani et al. (2010) estudaram a penetração cutânea da histamina sob influência do LFU para investigar seu potencial no tratamento tópico de alergias. Os parâmetros de aplicação do ultrassom utilizados no estudo foram: LFU de 36 kHz, intensidade de 2,72 W/cm² ou 3,50 W/cm², no modo pulsátil, solução de NaCl 0,9% (m/v) como meio de acoplamento, com distância entre a sonda e a pele de 5 mm e duração de aplicação de 5 min. Os autores observaram a formação de pápula na pele dos participantes que receberam a aplicação do LFU, evidenciando a penetração da histamina. As medidas ecográficas após a aplicação do LFU foram realizadas após 30 min, 2 h e 24 h do tratamento. Os resultados mostraram que não houve formação de pápula após o simples contato da solução de histamina com a pele, ao passo que 9/10 dos participantes tratados com LFU apresentaram pápulas na pele, cujo tamanho aumentou, mas não significativamente, com o aumento da intensidade do

LFU de 2,72 W/cm² para 3,50 W/cm². Também foi verificado que a espessura da pele aumentou e prurido ocorreu em 7/10 indivíduos que receberam a aplicação do LFU. Alguns efeitos adversos durante a sonoforese com LFU foram reportados no estudo, como eritema cutâneo, que pode estar relacionado com a reação desencadeada pela própria histamina, dor (cujo *score* variou bastante entre os indivíduos) e zumbido. Entretanto, dor e zumbido cessaram no momento que o tratamento sonoforético foi finalizado (MARUANI et al., 2010b).

No mesmo ano, Maruani et al. (2010) também avaliaram a eficiência do LFU no aumento da vasoconstrição promovida pela penetração de esteroides tópicos em um estudo cego, randomizado em humanos. Os parâmetros de aplicação do ultrassom utilizados foram LFU de 36 kHz, intensidade de 2,72 W/cm², no modo pulsátil (2 s on e 5 s off), solução de NaCl 0,9% (m/v) como meio de acoplamento, com distância entre a sonda e a pele de 5 mm e duração de aplicação de 5 min. Um creme de 17-valerato de betametasona foi aplicado após o tratamento sonoforético ou não. A diferença na cor da pele entre os antebraços dos participantes foi medida por valores de scores dados a partir da análise por um cromômetro e da análise clínica por um médico dermatologista. Os resultados mostraram que a vasoconstrição foi significativamente maior quando o esteroide foi aplicado após o LFU quando comparado com o grupo que não recebeu a aplicação do LFU. Os autores também verificaram que a vasoconstrição aumentou com o aumento do tempo e que a oclusão por 2 horas da área forneceu maiores scores de vasoconstrição do que a oclusão por 1 h ou massagem. Dessa forma, o prétratamento da pele com LFU usando salina como meio de acoplamento, seguido da aplicação do creme e oclusão da área por 2 h mostrou um efeito sinergético no aumento da eficiência do esteroide tópico por conta da maior permeabilização da pele decorrente da ação do LFU (MARUANI et al., 2010a).

2.3.5 Transporte sonoforético de sistemas nanoparticulados com LFU

O transporte sonoforético de nanopartículas mediada pelo LFU representa uma promissora área de pesquisa, em que ambas as estratégias podem ser usadas para direcionar a liberação de fármacos. Diversos trabalhos tem mostrado a capacidade do LFU de permitir a penetração de nanopartículas no estrato córneo, a barreira primária da pele, na epiderme viável e na derme. Tem sido demonstrado, no entanto, que certas características físico-químicas dos sistemas nanopartículados, como tamanho e carga superficial, podem influenciar a penetração sonoforética desses carreadores e da consequente liberação do fármaco e permeação através da pele tratada com LFU.

Weimann e Wu (2002) estudaram a penetração sonoforética com LFU no modo simultâneo de micropartículas com tamanho entre 1 e 140 µm. Os autores observaram que micropartículas rígidas com tamanho menor que 25 µm penetraram na epiderme, mas não as partículas maiores. Esse resultado sugere que o tamanho dos canais ou poros formados com a aplicação do LFU na pele seria menor ou igual a 25 µm. Também foi verificado que a condutância da pele aumentou com a penetração das micropartículas entre 1 e 25 µm. Esse resultado indica o fluxo livre de íons e micropartículas através das LTRs formadas. Por outro lado, micropartículas com tamanho maior que 25 µm não penetraram na pele e não alteraram sua condutância com o tratamento com o LFU simultâneo. Os autores propuseram que essas micropartículas (> 25 µm) podem ter se acumulado sobre a pele, causando a interrupção do próprio fluxo transdérmico de íons presentes no meio de acoplamento. Mais tarde, Paliwal, Menon e Mitragotri (2006), usando quantum dots como partícula fluorescente, estudaram os efeitos estruturais do LFU sobre a pele e observaram que a penetração sonoforética dos mesmos era altamente heterogênea e coincidiam com as LTRs. Em uma escala microscópica, os resultados de microscopia fluorescente mostraram que essas regiões permeáveis marcadas com os quantum dots possuíam cerca de 40 a 80 µm de largura e profundidade de até 60 µm. Também foi possível visualizar LTRs com 100 nm de largura e 300 nm de profundidade. Resultados semelhantes foram encontrados por Lee et al. (2010), usando microscopia eletrônica de varredura, em que poros de até 2 µm foram observados na superfície dos corneócitos após 5 min de aplicação do LFU.

Lopez et al. (2011) mostraram que o tratamento da pele com LFU aumentou a penetração de quantum dots (10 e 20 nm) catiônicos, aniônicos e neutros *in vitro* em pele de suínos. Os autores encontraram que, apesar do residual de carga negativa da pele, o *quantum dot* mais positivamente carregado não foi o que penetrou em maiores quantidades. Este resultado é sugestivo de que um valor ótimo de carga positiva parece ser requerido para a penetração sonoforética desse sistema nanoparticulado. Observaram ainda a presença de *quantum dots* na derme,

corroborando com outros trabalhos que sugerem que os canais que foram as LTRs alcançam a derme, tomando toda a extensão da pele.

Recentemente, o tratamento da pele com LFU tem sido bastante estudado em associação com dendrímeros. Huang et al. (2015) mostraram, *in vitro* em pele de camundongos, que a combinação entre dendrímeros de poli(amidoamina) (PAMAM) e a sonoforese de baixa frequência aumentou a quantidade de diclofenaco permeada em um fator de 3,6 quando comparada com a permeação sem influência do LFU. Manikkath et al. (2017b) verificaram que a associação entre LFU/dendrímeros de PAMAM administrados topicamente em ratos forneceu concentrações de cetoprofeno no plasma semelhantes àquelas quando administradas oralmente. Os autores também verificaram que o pré-tratamento com o dendrímero no meio de acoplamento, seguido da aplicação do fármaco, permitiu que mais fármaco atravessasse a pele do que o tratamento simultâneo do dendrímero com o fármaco.

Outros estudos tem mostrado a aplicação de lipossomas na veiculação sonoforética de fármacos através da pele. Kasetvatin (2015) avaliaram a utilização de lipossomas elásticos (de tamanho entre 607 a 861 nm e carga superficial negativa) e do LFU simultâneo para a administração tópica de ácido hialurônico. Os resultados mostraram que a combinação entre LFU e lipossoma resultou em um efeito sinérgico, verificado pelo aumento de 6,4 vezes na permeação do ácido hialurônico contra um aumento de 2,1 vezes após o tratamento LFU/ácido hialurônico livre. Os autores também verificaram que a permeação do fármaco diminuiu com o aumento da quantidade de colesterol usada na composição dos lipossomas e ressaltaram a importância de suas características de flexibilidade, que favoreceria a contração desse sistema nanoparticulado pelos canais diminutos das LTRs.

Dahlan, Alpar e Murdan (2009) estudaram a permeação do antígeno de soro bovino associado ou não a lipossomas (80 nm) no modo de pré-tramento sonoforético da pele, usando LFU/SLS. Uma redução na permeação do antígeno de soro bovino foi verificada quando o antígeno foi encapsulado nos lipossomas em comparação com a permeação da substância na sua forma livre. Essa redução foi explicada com base nas prováveis interações entre lipossoma e pele: devido a sua biocompatibilidade, os lipossomas adsorvem e/ou fundem na pele, repondo os lipídios dela extraídos pela sonicação. Essa restauração dos lipídios da pele e reparo das LTRs explicaria a menor permeação sonoforética transdérmica do antígeno de soro bovino.

A Tabela 2 mostra os sistemas nanoparticulados associados a sonoforese de baixa frequência reportados na literatura até o momento.

Sistema	Fármaco	Frequência	Intensidade ou	Referências
nanoparticulado		(kHz)	amplitude	
Dendrímeros peptídicos	cetoprofeno	20	7-8 W/cm ²	(MANIKKATH et al., 2017b; HEGDE et al.,
				2017))
Dendrímeros de PAMAM	cetoprofeno	20	7-8 W/cm ²	(MANIKKATH et al., 2017b)
Dendrímeros de PAMAM	diclofenaco	20	Não informado	(HUANG et al., 2015)
Lipossomas peguilados	limoneno e galantamina	20	1,90 W/cm ²	(KASETVATIN; RUJIVIPAT;
				TIYABOONCHAI, 2015)
Lipossomas peguilados	fluoresceína de sódio e	20	1,90 W/cm ²	(RANGSIMAWONG et al., 2015)
	D-limoneno			
Lipossomas elásticos	Ácido hialurônico	20	Amplitude de 40%	(KASETVATIN; RUJIVIPAT;
				TIYABOONCHAI, 2015)
Lipossomas	Albumina de soro bovino	20	Amplitude de 30%	(DAHLAN; ALPAR; MURDAN, 2009)
Lipossomas	si-RNA	20	Amplitude de 10-30%	(TRAN et al., 2008)
Microparticulas	-	20	19 W/cm ²	(WEIMANN; WU, 2002)
Nanopartículas de ouro	-	20	7,5 W/cm ²	(SETO et al., 2010)
Nanopartículas de óxido	-	25	0,8 W/cm ²	(LEE et al., 2010)
de ferro				
Quantum dots	-	20	7,5 W/cm ²	(SETO et al., 2010; LOPEZ et al., 2011)
			2,4 W/cm ²	(PALIWAL; MENON; MITRAGOTRI, 2006)
Nanopartículas sólidas	testosterona	20	2,5 – 5,0 W/cm ²	(EL-KAMEL; AL-FAGIH; ALSARRA, 2008)
lipídicas				
Nanopartículas	lindocaína	28	8 W/cm ²	(GOU et al., 2009)
poliméricas				

Tabela 2 - Sistemas de liberação de fármacos nanoparticulados estudados em associação com o LFU para a administração tópica.

2.4 Terapia sonodinâmica (TSD)

A TSD é uma modalidade de tratamento para o câncer que começou a ser estudada recentemente, a qual induz a morte tumoral pela interação entre o ultrassom e um agente sonossensibilizante. Conceitualmente, acredita-se que o mecanismo de ação da TSD seja bastante similar ao mecanismo da TFD, a qual conta com a luz, no lugar do ultrassom, para ativar um agente fotossensibilizante. A TSD apresenta algumas vantagens em relação a TFD, como (i) efeito mecânico do ultrassom sobre as células, o qual pode promover a permeabilização celular ou sonoporação, danos celulares ou até lise celular, e o (ii) alto poder de penetração das ondas ultrassônicas, que pode ser de até 10 cm em tecidos moles, dependedendo da frequência do ultrassom (COSTLEY et al., 2015; PANG et al., 2016).

A potencialidade da TSD para o tratamento de tumores foi evidenciada pela primeira vez em 1989 por Yumita et al. (1989), que observaram os efeitos citotóxicos da hematoporfirina sob irradiação acústica. Em 1990, foi demonstrado o efeito in vivo da TSD pelo mesmo grupo (YUMITA et al., 1990) e, apenas em 1992, Umemura et al. cunharam a terminologia "sonodinâmica" para descrever o efeito tóxico da porfirina sob ativação acústica (UMEMURA et al., 1992). No ano seguinte, em 1993, observou-se que a geração de oxigênio singleto era um dos prováveis responsáveis pela atividade citotóxica da TSD (UMEMURA; YUMITA; NISHIGAKI, 1993). Após esses marcos iniciais, o número de estudos envolvendo a TSD aumentou exponencialmente nos últimos 30 anos. A literatura científica está repleta de trabalhos cujo os objetivos visam: elucidar os possíveis mecanismos de ação da TSD; desenvolver novas moléculas para a TSD; testar e comparar a aplicação de fármacos já existentes como agentes sonossensibilizantes; desenvolver plataformas nanoestruturadas para veiculação dos agentes sonossensibilizantes; investigar a influência desses sistemas nanoparticulados na TSD; e investigar os benefícios terapêuticos da associação da TSD com outras estratégias terapêuticas existentes como a quimioterapia, a imunoterapia, a TFD e outras para o combate do câncer (HARADA et al., 2011, 2013; NOMIKOU et al., 2012, 2017; MCEWAN et al., 2014, 2015, 2016a; WANG et al., 2015b; HUANG et al., 2017; CANAVESE et al., 2018; ZHANG et al., 2018; YUE et al., 2019; LOGAN et al., 2019). Até o momento, o número de estudos clínicos em humanos reportados na literatura sobre o uso da

TSD ainda é bastante limitado, os quais estudaram a TSD como uma terapia adjunta à TFD e à imunoterapia em casos de câncer de mama (WANG et al., 2009; INUI et al., 2014, 2016).

2.4.1 Mecanismos da TSD

2.4.1.1 Geração de ROS e radicais livres na TSD

Embora os mecanismos de sonoativação ainda não tenham sido completamente compreendidos, a efetividade da TSD tem sido demonstrada tanto *in vitro* como *in vivo*. Admite-se que os efeitos biológicos promovidos pelo ultrassom na TSD são predominantemente subjacentes ao fenômeno de cavitação acústica tanto do tipo inercial como estável. Sua ação antitumoral deriva dos efeitos mecânicos e/ou sonoquímicos do ultrassom sobre as células tumorais (ROSENTHAL; SOSTARIC; RIESZ, 2004; TRENDOWSKI, 2014, 2015a), causando a morte celular principalmente pelo mecanismo de apotose (BAI; SHEN; HU, 2012; SU et al., 2015; WAN et al., 2016; JIA et al., 2017; RENGENG et al., 2017). A TSD pode ainda potencialmente estimular o sistema imunológico contra suas células tumorais de origem e ser vantajosa no caso de tumores mais agressivos (TRENDOWSKI, 2015b; CHEN et al., 2017a; ZHANG et al., 2018).

Didaticamente, os efeitos da TSD foram divididos em quatro categorias distintas, mas assume-se que todos ou parte deles aconteçam de forma simultânea, no momento da irradiação do ultrassom na presença do agente sonossensibilizante:

a) Efeitos mecânicos do ultrassom

A cavitação acústica envolve a nucleação e o crescimento de microbolhas de gás no ambiente aquoso irradiado com o ultrassom. Nesse fenômeno, essas microbolhas podem oscilar em torno de um diâmetro de bolha, fenômeno conhecido como cavitação estável, movimentando o meio (*streaming*), como também podem crescer e se expandir para além do seu tamanho de ressonância até seu colapso violento (cavitação inercial), gerando ondas de choque e aumento da temperatura e pressão local. Admite-se que esses efeitos são capazes de causar danos no citoesqueleto e na membrana da célula e, como resultado, morte celular. Ademais, a cavitação acústica, tanto do tipo estável quanto inercial, também induz a permeabilização das membranas celulares e tecidos tumorais, o que aumenta a entrada de fármaco nos tecidos e células-alvo (ROSENTHAL; SOSTARIC; RIESZ, 2004;

TRENDOWSKI, 2014; COSTLEY et al., 2015; WOOD; SEHGAL, 2015; RENGENG et al., 2017; CANAVESE et al., 2018; PAN et al., 2018).

b) Efeitos sonoquímicos via radicais hidroxila

A cavitação inercial é um processo extremamento violento de escala nanométrica, com duração de microsegundos, o qual pode resultar na pirólise do vapor de água dentro da microbolha de cavitação, gerando radicais hidroxila reativos e átomo de hidrogênio. Os radicais hidroxila formados podem causar danos diretos e indiretos às células tumorais, pela reação com moléculas endógenas ou com as moléculas do sonossensibilizante, causando efeitos biológicos através da formação de compostos reativos com tempo de meia-vida longo (ROSENTHAL; SOSTARIC; RIESZ, 2004; TRENDOWSKI, 2014; PAN et al., 2018).

c) Efeitos sonoquímicos via pirólise do agente sonossensibilizante

Um segundo mecanismo também é baseado no processo da pirólise. A extrema elevação da temperatura e pressão no microambiente durante o colapso das bolhas acústicas tem a capacidade de quebrar molécula do sonossensibilizante, gerando radiais livres. Tais espécies radicalares tem o potencial de causar danos celulares diretos ou reagir com subtâncias endógenas, formando outras espécies reativas também danosas à célula (ROSENTHAL; SOSTARIC; RIESZ, 2004; TRENDOWSKI, 2014; COSTLEY et al., 2015; GENG et al., 2018; PAN et al., 2018).

d) Efeitos sonoquímicos via geração de oxigênio singleto

Além das elevadas pressões e temperaturas locais associadas com a implosão das microbolhas acústicas, o processo de cavitação inercial também acompanhado pela emissão de flashes de pode ser luz (ou sonoluminescência), cujo espectro de emissão pode abranger comprimentos de onda em toda a faixa do ultravioleta e do visível. Particularmente acreditase que a sonoluminescência também desempenhe um papel importante na geração de ROS na TSD uma vez que a maioria dos sonossensibilizantes são os agentes fotossensibilizantes usados na TFD. Dessa forma, é hipotetizado que os mecanismos de sonoativação desses fármacos na TSD sejam semelhantes aos da TFD: a energia liberada pela cavitação inercial ativa os sonossensibilizadores para o estado excitado e, à medida que esse sensibilizante regressa ao estado fundamental, a energia é transferida para o

oxigênio circundante para a produção de ROS e radicais livres, com consequente morte celular (ROSENTHAL; SOSTARIC; RIESZ, 2004; TRENDOWSKI, 2014; COSTLEY et al., 2015; WAN et al., 2016; GENG et al., 2018; PAN et al., 2018).

Uma vez geradas pela ativação sonodinâmica do agente sonossensibilizante (por uma ou pela combinação das vias sonoquímicas), as ROS e radicais livres produzidos podem causar a peróxidação lipídica da membrana plasmática, tornando a célula ainda mais frágil ao efeito mecânico do ultrassom e mais permeável à entrada do sonossensibilizante na célula, o que acentuaria ainda mais a morte celular sonodinâmica.

2.4.1.2 Indução da apoptose na TSD

A maioria dos estudos tem demonstrado que a morte celular por apoptose parece ser o principal mecanismo de morte mediada pela TSD (DAI; HU; WU, 2009; CHEN et al., 2012; DAI et al., 2014; ENDO et al., 2015; JIA et al., 2017; ZHANG et al., 2018), embora outros trabalhos também considerem a necrose (CHEN et al., 2013; YUE et al., 2019).

A apoptose pode ser sonodinamicamente induzida pela produção excessiva de ROS e redução do potencial de membrana mitocondrial. Tem sido demonstrada a expressão diminuída dos níveis do fator anti-apoptótico Bcl-2 e a expressão elevada do fator pro-apoptótico BAX em experimentos *in vitro* e *in vivo* usando a TSD. A translocação do citocromo-c e clivagem das caspases 9, 3 e PARP também foram observadas, confirmando o envolvimento da via de apoptose dependente de caspase na TSD (LI et al., 2014; SU et al., 2014; YANG et al., 2015; ZHENG et al., 2016). Ainda, a TSD pode induzir apoptose pelo acúmulo celular de íons cálcio, o qual pode alterar o potencial de membrana mitocondrial, culminando na liberação do citocromo-c e fatores pró-apoptóticos e apoptose celular (LI et al., 2011; DAI et al., 2014; HAO et al., 2014).

2.4.1.3 Imunidade anti-tumoral

A TSD pode promover a conversão dos macrófagos M2 (que secretam citocinas anti-inflamatórias) em macrófagos M1 (que secretam citocinas pró-inflamatórias), o que melhoraria a imunidade antitumoral. Em animais tratados com a TSD e ácido 5-aminolevulínico, a proporção de macrófagos com fenótipo CD68

(marcador de macrófagos M1) foi significativamente maior do que o grupo controle, ao passo que a proporção de macrófagos com fenótipo CD163 (marcador de macrófagos M2) foi expressivamente menor (WANG et al., 2014).

A maturação das células dendríticas no tumor é outra resposta à TSD relacionada a melhora da imunidade contra o tumor, além do aumento dos níveis de INF-γ e TNF-α no tumor (WANG et al., 2014). Além disso, a TSD pode conter a angiogênese tumoral como mostrado por Gao et al. (2013).

Recentemente, Zhang et al. (2018) mostraram que a TSD com um derivado da hematoporfirina (HiPorfin) como agente sonossensibilizante matou as células tumorais, promoveu a expressão de calreticulina na superfície da célula e elicitou respostas imunes tumorais. Assim, a TSD induziu uma vacinação antitumoral funcional e efeitos abscopais nos animais tratatos sonodinamicamente. Baseados nos estudos em que um segundo tumor foi novamente induzido em animais que foram curados de um primeiro tumor implantado, os autores concluiram que a TSD pode conferir memória imunológica, a qual poderia previnir a reincidiva tumoral e reduzir as metástases após a completa eliminação do tumor. Yue et al. (2019) demonstraram que a TSD com lipossomas de hematoporfirina monometil éter e imiquimode em combinação com anti-PD-L1 (um inibidor de pontos de controle) induziu uma resposta antitumoral, que além de reduzir a progressão do tumor primário, também previniu metástasis do tumor para outros orgãos. Os autores também verificaram que a estratégia também foi capaz de conferir memória tumoral imunulógica, a qual foi capaz de proteger contra a recidiva tumoral após sua eliminação.

A Figura 7 resume os principais mecanismos e eventos intracelulares que resultam na morte celular tumoral pela TSD.

Figure 7. Os prováveis mecanismos de ação que geram ROS e radicais livres na terapia sonodinâmica e os principais fenômenos e eventos intracelulares que resultam da irradiação do ultrassom na célula na presença de um agente sonossensibilizante.



Fonte: autoria própria.

A Tabela 3 compila alguns estudos que exemplificam a grande variedade de agentes sonossensibilizantes estudados, os vários parâmetros de configuração de ultrassom avaliados e alguns dos resultados encontrados.

Tabela 3 – Estudos *in vitro* e *in vivo* envolvendo a TSD que evidenciam a variedade de agentes sonossensibilizantes, configurações do ultrassom e os respectivos resultados

Sensibilizante	Via de administração	Métodos e parâmetros do	Resultados	Referências
	ou estudo <i>in vitro</i>	ultrassom		
Epirrubicina em	Injeção intravenosa em	Ultrassom focado de alta	O tratamento foi efetivo e seguro, com	(HORISE et al.,
micelas	cães com tumores	intensidade (HIFU) de	redução tumoral visível ou redução do	2019)
	desenvolvidos	frequência de 1,0 MHz. A	crescimento tumoral e desaparecimento de	
	espontaneamente	intensidade e os pontos de	metástases. Nenhum efeito adverso,	
	(condrosarcoma,	aplicação variaram de acordo	alterações hematológicas ou bioquímica foram	
	ostesarcoma, câncer	com o tamanho e profundidade	observados nos animais tratados.	
	hepatocelular e de	do tumor. Cinco ciclos de		
	próstata)	tratamento sonodinâmico		
Epirrubicina em	Efeitos in vitro em	Ultrassom focado de alta	A TSD causou alterações estruturais	(TAKEMAE et
micelas	células de	intensidade (HIFU) de	significativas na membrana celular das células	al., 2019)
	adenocarcinoma	frequência de 1,09 MHz, 100	decorrente da produção de ROS	
	pancreático humano	W/cm ² de 0 a 3 min		
Indocianina	Efeitos in vitro em	Frequência de 1,0 MHz, ciclo de	A viabilidade celular nos grupos de TSD	(TANG et al.,
verde	sinoviócitos humanos	trabalho de 10% e intensidades	diminuiu significativamente para 73,09 ±	2017)
	de característica	testadas de 0,5 e 1,0 W/cm ²	1,97% para 0,5 W/cm ² e 54,24 ± 4,66% para	
	fibroblástica (linhagem		1,0 W/cm ² , respectivamente. A apoptose	
	MH7A)		celular aumentou significativamente para	
			26,43 ± 0,91% e 45,93 ± 6,17%,	
			respectivamente.	
Hipocrelina B	Efeito <i>in vitro</i> em	Frequência de 1,05 MHz por 60	A taxa de morte celular induzida somente pela	(JIA et al., 2017)
	células de câncer de	s, intensidades de 0,54 e 0,72	exposição ultrassônica foi de 14,26 ± 3,65% e	
	mama MDA-MB-231	W/cm ²	24,91 ± 1,90% para aplicações com	
			intensidades a 0,54 W/cm ² e 0,72 W/cm ² ,	

			respectivamente, mas quando combinada a hipocrelina, a morte celular quase dobrou $(26,05 \pm 2,65\% e 42,69 \pm 3,10\%, com$ intensidades de 0,54 W/cm ² e 0,72 W/cm ² , respectivamente).	
Sinoporfirina de sódio	Efeitos <i>in vitro</i> contra células de hepatocarcinoma	Frequência de 0,84 MHz, intensidades de 0,25, 0,5 e 0,75 W/cm² por 120 s.	Observou-se que o aumento da intensidade do ultrassom foi capaz de causar maior citotoxicidade: com as intensidades de 0,25, 0,5 e 0,75 W/cm ² , a viabilidade celular diminuiu para cerca de 94%, 87% e 81%, respectivamente	(LI et al., 2019)
Hematoporfirina	Injeção intraperitoneal para câncer de mama	Frequência de 150 kHz e 1 MHz simultaneamente nas intensidades de 0,2 e 2 W/cm ² , respectivamente por 30 min	TSD fracionada e repetida em 2, 3 e 4 vezes foram mais efetivas em retardar o crescimento do tumor comparado com a TSD única.	(ALAMOLHODA; MOKHTARI- DIZAJI, 2015)

Pode-se observar na Tabela 3 a carência de estudos que utilizam o LFU na TSD, mas algumas associações com sistema de liberação, no caso dos exemplos citados na Tabela, micelas, são encontradas. Apesar da sua eficácia antitumoral demonstrada pelos estudos reportados na literatura científica, a falta de conhecimento sobre o impacto real causado pelo agente sonossenssibilizante e sistemas de liberação que o carreiem, a falta de padronização das variáveis do ultrassom e a carência de estudos que demonstrem a influência do tipo de tumor na resposta antitumoral são problemas que dificultam a progressão da TSD no cenário clínico atual. Assim, até o momento não se conhece as melhores condições e os regimes de aplicação do ultrassom e o melhor agente sonossensibilizante para o tratamento de tumores ou se essas condições devem ser estudadas particularmente para cada tipo de tumor.

2.4.2 Associação da TSD a outras terapias para o tratamento do câncer

2.4.2.1 Terapia sonofotodinâmica

Como os agentes sonossensibilizantes usados na TSD são os mesmos agentes usados na TFD, o conceito de combinar a TSD com a TFD surge naturalmente e a combinação dessas duas terapias tem sido estudada, sendo comumente denominada como terapia sonofotodinâmica (TSFD) (TZERKOVSKY et al., 2016; YANG et al., 2019).

Após a administração do agente sensibilizante, a TFD e a TSD podem ser realizadas com sucesso, mas a ordem do tratamento parace importar. A maioria dos estudos, então, aplicam a TFD seguida da TSD. Jin et al. (2000) investigaram a TSFD para o tratamento de carcinoma de célula escamosa induzido em ratos usando um derivado molecular da feoforbida-a (PH1126) ou um análogo da gálio porfirina, ATX70. A combinação da aplicação da TFD seguida da TSD usando tanto o PH1126 quanto o ATX70 induziu a redução do crescimento tumoral em até 98%, mostrando o melhor efeito da TSFD quando comparada com as duas estratégias terapêuticas separadas. O tempo de sobrevida dos animais tratados com a TSFD foi também significativamente maior do que nas terapias isoladas, alcançando até 88% de sobrevida após 120 dias após o tratamento com PH1126 (JIN et al., 2000).

Recentemente, El-Kaream et al. reportaram que a aplicação do ultrassom seguida da irradiação da luz na presença de nanopartículas de óxido de grafeno

conjugadas com ácido fólico contendo sonnelux (agente sonofotossensibilizante derivado da clorofila) mostrou ser uma estratégia excelente como uma terapia para o câncer. Os autores verificaram que o ultrassom aplicado no modo pulsátil mostrou maior eficácia terapêutica do que quando aplicado no modo contínuo (ABD EL-KAREAM; ABD ELSAMIE; ABD-ALKAREEM, 2018). Miyoshi et al. (2016) também verificaram um efeito sinérgico na inibição do crescimento tumoral da aplicação da TFD seguida da TSD com ácido 5-aminolevulínico e nanopartículas de TiO₂ em ratos com tumor de câncer de células escamosas da pele (MIYOSHI et al., 2016).

Estudos *in vitro* também tem demonstrado a aplicação benéfica da TSFD contra o câncer. A TSFD resultou numa maior produção de ROS e maior efeito citotóxico do que a TFD e a TSD aplicadas separadamente em células de câncer hepático usando um derivado da rosa bengala como sensibilizante (CHEN et al., 2018). Os efeitos da TSFD também foram estudados em células de câncer de mama murino (4T1). Li et al. 2014 observaram uma inibição expressiva na migração celular, acompanhada de morte celular por apoptose, condensação nuclear e redução do potencial da membrana mitocondrial das células (LI et al., 2014). Resultados similares foram reportados por Wang e colaboradores (2015), que verificaram uma redução da migração celular e declínio da adesão celular em células de câncer de mama humano (MDA-MB-231) tradas com a TSFD (WANG et al., 2015a).

2.4.2.2 Terapia quimiosonodinâmica

A TSD também tem sido estudada em associação com agentes quimioterápicos como a doxorrubicina (SHEN et al., 2015; LOGAN et al., 2019), o paclitaxel (LOGAN et al., 2019), a temozolomida (CHEN et al., 2017a), o imiquimode (YUE et al., 2019), o 5-fluoracil (MCEWAN et al., 2016a; SHENG et al., 2017), inibidores de pontos de controle, como o anti-PD-L1 (YUE et al., 2019) e inibidores glicolíticos, como o da 2-deoxiglicose (XIE et al., 2017).

Em estudos com animais, Sheng et al (2017) desenvolveram microbolhas magnéticas carreando gás oxigênio, funcionalizadas com rosa bengala e 5-fluoracil para o tratamento de câncer de pâncreas. A estratégia da TSD associada com o quimioterápico reduziu a viabilidade celular a valores maiores que 50% e os resultados *in vivo* mostraram a redução de quase 50% do volume tumoral quando comparado com o grupo controle não-tratado. Os autores também verificaram níveis altos de caspases ativadas e da proteína BAX nos animais tratados com as

microbolhas multifuncionalizadas quando submetidas a irradiação acústica (SHENG et al., 2017).

Logan et al. (2019) desenvolveram microbolhas contendo gás oxigênio para o tratamento quimiosonodinâmico de câncer de mama usando a rosa bengala como agente sonossensibilizante e os quimioterápicos comumente usados para o tratamento convencional do câncer de mama, a doxorrubicina e o paclitaxel. As microbolhas de oxigênio foram preparadas contendo paclitaxel incorporado na bicamada lipídica e a doxorrubicina conjugada à superfície das microbolhas. A eficácia do tratamento quimiosonodinâmico foi demonstrada *in vitro* em modelo de esferóides tridimensionais de câncer de mama humano e *in vivo* em ratos com tumores de células de adenocarcinoma da mama humana (MCF-7). Os resultados mostraram uma redução significativa da viabilidade celular e do volume tumoral após o tratamento quimiosonodinâmico quando comparado com a TSD e a quimioterapia separadamente. Também foi verificado que não houve alteração no peso dos animais que receberam o tratamento quimiosonodinâmico durante todo o estudo ao passo que aqueles que foram tratados com a doxorrubicina e o paclitaxel apenas mostraram uma redução de até 12% no peso corporal.

Yue et al. (2019) também demonstraram que a TSD com lipossomas de hematoporfirina monometil éter combinada com imiquimode em associação com o anti-PD-L1 (um inibidor de pontos de controle) induziu uma resposta antitumoral com redução da progressão do tumor primário e prevenção de metástasis. Resultados de maior porcentagem de morte de células de câncer hepático também foram encontrados com a combinação da TSD com o ácido aminolevulínico e o inibidor glicolítico da 2-deoxiglicose quando comparado com o tratamento das células com a TSD e o inibidor glicolítico, separadamente (XIE et al., 2017).

2.4.3 Nanopartículas como sensibilizantes intrínsecos

Sistemas nanoestruturados como nano e microbolhas, lipossomas, micelas e outros tem sido vastamente explorados como alternativas para administração dos agentes sonossensibilizantes com características hidrofóbicas para a TSD (MCEWAN et al., 2014; CHEN et al., 2017b; NOMIKOU et al., 2017; XIE et al., 2017; CANAVESE et al., 2018; PAN et al., 2018; HORISE et al., 2019; LOGAN et al., 2019; TAKEMAE et al., 2019). Entretanto, algumas nanopartículas como partículas de

TiO₂, ferro, ouro, sílica, grafeno e fulereno podem agir intrinsicamente como agente sonossensibilizantes para a TSD, elicitando a formação de ROS e radicais livres com a ativação pelo ultrassom e a morte celular tumoral (HARADA et al., 2011, 2013; SHANEI et al., 2012; YUMITA et al., 2013; OSMINKINA et al., 2014, 2015; SHEN et al., 2015; MOOSAVI NEJAD et al., 2016; DAI et al., 2017; HUANG et al., 2017; CANAVESE et al., 2018; PAN et al., 2018).

Tem sido demonstrado que a presença de tais nanopartículas em solução aquosa tem a capacidade de diminuir o limiar de cavitação, servindo, por vezes, como facilitadores da formação ou nucleação das bolhas de cavitação ou como estabilizadores das microbolhas de cavitação agindo tanto na superfície quanto dentro delas (CANAVESE et al., 2018).

Yildirim et al. estudaram os efeitos da característica física e química da superfície de nanopartículas sobre a eficiência de iniciação da cavitação inercial. Os autores mostraram que as característica de rugosidade e hidrofobicidade da superfície de nanopartículas se mostraram necessárias para a indução eficiente da cavitação inercial e estabilização das microbolhas de cavitação (YILDIRIM et al., 2016). Kwan et al. desenvolveram um sistema intrigante denominado pelos autores de *nanocups*. O sistema consiste em uma nanopartícula polimérica com uma única cavidade altamente responsiva ao ultrassom, cuja estrutura se assemelha a de um copo. Os *nanocups* se mostraram bastante capazes de prender e estabilizar as nanobolhas de cavitação devido à sua morfologia superficial. Quando submetidos a irradiação acústica, esse sistema nanoestruturado mostrou a capacidade de iniciar e sustentar a atividade cavitacional por um tempo quatro vezes maior do que as microbolhas de gás, o tipo de sistema nanoparticulado mais comumente usado para a facilitação do processo de cavitação e oxigenação do tecido tumoral na TSD (KWAN et al., 2015).

Dentre as nanopartículas com propriedades sonodinâmicas intrínsecas, as de TiO₂ tem sido extensivamente estudadas devido ao seu baixo custo e facilidade de produção. As nanopartículas de TiO₂ apresentam efeitos antitumorais satisfatórios tanto *in vitro* como *in vivo* sob irradiação com ultrassom. Moosavi Nejad et al., por exemplo, estudaram os efeitos do ultrassom focado de alta intensidade (HIFU) combinado com nanopartículas de TiO₂ para o tratamento do carcinoma escamoso oral. Os resultados *in vitro* mostraram que as nanopartículas de TiO₂ induziram maior percentual de morte celular na presença do ultrassom em comparação a exposição

das células ao ultrassom apenas ou ao tratamento somente com as nanopartículas. Os resultados *in vivo* demonstraram necrose e danos teciduais nos animais tratados com HIFU apenas e na TSD com nanopartículas de TiO₂ (MOOSAVI NEJAD et al., 2016). Harada et al. motraram que a viabilidade de células de melanina C32 incubadas com nanopartículas de TiO₂ foi de aproximadamente 57% após irradiação com ultrassom. Os resultados *in vivo* mostraram que os animais injetados com essas nanopartículas apresentaram regressão tumoral significante em relação aos animais tratados apenas com o ultrassom (HARADA et al., 2011).

Acredita-se que o efeito terapêutico das nanopartículas de TiO₂ esteja relacionado à emissão de sonoluminescência emitida entre 220 e 700 nm que ativa o TiO₂, culminando com a produção de ROS (SAZGARNIA et al., 2013). Neste aspecto, algumas estratégias tem sido adotadas com o objetivo de aumentar a produção de ROS a partir da TSD com as nanopartículas de TiO₂, como a modificação dessas com a introdução de metais nobres como ouro, prata e platina que conferiu um aumento da produção quântica de ROS, como verificado por Deepagan et al. (DEEPAGAN et al., 2016). Outros trabalhos tem apresentado soluções para alguns problemas apresentados pelas partículas de TiO₂ visando sua aplicação da TSD, como biodistribuição ineficiente e efeitos tóxicos de curto e longo prazo, e o emprego de alguns materiais poliméricos como polietilenoglicol e complexo de poliíons tem se mostrado bastante vantajosos para modificação das propriedades farmacocinéticas e tóxicas das nanopartículas de TiO₂ (YAMAGUCHI et al., 2011; HARADA et al., 2013; YAMAMOTO et al., 2017).

As nanopartículas de sílica mesoporosa também têm sido amplamente estudadas como agente nanoparticulado sonossensibilizante devido a sua grande área superficial e elevado volume poroso. Por exemplo, Huang et al. 2017 desenvolveram nanopartículas de sílica mesoporosa peguilada para veiculação da protoporfirina IX. Ambos resultados *in vitro* e *in vivo* provaram que o sistema nanoparticulado desenvolvido possui alta eficiência sonodinâmica na morte de célula de câncer de mama murino 4T1(HUANG et al., 2017). Outro estudo com nanopartículas de sílica mesoporosa sobre nanofolhas de óxido de grafeno para a incorporação de nanopartículas de óxido de ferro peguiladas, conjugada a rosa bengala, mostrou uma redução expressiva de 82% na viabilidade celular, acompanhada da produção de oxigênio singleto quando irradiado com o ultrassom (CHEN et al., 2016).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial do ultrassom de baixa frequência associado a micelas de ZnF com a finalidade dupla de promover a penetração cutânea e gerar ROS visando a terapia sonodinâmica de tumores cutâneos.

3.2 Objetivos específicos

- Co-validar método analítico para quantificação da ZnF;
- Determinar a concentração micelar crítica (CMC) do DSPE-PEG;
- Desenvolver e otimizar um sistema de liberação micelar contendo o sonossensibilizante ZnF através de delineamento Box-Behnken;
- Caracterizar as micelas de DSPE-PEG/tensoativos;
- Avaliar a influência do LFU na penetração do sonossensibilizante na presença e ausência do sistema de liberação *in vitro* na pele de suínos;
- Determinar a atividade cavitacional de meios de acoplamento usados nos experimentos de penetração *in vitro;*
- Avaliar a geração das espécies reativas de oxigênio do sonossensibilizante frente a aplicação do LFU na ausência e na presença das micelas de ZnF;

4. METODOLOGIA EXPERIMENTAL

4.1 Método analítico para quantificação da ZnF

A ZnF foi quantificada por espectrofluorimetria utilizando cubeta de quartzo de 1 cm de caminho óptico com quatro faces polidas no espectrofluorímetro Shimadzu RF-5301PC (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão). Os parâmetros analíticos definidos foram: alta sensibilidade, resolução de 1 nm, velocidade de varredura rápida, largura da fenda óptica de 5/5 nm, comprimento de onda de excitação de 610 nm e monitoração da emissão de fluorescência no intervalo de 630 a 800 nm.

Para os experimentos de penetração cutânea *in vitro*, o método analítico foi co-validado na faixa de 1 a 100 ng/mL quanto aos parâmetros de linearidade, especificidade, exatidão, precisão, limites de quantificação e detecção e recuperação da pele de acordo com as recomendações propostas pela *International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use* (ICH, 2005). A curva analítica foi preparada em dimetilsulfóxido (DMSO), solvente este utilizado para diluir a ZnF nas micelas e para extrair a ZnF da pele nos experimentos de penetração cutânea, de acordo com Dalmolin e Lopez (2018). (DALMOLIN; LOPEZ, 2018; DALMOLIN, 2019). Os espectros de emissão de fluorescência foram obtidos utilizando o espectrofluorímetro PerkinElmer LS55 (PerkinElmer, UK), e cubeta de quartzo de 1 cm de caminho óptico com quatro faces polidas.

4.1.1 Especificidade

A especificidade foi avaliada comparando os espectros de emissão de fluorescência de soluções padrão de ZnF em DMSO e da micela branca diluída em DMSO, com a finalidade de verificar se haveria interferência de algum dos componentes das micelas no mesmo comprimento de emissão de fluorescência da ZnF.

4.1.2 Linearidade

A linearidade foi determinada através da construção de uma curva analítica em triplicata obtida a partir da análise de cinco concentrações diferentes de ZnF em DMSO (1, 5, 10, 25, 50 e 100 ng/mL). As médias das áreas dos picos de cada concentração e as respectivas concentrações de ZnF foram respectivamente plotados no eixo das ordenadas e das abscissas. Análises estatísticas dos dados pelo método de regressão linear dos mínimos quadrados foram realizadas e expressas pela equação da reta de primeira ordem y = ax + b, em que *a* corresponde ao coeficiente angular, dado pela inclinação da reta, e *b* corresponde ao coeficiente linear, dado pelo ponto de intersecção da reta com o eixo das ordenadas. As faixas lineares foram analisadas com base no coeficiente de correlação linear (r).

4.1.3 Exatidão

A exatidão do método foi verificada pela análise de três diferentes níveis concentrações de ZnF, em triplicata, dentro do intervalo da curva analítica: nível baixo (1 ng/mL), nível médio (5 ng/mL) e nível alto (10 ng/mL) em triplicata cada. A exatidão foi expressa por meio da porcentagem de recuperação e calculada utilizando a Equação 1.

$$Recuperação (\%) = \frac{concentração média determinada experimentalmente}{concentração teórica} x 100$$
(1)

4.1.4 Precisão

A precisão intra-ensaio e a precisão inter-ensaio foram avaliadas em triplicata para cada concentração a partir de soluções padrão de ZnF nas concentrações de 1, 5 e 10 ng/ml. A precisão intra-ensaio foi realizada em um mesmo dia em momentos diferentes e a precisão inter-ensaio foi avaliada em três dias diferentes. Ambas as precisões foram expressas pelo coeficiente de variação entre as amostras (CV), calculado utilizando a Equação 2.

$$CV(\%) = \frac{desvio padrão}{concentração média determinada experimentalmente} x 100$$
(2)

4.1.5 Limite de detecção e quantificação

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) do método foram calculados a partir dos valores da inclinação da equação da reta (S) e do desvio padrão do intercepto com o eixo y (σ) obtidos respectivamente com as Equações 3 e 4.

$$LD = 3.3 \frac{\sigma}{s} \quad (3)$$
$$LQ = 10 \frac{\sigma}{s} \quad (4)$$

4.1.6 Recuperação da ZnF da pele de orelha de suínos

A pele, determatomizada a 700 µm e com área de 1,0 cm² (área da célula de difusão), foi submetida a técnica do tape-stripping, e em seguida a epiderme viável foi separada da derme. Esses fragmentos da epiderme viável e derme estrato foram picotados separadamente e contaminados com 2 mL de soluções padrão de ZnF em DMSO em diferentes concentrações (1, 2, 5, 7 e 10 ng/mL), cada concentração em triplicata. A mistura pele e solução de ZnF, em cada concentração, foi agitada em vórtex por 2 min (IKAWorks Inc., EUA), seguida da fragmentação em homogeneizador de tecidos tipo turrax T25 Digital (IKAWorks Inc., EUA) por 1 min a velocidade de 13500 rpm e, finalmente, mantida em banho de ultrassom por 30 min. As amostras assim preparadas foram então centrifugadas a 12000 rpm a 25°C por 10 min, o sobrenadante resultante foi coletado, filtrado em filtro de membrana de politetrafluoroetileno (PTFE) de 0,45 µm e analisado por espectrofluorimetria utilizando os parâmetros do método analítico validado (DALMOLIN, 2019). A concentração de ZnF foi então determinada usando a curva analítica padronizada da ZnF em DMSO. A porcentagem de recuperação de ZnF e a precisão da extração, considerando o efeito matriz da pele, foram então calculadas com base nas Equações 1 e 2, respectivamente. Nos experimentos de penetração cutânea, a quantidade de fármaco encontrada na pele submetida a extração (ZnF ng/cm²) foi calculada levando-se em consideração o fator de correção (Fc = 1,77) de acordo com a equação 5:

$$ZnF ng/cm^{2} = \left(\frac{Concentração de ZnF x Volume de extração}{Area da pele}\right) xFc$$
(5)

4.2 Determinação da CMC

A determinação da CMC do polímero utilizado para obtenção das micelas, DSPE-PEG (*1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine* conjugado ao polietilenoglicol 2000), foi realizada pelo método de fluorescência do pireno (WEBBER, 1999; LUKYANOV et al., 2002). Uma solução estoque de pireno de 2,5 mg/mL foi preparada em clorofórmio e alíquotas de 20 μL foram transferidas para tubos de ensaio limpos. O solvente foi evaporado com auxílio de ar comprimido, protegido da luz para se obter 50 μg de pireno seco nos tubos. Então, diferentes concentrações de DSPE-PEG 2000 (de $1x10^{-6}$ a $5x10^{-5}$ mol/L), preparadas em tampão HEPES 20 mmol/L pH 7,4, foram adicionados aos tubos contendo pireno seco. Essas dispersões foram filtradas através de filtro de membrana de 0,45 μm para a separação de cristais de pireno não-dissolvidos, após agitação a temperatura ambiente, no escuro por 24 h. A intensidade de fluorescência do pireno solubilizado nas dispersões de DSPE-PEG foi determinada por espectrofluorimetria utilizando λ_{ex} = 339 nm e λ_{em} = 390 nm.

Um gráfico que relacionava a concentração do DSPE-PEG em escala logarítmica e a intensidade de fluorescência do pireno foi construído. A concentração do DSPE-PEG na qual a intensidade de fluorescência do pireno aumenta abruptamente foi estimada como a CMC do DSPE-PEG (LUKYANOV et al., 2002)

4.3 Desenvolvimento e otimização das micelas contendo ZnF

4.3.1 Preparação das micelas pela técnica de dissolução direta do DSPE-PEG com o fármaco

As micelas foram primeiramente preparadas pela técnica da dissolução direta, que se baseia na solubilização do fármaco em uma solução das substâncias anfifílicas utilizadas para obtenção das micelas, sob agitação, seguida da separação do fármaco não solublizado por centrifugação ou filtração (KORE et al., 2014).

Então, 20 mg de DSPE-PEG e 2,0 mg de ZnF foram pesados e dispersos em 5 mL de tampão HEPES 20 mmol/L pH 7,4 sob agitação magnética, aquecimento a 37°C, por 60 min. Após o arrefecimento, a dispersão foi filtrada em filtro de 0,22 µm e o tamanho médio de partícula, índice de polidispersão (PdI) e potencial zeta foram determinados de acordo com o descrito no item 4.4.1 e 4.4.2.

4.3.2 Preparação das micelas pelo técnica da hidratação do filme lipídico

As micelas foram preparadas pela técnica da hidratação do filme lipídico que se baseia na dissolução de ambos fármaco e DSPE-PEG em solvente orgânico, seguida da formação de um filme lipídico por rotaevaporação, hidratação do filme lipídico com solvente aquoso e sonicação da formulação para uniformização das micelas (KORE et al., 2014). Inicialmente, micelas brancas (na ausência de ZnF) foram preparadas. Para tanto, 15 mg de DSPE-PEG foram adicionados a um balão de fundo redondo e dissolvidos em 3,0 mL de clorofórmio. O solvente orgânico foi em seguida rotaevaporado a 100 rpm e 50°C, sob pressão de 200 mbar, por 60 min e o filme formado, hidratado em 5,0 mL de tampão HEPES 20 mmol/L pH 7,4. O tamanho médio de partícula e o PdI foram então monitorados de acordo com o item 4.4.1. Buscando reduzir o PdI das dispersões, foram adicionados 10 mg de d- α -tocopheryl polyethylene glycol 1000 succinate (TPGS) no preparo das micelas ou diferentes agentes estabilizantes à solução de hidratação: 1% de Polaxamer 407, 1% de polissorbato 80 (Tween 80), 0,5 ou 1% da combinação de Tween 80 e monoestearato de sorbitano (Span 80) na proporção 1:3 mol (Tween 80/Span 80).

As micelas hidratadas com Tween 80/Span 80 na proporção de 1:3 mol foram as que apresentaram resultados mais satisfatórios e foram as utilizadas para o preparo das micelas contendo ZnF. Essas foram preparadas da seguinte forma: uma dispersão de ZnF em clorofórmio na concentração de 70 µg/mL foi levada ao banho ultrassônico por 30 min para completa solubilização do fármaco. Diferentes volumes desta solução clorofórmica de ZnF foram então adicionados, em um balão de fundo redondo, à uma massa determinada de DSPE-PEG. Quantidade suficiente de clorofórmio para 3,0 mL foi acrescida ao balão quando necessária. O solvente orgânico foi em seguida rotaevaporado a 100 rpm e 50°C, sob pressão de 200 mbar, por 60 min. O filme formado foi hidratado em 3,0 mL de tampão HEPES 20 mmol/L pH 7,4 contendo diferentes porcentagens de Tween 80/Span 80 (1:3 mol), utilizando banho ultrassônico por 30 min na temperatura de 27 ± 2°C para homogeneização. Após o preparo, as dispersões foram mantidas em repouso por 24 h, a temperatura ambiente e protegidas da luz, e então filtradas com filtro de 0,22 µm para remoção do fármaco não solubilizado e caracterizadas.

4.3.3 Delineamento experimental de Box-Behnken

Para avaliar a concentração ótima de ZnF, DSPE-PEG e Tween 80/Span 80 necessárias para a obtenção de 3 mL de uma dispersão micelar, pela técnica de hidratação do filme lipídico, com as características requeridas, um delineamento experimental do tipo *Box-Behnken* de 3 fatores em 3 níveis, de 15 experimentos randomizados, foi realizado de acordo com o descrito na Tabela 3. Foi avaliada a influência e interações das variáveis independentes X₁) massa de DSPE-PEG no

filme seco, X₂) massa de ZnF no filme seco e X₃) porcentagem de Tween 80/Span 80 (1:3 mol) na solução de hidratação, em função das variáveis dependentes tamanho de partícula, PdI, potencial zeta e concentração de ZnF solubilizada na dispersão final.

A randomização dos experimentos, análises estatísticas para identificar os principais efeitos e as interações entre as variáveis e o modelo matemático mais adequado para análise da superfície de resposta foram realizados utilizando o *software* Design Expert (Trial Version 11, Stat-Ease Inc, MN). A formulação otimizada foi escolhida usando a predição de ponto do mesmo *software* baseando-se na proximidade da função de desejabilidade de 1. Para tanto, definiu-se o tamanho das partículas, o PdI como mínimos, o potencial zeta negativo e a concentração de ZnF solubilizada como máxima.

4.3.4 Análise estatística

Os resultados obtidos do delineamento experimento e da validação do modelo experimental foram analisados por análise de variância (ANOVA), seguido de pósteste de Tukey e teste T de Student, respectivamente, (p < 0,05), usando Prism 7.0.

Tabela 3 - Delineamento experimental do tipo Box-Behnken para o preparo, pela técnica de hidratação do filme lipídico, de 3,0 mL de micelas contendo ZnF em solução tampão HEPES 20 mmol/L, pH 7,4.

				C: % Tween 80/Span 80	
Experime		E-PEG (mg)	в: 2пг (µg)	(1:3 mol/mol)	
1		-1	-1	0	
2		+1	-1	0	
3		-1	+1	0	
4		+1	+1	0	
5		-1	0	-1	
6		+1	0	-1	
7		-1	0	+1	
8		+1	0	+1	
9		0	-1	-1	
10		0	+1	-1	
11		0	-1	+1	
12		0	+1	+1	
13		0	0	0	
14		0	0	0	
15		0	0	0	
		Níveis			
Variáveis codificadas	Variáveis decodificadas	-1	0	+1	
X ₁	DSPE-PEG (mg)	10	15	20	
X ₂	ZnF (μg)	70	140	210	
X ₃	Tween 80/Span 80 (1:3mol/mol) (%)	0	0,5	1	

4.4 Caracterização das formulações

As formulações desenvolvidas foram caracterizadas em função do tamanho de partícula ou gotícula, índice de polidispersão, potencial zeta, morfologia e quantidade de ZnF incorporada.

4.4.1 Tamanho médio, PdI, Potencial zeta e Concentração de nanopartículas

A determinação do tamanho e do PdI das micelas foi realizada por espectroscopia de autocorrelação de fótons (DLS), utilizando o equipamento Zetasizer Nano ZS 90 (Malvern Instruments, UK), no modo intensidade, o tamanho e PdI das micelas. As amostras em replicatas foram diluídas em água deionizada (5 vezes) para análises. Para a determinação do potencial zeta das dispersões foi realizada através da técnica de mobilidade eletrofóretica das partículas. As amostras em replicatas foram diluídas quosa de KCI a 1 mmol/L. Todas as análises foram realizadas a 25°C.

A concentração de micelas nas dispersões otimizadas, contendo ou não ZnF, foi determinada utilizando o rastreador de nanopartículas (NTA) NanoSight NS 300 (Malvern Instruments, UK) e o *software* "Análise de Rastreamento de Nanopartículas NTA 3.1" após diluição das formulações (500 vezes) em solução tampão HEPES 20 mmol/L pH 7,4. O tamanho e a polidispersão das micelas foi também determinado por NTA para comparação com a análise por DLS. A polidispersividade neste caso foi determinada com base no valor de SPAN de acordo com a Equação 5.

$$SPAN = \frac{D_{90} - D_{10}}{D_{50}}$$
(5)

onde D_{10} , D_{50} e D_{90} são os diâmetros a 10, 50 e 90% dos volumes acumulados, respectivamente.

Para a emulsão, a caracterização do tamanho médio das gotículas foi realizada pela técnica de difração a laser, utilizando o equipamento LS 13320 Laser Diffraction Particle Size Analizer (Backman Coulter, California, EUA). A polidispersividade neste caso também foi determinada com base no valor de SPAN de acordo com a Equação 5.

4.4.2 Determinação da concentração de ZnF solubilizada

Para determinar a concentração de ZnF solubilizado pelo sistema micelar, as formulações foram diluídas em DMSO, agitadas por 1 min em vórtex e analisadas em espectrofluorímetro (item 4.4.2).

4.4.3 Caracterização morfológica

As micelas otimizadas foram analisadas por microscopia eletrônica de transmissão (MET) pipetando-se 10 µL das dispersões sobre uma grade de cobre revestida de carbono. Após remoção do excesso de líquido com papel manteiga (SUN et al., 2016) e secagem completa a 25°C, a grade foi vertida sobre uma gota de acetato de uranila a 2% em água deionizada, para contraste negativo, por 10 min. O excesso de líquido foi novamente removido usando papel manteiga e a amostra foi levada para o microscópio de transmissão eletrônica Jeol modelo 100 CX II (Jeol Brasil Instrumentos Científicos Ltda, São Paulo, Brasil) com voltagem de 80 kV, em aumentos de 50, 100 e 200 mil vezes.

4.4.4 Análise estatística

As comparações realizadas entre os resultados de caracterização físicoquímica das diferentes formulações foram analisados pelo teste T de Student, (p < 0,05), usando Prism 7.0.

4.5 Formulações avaliadas nos experimentos com o LFU

4.5.1 Hidrogel de hidroxietilcelulose (HEC)

O hidrogel de HEC foi utilizado como meio de acoplamento em vários experimentos. Foi preparado a partir da dispersão de 1% (m/v) de HEC em água destilada, a quente, sob agitação.

4.5.2 Solução de lauril sulfato de sódio (SLS)

Essa solução foi utilizada como meio de acoplamento em alguns experimentos para efeito comparativo com o hidrogel de HEC. Foi preparada a partir da dissolução de 1% (m/v) de SLS em tampão HEPES pH 7.4.

4.5.3 Micelas brancas
Também utilizadas como meio de acoplamento, micelas de DSPE-PEG foram preparadas pelo método de hidratação do filme lipídico (item 4.3.2) a partir de 20 mg de DSPE-PEG solubilizados em um balão de fundo redondo com 3 mL de clorofórmio e, após formação do filme lipídico em rotaevaporador, hidratado com 3,0 mL de solução tampão HEPES 20 mmol/L contendo 0,5% de Tween 80/Span 80 (1:3 mol/mol) em banho ultrassônico. A preparação foi filtrada em filtro de seringa de 0,22 µm após 24h

4.5.4 Micelas contendo ZnF

Para avaliar a influência da formulação na penetração cutânea da ZnF sob efeito do LFU, foram preparadas da mesma forma que as micelas brancas, mas na presença de ZnF, micelas de DSPE-PEG contendo ZnF otimizadas. Desta forma, 3,0 mL de uma solução clorofórmica de ZnF a 70 μ g/mL foram adicionados a 20 mg de DSPE-PEG em um balão de fundo redondo. Após formação do filme lipídico em rotaevaporador o mesmo foi hidratado com 3,0 mL de solução tampão HEPES 20 mmol/L contendo 0,5 % de Tween 80/Span 80 (1:3 mol/mol) em banho ultrassônico por 30 min. Após 24h, a formulação foi filtrada em filtro de seringa de 0,22 μ m. A dispersão micelar final continha 13 ± 2 μ g/mL de ZnF.

4.5.5 Emulsão contendo ZnF

Para verificar a influência da lipofilicidade da formulação na penetração da ZnF pelas LTRs formadas pelo LFU, além das micelas contendo DSPE-PEG, que não contém fase oleosa, foi preparada uma emulsão óleo em água grosseira utilizando vaselina líquida e a mesma proporção de Tween 80 e Span 80 (1:3) que a presente nas micelas. Para o preparo de 100 mL de emulsão, 1,5 mg de ZnF foram dispersos sob agitação magnética na mistura dos emulsificantes a 70° C (5%, 2,5% de Tween 80 e 2,5% de Span 80), seguida a adição de 20% de vaselina líquida a 70° C. Quantidade suficiente para 100 mL de solução tampão HEPES pH 7,4 a 70°C foi então vertida na mistura de vaselina líquida, tensoativos e fármaco sob agitação vigorosa até seu arrefecimento.

4.6 Aparato do LFU

Os experimentos de sonoforese da pele foram realizados com um ultrassom de 20 kHz de frequência (VCX 500 Sonics & Materials, CT, USA). A fonte de

alimentação ultrassônica converte a voltagem de 50/60 Hz em energia elétrica. Essa energia elétrica é transmitida para o transdutor piezoelétrico (constituído por uma liga de titânio), o qual a transforma em vibrações mecânicas. As vibrações do conversor são intensificadas pela sonda do ultrassom, criando ondas de pressão no líquido onde é aplicado, ou seja, no líquido de acoplamento, que resulta na formação das microbolhas de cavitação.

A amplitude das ondas pode ser selecionada no equipamento e, uma vez definida, é fornecida de forma constante através de sensores que a mantém no nível selecionado. Dessa forma, a necessidade de ajustes constantes da quantidade de energia produzida pelo transdutor, ou seja, da potência, é eliminada e a quantidade real de potência, em watts, que é entregue à sonda pode ser monitorada continuamente pelo monitor do equipamento.

A taxa na qual a energia é liberada pelo ultrassom em função da área, isto é, a intensidade de energia ultrassônica usada nos experimentos de penetração *in vitro* com pele de orelha de suínos e para indução da formação de ROS pela TSD foi igual a 10 ± 0.5 W/cm² (n=6) e foi definida em função da seleção do menor valor de amplitude disponível pelo equipamento (20%). O ciclo de trabalho usado para os experimentos foi o de 50% (5 s *on* e 5 s *off*) para evitar variações de temperatura no local de irradiação maiores do que 10° C e efeitos térmicos indesejáveis (PEREIRA, 2015; PEREIRA; RAMOS; LOPEZ, 2017).

4.6.1 Medida da frequência do ultrassom

Para confirmar a frequência de 20 kHz do ultrassom utilizado nos experimentos, ela foi medida usando-se um hidrofone pré-amplificado de banda larga (largura da banda de frequência: 0,03 – 70 kHz, sensibilidade: -157 dB/1v/µPa, modelo ITC-6050c, International Transducer Corporation, CA, USA) em experimentos independentes e realizados em um local acusticamente isolado (n=3) (HARRIS; MARUVADA; GAMMELL, 2004), conforme mostrado na Figura 8. Os experimentos foram realizados no departamento de Física da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, USP com auxílio do professor Dr. Theo Zeferino Pavan.



Figura 8. Medida da frequência do ultrassom usando o hidrofone.

4.6.2 Calibração da intensidade

A calibração da intensidade do ultrassom foi verificada pelo método de calorimetria em função da porcentagem de amplitude dada pelo equipamento. Para tanto, uma garrafa térmica foi preenchida com 950 mL de água e vedada com isopor e fita isolante para minimizar a troca de energia entre o sistema e o meio externo. A sonda do ultrassom foi imersa através do isopor dentro da água e ativada por 5 min na amplitude de 20% em um ciclo de trabalho de 100%. A variação de temperatura antes e após a aplicação do ultrassom foi medida com o auxílio de um termômetro imerso dentro da água através do isopor e a intensidade calculada com base na equação 6.

$$I = \frac{m_{\acute{a}gua} x C_{\acute{a}gua} x \Delta T}{A x \Delta t}$$
(6)

Onde: *I* é a intensidade do LFU (W/cm²), $m_{água}$ é a massa da água (950 g), $C_{água}$ é o calor específico da água (4,18 J/g°C), *A* é a área do transdutor (1,33 cm²), ΔT é a variação da temperatura da água e Δt é o tempo necessário para que ocorresse esta variação na temperatura (300 s).

4.7 Atividade cavitacional nos meios de acoplamento do LFU

A atividade cavitacional dos meios de acoplamento usados nos experimentos foi estimada usando iodeto de potássio (KI) como método padrão indireto (EBRAHIMINIA; MOKHTARI-DIZAJI; TOLIYAT, 2016). Uma solução de 0,1 mol/L de KI foi preparada com água ultrapura e, posteriormente, areada por 20 min por meio de infusão de ar comprimido. Essa solução foi utilizada para dispersar os seguintes meios de acoplamento a) SLS, b) HEC, c) meio de hidratação de Tween 80 e Span 80 (1: 3 mol/mol) para as micelas brancas. Como controle foi utilizada a própria solução de KI a 0,1 mol/L. Após o preparo as formulações foram novamente areadas por 10 min.

Para verificar a atividade cavitacional, logo após o preparo 1,0 mL de cada meio de acoplamento foi sonicado em tubo de ensaio com LFU (20 kHz) na intensidade de 10 ± 0.5 W/cm² e ciclo de trabalho de 50% por 1 min. A distância entre o transdutor e o fundo do tubo de ensaio foi fixado em 10 mm. A temperatura das preparações foi monitorada no início e ao término da sonicação.

Após sonicação, as preparações foram diluídas em 3,0 mL de água ultrapura para análise espectrofotométrica do triiodeto de potássio (KI₃) gerado. A absorbância do KI₃ foi medida em 350 nm imediatamente após o resfriamento das preparações sonicadas.

4.7.1 Análise estatística

Os resultados da avaliação da atividade de cavitação inercial nos meios de acoplamentos do LFU foram analisados por análise de variância (ANOVA), seguido de pós-teste de Tukey (p < 0,05), usando Prism 7.0.

4.8 Ensaios in vitro de penetração cutânea passiva e sonoforética

4.8.1 Medida de resistividade elétrica da pele

As peles usadas nos experimentos de penetração cutânea foram obtidas a partir de orelhas de suínos, fornecidas pelo abatedouro Fribordogue (Bariri, São Paulo, Brasil). As peles foram cuidadosamente dissecadas, dermatomizadas a 700 µm, armazenadas a -80° C e usadas com até trinta dias a contar do data de chegada.

Para garantir a integridade do estrato córneo das peles antes dos experimentos de penetração, a medida de resistividade elétrica foi realizada de acordo com Tang e colaboradores (Tang et al., 2001). As peles dermatomizadas montadas nas células de difusão foram submetidas a passagem de uma corrente elétrica por meio de um gerador de sinal (33210 A Agilent, EUA) e eletrodos de Ag/AgCI (In Vivo Metrics, EUA) inseridos no compartimento doador e receptor das células de difusão preenchidos com solução tampão PBS pH 7,4. Uma corrente elétrica alternada de 100 mV (RMS) de diferença potencial e 10 Hz de frequência foi aplicada. A corrente elétrica capaz de atravessar a pele foi então medida com o auxílio de um multímetro e a resistência da pele foi calculada pela lei de Ohm, subtraindo-se o valor da resistência do sistema sem a pele daquele quando a pele estava presente. O valor de resistividade foi obtido multiplicando-se o valor de resistência pela área da pele disponível para permeação. As peles que apresentaram valor de resistividade < 35 K Ω . cm² foram consideradas danificadas e descartadas (KUSHNER IV; BLANKSCHTEIN; LANGER, 2004).

4.8.2 Influência do meio receptor sobre a resistividade da pele

A influência da solução receptora composta por 1% (m/v) SLS em tampão PBS pH 7.4 na integridade do estrato córneo em função do tempo de experimento foi verificada pela medida de resistividade elétrica da pele, como descrito no item 4.8.1., após contato da pele, montada na células de difusão, com esta solução por até 24 h. As medidas foram realizadas nos tempos 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 23, 23 e 24 h (n=4).

4.8.3 Estudos de penetração cutânea passiva da zinco ftalocianina

Foram realizados utilizando-se células verticais de difusão do tipo Franz e pele de orelha de porco, dermatomizada a 700 μ m de espessura. Fragmentos de pele foram colocados entre os compartimentos doador e receptor da célula de difusão, com o estrato córneo voltado para o doador. Sob a pele, na parte superior do compartimento receptor, para fornecer um suporte mecânico adicional, foi colocada uma tela de nylon de 150 μ m de abertura (Nylon-Sefar Lab Pak, Depew New York, EUA). No compartimento doador foram adicionados 1,0 mL da emulsão ou da micela contendo ZnF. Para garantir *sink conditions*, a solução receptora (=16 mL) foi constituída de 1% (m/v) de SLS em tampão PBS pH 7,4 a temperatura de 25 $\pm 2^{\circ}$ C, sob agitação de 500 rpm. A solubilidade da ZnF neste meio é de 12,5 \pm 0,1

µg/mL (DALMOLIN; LOPEZ, 2018). Do compartimento receptor foi coletado 1,0 mL de amostra nos tempos 18, 20, 22 e 24 horas após o início do experimento e a ZnF aí presente foi analisada por espectrofluorimetria (item 4.1). Os estudos foram conduzidos sob proteção da luz.

Para avaliar a quantidade de ZnF retida na pele, três outras séries de experimentos foram preparadas da mesma forma, mas os experimentos foram interrompidos após 1, 6 e 24 h para análise da pele. Para tanto, a pele foi retirada das células de difusão, o excesso de formulação removido com água destilada, e a área da pele anteriormente em contato com a formulação (1 cm²) foi submetida a técnica do *"tape stripping"*. Assim, o estrato córneo foi retirado utilizando-se 15 fitas adesivas (Durex® 3M) que foram colocadas em um tubo de plástico. O fármaco impregnado nas fitas foi extraído com 5,0 mL de DMSO sob agitação em vórtex por 2 min, seguido de banho de ultrassom por 30 min. Após esses processos, a solução foi filtrada em filtro de PTFE de 0,45 µm e analisada por espectrofluorimetria para determinação da ZnF no estrato córneo.

Para os experimentos penetração de 6 e 24 h, a epiderme viável (sem o estrato córneo) resultante foi separada da derme com o auxílio de uma espátula após aquecimento em um saco plástico fechado, em banho-maria, na temperatura de 61°C por 1 min. Ambas as camadas, epiderme viável e derme, foram picotadas e colocadas em tubos e o fármaco foi extraído com 2,0 mL de DMSO, seguido de agitação em vórtex por 2 min, trituração em homogeneizador de tecidos tipo turrax por 1 min a velocidade máxima 13500 rpm e banho de ultrassom por 30 min. As amostras foram centrifugadas a 12000 g a 25°C por 10 min e em seguida foram filtradas em filtro PTFE de 0,45 µm. A quantidade de fármaco presente na epiderme viável e derme foi determinada por espectrofluorimetria (item 4.1).

Para os experimentos de 1h, após a retirada do estrato córneo, a pele remanescente contendo as camadas da epiderme viável e da derme foi cortada em pequenos pedaços e submetidas ao processo de extração, conforme descrito anteriormente.

As análises foram conduzidas a temperatura ambiente e sob proteção da luz.

4.8.4 Influência do LFU na penetração cutânea da ZnF

A pele foi montada nas células de difusão como descrito anteriormente (item 4.8.3). O LFU foi aplicado em uma solução (meio de acoplamento) colocada sobre a

pele, no compartimento doador, a uma intensidade de 10 ± 0.5 W/cm², com ciclo de trabalho alternado, de 50%, correspondente a 5 s no modo *on* e 5 s no modo *off* de 1 min cada (totalizando 2 min devido ao ciclo de trabalho de 50% no modo *on*). A sonda do ultrassom foi inserida no meio de acoplamento a uma distância de aproximadamente 10 mm acima do estrato córneo. Para minimizar o efeito térmico, a cada ciclo de tratamento, o meio de acoplamento foi substituído por PBS para medida da resistividade elétrica da pele medida como descrito no item 4.8.1. O tratamento da pele com LFU foi repetido até que a resistividade elétrica da pele tratada alcançasse o valor desejado de aproximadamente 1 K Ω .cm² e os meios de acoplamentos foram substituídos a cada ciclo de irradiação com LFU para evitar efeitos térmicos (PEREIRA; RAMOS; LOPEZ, 2017).

Foram realizadas duas séries de experimentos: uma com o protocolo de prétratamento e outra com o protocolo de tratamento simultâneo.

No pré-tratamento, a pele foi exposta ao tratamento sonoforético com o LFU usando como meio de acoplamento o hidrogel de HEC. Após o pré-tratamento com gel, a formulação hidrofílica micelar ou a formulação lipofílica (emulsão) contendo ZnF foram colocadas em contato com a pele por 1 ou 6h. Após este período, a quantidade de ZnF foi quantificada no estrato córneo, epiderme viável e derme.

No tratamento simultâneo, utilizou-se como meio de acoplamento do LFU a dispersão micelar ou a emulsão, ambas contendo concentrações semelhantes de ZnF. Após a pele atingir a resistividade desejada, 1,0 mL das respectivas formulações de ZnF foram colocadas em contato com a pele por 1 ou 6 h. A penetração cutânea do fármaco foi analisada nas diferentes camadas da pele, como descrito anteriormente.

A contribuição do fluxo convectivo e a % de ZnF penetrada na pele a partir dele (%ZnF_{convecção}) foram calculadas de acordo com as equações 7 e 8, respectivamente.

Fluxo convectivo = fluxo sonoforese simultânea – fluxo passivo após pré-tratamento (7)

$$\%$$
ZnFconvecção = $\left(\frac{ZnFsimultânea-ZnFpré-tratamento}{ZnFsimultânea}\right)x100$ (8), onde

 $ZnF_{simultânea}$ é a quantidade de fármaco que penetrou na pele após 6 h após o tratamento simultâneo e $ZnF_{pré-tratamento}$ é a quantidade de fármaco que penetrou na pele passivamente após 6 h do pré-tratamento.

4.8.5 Análise estatística

Os resultados dos estudos de penetração cutânea *in vitro* foram analisados por análise de variância (ANOVA), seguido de pós-teste de Tukey (p < 0,05) usando Prism 7.0.

4.8.6 Distribuição da ZnF na pele por microscopia confocal

A influência do LFU na penetração e distribuição da ZnF a partir da micela e da emulsão contendo ZnF foi verificada na pele por microscopia confocal de varredura a laser. A pele foi avaliada após os seguintes experimentos de permeação: a) permeação passiva por 6 h, b) pré-tratamento sonoforético seguido de 6 h de permeação, c) tratamento simultâneo sem permeação e d) tratamento simultâneo seguido de 6 h de permeação.

Ao fim dos experimentos de permeação, as peles foram desmontadas das células de difusão de Franz e o excesso da formulação removida com água destilada. A área em contato com as formulações foi recortada e imersa em suportes contendo meio de congelamento Tissue-Tek O.C.T. (Sakura, EUA) e congeladas em ultrafreezer a –80°C. Cortes de 15 µm de espessura perpendiculares à superfície da pele foram obtidos com criostato Leica CM1860 (Leica, Illinois, EUA). Os cortes foram colocados sobre lâminas histológicas silinizadas (Knittel Glass, Brunsvique, Alemanha) e visualizados em aumento de 20 vezes utilizando microscópio confocal Leica TCS SP8 (Mannheim, Alemanha), operando com um laser de 638 nm para a excitação da ZnF e monitoramento da emissão entre 640 e 700 nm. As peles sem tratamento com as formulações ou com ultrassom foram utilizadas como controle para configurar os parâmetros do microscópio. As imagens foram obtidas com o uso do *software* LAS AF Lite 2.6.0.

4.9 Avaliação da produção de ROS visando a terapia sonodinâmica com LFU

4.9.1 Detecção da geração de radicais hidroxila

A geração de radicais hidroxila (OH) pela irradiação do LFU (apenas) em meio aquoso foi estimada pelo método do KI, usado anteriormente para se

determinar a atividade cavitacional dos meios de acoplamento (item 4.7). Quando gerados pela pirólise da água, OH[•] reage com os íons iodeto, produzindo íons triiodeto (I₃⁻). A geração de OH[•] foi, assim, monitorada pela absorção espectrofotométrica de KI₃ em 350 nm (EBRAHIMINIA; MOKHTARI-DIZAJI; TOLIYAT, 2016). Uma solução de 0,1 M de KI foi preparada em solução tampão HEPES pH 7,4 e areada por 20 min, como descrito anteriormente (item 3.7). Um volume de 1,0 mL dessa solução foi irradiada em tubo de ensaio com LFU na intensidade de 10 ± 0,5 W/cm² e ciclo de trabalho de 50% por 1 min. A absorbância do KI₃ gerado foi medida em 350 nm. A temperatura das preparações foi monitorada no início e ao término da irradiação. Experimentos independentes foram realizados com n=3, tendo a solução de 0,1 mol/L de KI como controle.

4.9.2 Detecção da geração de oxigênio singleto

A produção de oxigênio singleto (¹O₂) a partir da irradiação da ZnF foi medida pelo método indireto de formação intermolecular de endoperóxidos em meio aquoso usando duas sondas distintas: (i) sensor verde de oxigênio singleto (SOSG) e (ii) mistura de p-nitrosodimetilanilina (p-NDMA) e imidazol.

O SOSG reage seletivamente com ${}^{1}O_{2}$ produzindo o endoperóxido fluorescente EP-SOSG. Para os experimentos com essa sonda, a 5,0 mL das micelas contendo ZnF (4,5 µmol/L = 2,6 µg/mL) foi adicionado 1,0 µL de SOSG a 5 mmol/L em metanol, resultando em uma concentração da sonda de 1 µmol/L em solução tampão HEPES 20 mmol/L (pH 7.4). A formulação micelar contendo a sonda foi então irradiada com LFU a 10 ± 0,5 W/cm² em intervalos de 5 s. Experimentos independentes foram realizados com n=3, tendo como grupos controles: a) solução aquosa de SOSG em tampão HEPES 20 mmol/L (pH 7,4); e b) micelas brancas adicionadas de 1 µmol/L de SOSG. Imediatamente após cada irradiação de 5 s, a intensidade de fluorescência foi monitorada em comprimento de onda de excitação em 505 nm e emissão na faixa entre 510-600 nm (MOCANU; YAN, 2018).

A detecção de ${}^{1}O_{2}$ com a mistura de p-NDMA e imidazol ocorre a partir da reação específica do ${}^{1}O_{2}$ com o imidazol, produzindo um endoperóxido molecular intermediário que, por sua vez, consome o p-NDMA, com consequente decaimento da intensidade de fluorescência do meio.

Para os experimentos, a 5,0 mL das micelas contendo ZnF (4,5 μ mol/L = 2,6 μ g/L) foram adicionados 250 μ L de uma solução de p-NDMA a 500 μ mol/L e 125 μ L

de uma solução de imidazol a 1000 μ mol/L, ambas em solução tampão HEPES 20 mmol/L pH 7,4. Essa mistura foi irradiada com LFU a 10 ± 0,5 W/cm² por 1 min. Experimentos independentes foram realizados com n = 3, tendo como grupos controles: c) solução de p-NMDA e imidazol, ambos a 25 μ mol/L; d) micelas contendo ZnF sem as sondas a 4,5 μ mol/L; e) micelas contendo ZnF e 25 μ mol/L de p-NMDA e f) micelas contendo ZnF e 25 μ mol/L de imidazol. A geração de ¹O₂ foi detectada pelo monitoramento do decaimento da absorção do p-NDMA em 440 nm (LIANG et al., 2013).

A temperatura das preparações foi monitorada no início e ao término da irradiação.

4.9.3 Detecção da peroxidação lipídica no tecido cutâneo de suínos

A lipoperoxidação do tecido cutâneo foi determinada usando o método do ácido tiobarbitúrico (TBA) que reage com malondialdeído (MDA), um produto da peroxidação lipídica indicador da ação de radicais livres celular (ANTUNES et al., 2008). O ensaio da peroxidação lipídica no tecido cutâneo após penetração da ZnF seguida de irradiação com LFU foi realizado a partir da adaptação de método proposto por Yumita e colaboradores (YUMITA et al., 2014)

A pele, montada em células de difusão vertical, foi colocada em contato com micelas contendo $13 \pm 2 \ \mu$ g/mL de ZnF por 6 h, como descrito no item 4.8.3. Após este período de penetração da ZnF, a pele foi retirada das células de difusão, o excesso de formulação removido com água destilada, e a área da pele exposta a formulação (1 cm²) foi picota. A aproximadamente 1,0 mg de pele foram então adicionados 1,0 mL de tampão fosfato 0,1 mol/L pH 7,0 em tubos de ensaio de polipropileno. Para verificar o potencial da TSD com LFU e da ZnF como agente sonossensibilizante, a dispersão de pele foi submetida ao tratamento sonodinâmico com LFU por 1 min (10 ± 0,5 W/cm² e ciclo de trabalho de 50%).

Para avaliar a peroxidação lipídica resultante da aplicação do LFU, à dispersão de pele sonicada foram adicionados 100 μ L de sulfato ferroso heptahidratado 70 mmol/L (FeSO₄ • 7H₂O) e a mistura mantida em repouso a 37°C por 30 min. A 500 μ L do sobrenadante dessa mistura, em tubos de microcentrífuga, foram adicionados 1,0 mL de uma solução a 15% de ácido tricloacético. Os tubos foram centrifugados a 10000 rpm por 15 min a temperatura ambiente e, em seguida, 500 μ L do sobrenadante foram transferidos para tubos de ensaio de vidro, aos quais

foram adicionados 500 µL de uma solução aquosa de ácido tiobarbitúrico (ATB) a 0,67%. Os tubos foram agitados e deixados sob aquecimento a 95 °C por 30 min. Após resfriamento, as amostras foram analisadas para determinação do produto MDA-ATB por espectrofotometria em 532 nm.

Experimentos independentes foram realizados com n = 4, tendo como grupos controle: a) pele porcina (apenas); b) pele porcina irradiada + LFU; c) pele + FeSO₄ • $7H_2O$ + irradiação com LFU.

A temperatura das preparações foi monitorada no início e ao término da irradiação

4.9.4 Análise estatística

Os resultados da produção de radicais hidroxilas pelo LFU foram analisados usando teste T de Student (p < 0,05) enquanto que os resultados da produção de oxigênio singleto e da avaliação da lipoperoxidação lipídica causada pela TSD com o LFU e a ZnF foram analisados por análise de variância (ANOVA), seguido de pósteste de Tukey (p < 0,05), usando Prism 7.0.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Método analítico para quantificação de ZnF

O método analítico para quantificação da ZnF por espectrofluorimetria foi desenvolvido e validado anteriormente por Dalmolin (2019) na faixa de concentração de 10 a 100 ng/mL. Em virtude da concentração de ZnF incorporada nas micelas e na sua baixa permeação cutânea passiva, no presente trabalho o método foi co-validado avaliando-se uma faixa de concentração mais extensa, de 1 a 100 ng/mL. A exatidão e precisão do método foi assim ensaiada apenas para as concentrações de ZnF abaixo de 10 ng/mL, as quais não foram avaliadas por Dalmolin (2019).

A Figura 9 mostra a curva analítica da ZnF em DMSO obtida a partir da área do pico de intensidade de fluorescência para cada concentração, dentro do intervalo de concentração entre 1 e 100 ng/mL.



Figura 9. Curva analítica da ZnF em DMSO (n=3).

Análise em espectrofluorímetro com λ exc = 610 nm e λ em = 630-800 nm, fenda 5/5. Equação da reta: y = 61,929 x + 49,117, r = 0,9998.

A curva analítica construída gerou um valor do coeficiente de correlação linear de 0,9998, indicando que o método foi linear no intervalo de concentração utilizado. A equação da reta foi definida como y = 61,929 x + 49,117, onde y é a área do pico de fluorescência e x é a concentração da ZnF em ng/mL.

A Figura 10 mostra a seletividade do método espectrofluorimétrico utilizado para a ZnF frente a dispersão micelar.

Figura 10. Comparação dos espectros de emissão de fluorescência de uma solução de ZnF a 50 ng/mL e da micela branca diluída em DMSO (λ exc = 610 nm, fenda 5/5).



Observa-se na Figura 10 que a solubilização da micela branca em DMSO resultou, após excitação em 610 nm, em um espectro de emissão da fluorescência sem pico na região de emissão da ZnF, indicando a seletividade do método para quantificar a ZnF na dispersão micelar. O estrato córneo também não interfere nas análises e não apresenta efeito matriz, não interferindo na quantificação da ZnF (DALMOLIN; LOPEZ, 2018; DALMOLIN, 2019).

A Tabela 4 mostra os resultados obtidos no estudo de exatidão do método analítico.

Concentração teórica (ng/mL)	Concentração experimental obtida (ng/mL)	Exatidão (%)	%CV
1	$0,99 \pm 0,02$	98,76	1,99
5	$4,89 \pm 0,13$	97,80	2,53
10	$9,96 \pm 0,11$	99,62	1,05

Tabela 4 - Avaliação da exatidão para os padrões de ZnF em DMSO (n=3).

Resultados expressos como média ± desvio padrão (n=3).

Todas as concentrações analisadas apresentaram exatidão entre 97,80% e 99,66% e coeficiente de variação (CV) menor do que 5%, considerados adequados de acordo com o recomendado pela literatura utilizada (ICH, 2005). Os valores de

concentração teórica e de concentração experimental concordantes associados à baixa porcentagem de erros permitem inferir que os valores de concentração que serão obtidos a partir das análises das amostras por esse método estarão muito próximos do valor real no intervalo de concentração analisado entre 1 a 10 ng/mL.

A Tabela 5 mostra os resultados de precisão intra-ensaio e inter-ensaio (n=3).

Tabela 5 - Resultados dos testes de precisão intra-ensaio e inter-ensaio para amostras de ZnF em DMSO (n=3).

Precisão intra-ensaio							
Concentração	Concentra	ição experiment	al obtida	CV			
teórica (ng/mL)		(ng/mL)		(%)			
1		0,98 ± 0,01		1,38			
5		$4,98 \pm 0,05$		1,10			
10		9,99 ± 0,15		1,51			
	Precisão	inter-ensaio					
Concentração	Concentra	ição experiment	al obtida	CV			
teórica (ng/ml)		(ng/ml)		(%)			
	Dia 1	Dia 2	Dia 3	•			
1	1,06 ± 0,16	0,95 ± 0,01	$0,97 \pm 0,05$	5,28			
5	5,04 ± 0,31	4,67 ± 0,03	$4,93 \pm 0,04$	3,78			
10	10,03± 0,01	9,51 ± 0,04	$9,99 \pm 0,06$	2,62			

Resultados expressos como média ± desvio padrão (n=3).

Pode-se observar na Tabela 5 que o CV de todas as amostras foi menor do que 5,28%, confirmando a capacidade do método em determinar com precisão a concentração de ZnF em DMSO na faixa de concentração analisada de 1 a 10 ng/mL. A porcentagem de erro para a concentração mais baixa analisada, de 1 ng/mL, foi menor do que 15% e para as outras concentrações foi menor do que 6%, confirmando a exatidão do método na faixa de concentração analisada para os propósitos desse trabalho.

Os valores de LD e LQ calculados foram de 0,13 e 0,4 ng/mL, respectivamente, valores estes que denotam alta sensibilidade do método e confiabilidade dos resultados para análises de concentrações baixas do analito, como é o caso da quantificação de ZnF em ensaios de penetração *in vitro*.

Como nos estudos de penetração cutânea a ZnF é quantificada na pele, seu efeito matriz foi analisado usando DMSO, solvente extrator, para fortificar as amostras de pele com concentrações conhecidas de ZnF. A Tabela 6 mostra a % de Recuperação e a precisão da extração da ZnF da epiderme viável e da derme, contaminadas com diferentes concentrações de ZnF.

Tabela 6 - Resultados do estudo de	erecuperação	de ZnF da	a pele de	suínos	utilizando
DMSO como solvente extrator (n=3	b).				

Concentração	Concentração	Recuperação	CV	Concentração	Recuperação	CV
teórica	de ZnF	na epiderme	(%)	de ZnF	na derme	(%)
adicionada	extraída da	viável		extraída da	(%)	
(ng/mL)	epiderme	(%)		derme		
	viável (ng/mL)			(ng/mL)		
1,0	1,13 ± 0,07	113	5,9	1,22 ± 0,29	122,2	22,6
2,5	1,88 ± 0,10	75	5,1	1,39 ± 0,00	55,7	0,1
5,0	2,79 ± 0,08	55,8	2,7	2,74 ± 0,03	54,8	1,0
7,5	4,05 ± 0,24	54,1	5,9	4,05 ± 0,07	53,9	1,7
10,0	5,21 ± 0,01	59,3	0,2	5,13 ± 0,14	51,3	2,7

Resultados expressos como média ± desvio padrão (n=2).

Na faixa de concentração de 2,5 a 10,0 ng/mL, a Tabela 6 mostra que aproximadamente 57% de ZnF é recuperada das camadas da pele, de forma reprodutível (% CV < 5,9%), após extração com DMSO. Por outro lado, a extração da ZnF se mostrou inadequada na menor concentração analisada (1,0 ng/mL), com uma porcentagem de recuperação maior do que a esperada, de 122,2% e %CV de 22%. Assim, considerou-se 2,5 ng/mL o limite de quantificação da ZnF na pele.

A análise estatística dos valores de porcentagem de recuperação das amostras tratadas com 2,5 a 10 ng/mL de ZnF mostrou que as % de fármaco recuperadas são semelhantes para todas as concentrações (ANOVA, p>0,05). Desta forma, a média dos valores, de 56,6 \pm 7,6 %, foi utilizada para se calcular o fator de correção (*Fc*). O *Fc* determinado foi de 1,77 e, portanto, a ZnF encontrada em todas as amostras de epiderme viável e derme analisadas após os estudos de penetração cutânea teve seu valor corrigido com base no *Fc* de acordo com a Equação 5.

5.2 Determinação da CMC

A Figura 11 mostra a fluorescência emitida pelo pireno (eixo y) em função do logaritmo da concentração de DSPE-PEG (eixo x) presente na solução tampão de HEPES (20 mmol/L, pH 7,4).

Figura 11. Determinação da concentração micelar crítica do DSPE-PEG em solução tampão HEPES 20 mmol/L pH7,4 pelo método do pireno.



Pode-se observar na Figura 12 que a intensidade de fluorescência do pireno aumentou abruptamente na concentração de 2x10⁻⁵ mol/L de DSPE-PEG, sendo esta, portanto, a CMC do DSPE-PEG em solução tampão HEPES (20 mmol/L e pH 7,4).

O pireno é um corante fluorescente vastamente utilizado na determinação da CMC de polímeros porque sua intensidade de fluorescência é muito sensível à polaridade do solvente (WEBBER, 1999). Abaixo da CMC, as moléculas do DSPE-PEG se dispõem na interface líquido-ar da solução aquosa, não alterando significativamente a solubilidade do pireno no meio. Na CMC, as moléculas do polímero se associam, formando estruturas ou agregados micelares capazes de solubilizarem o pireno na sua região apolar, resultando, portanto, no aumento de sua fluorescência (WEBBER, 1999).

Valores de CMC semelhantes foram relatados para DSPE-PEG com massa molecular (MM) próxima a do polímero utilizado neste trabalho (MM = 2788 g/mol). Sezgin et al. (2006) e Lukyanov et al. (2002), por exemplo, encontraram valores de CMC iguais a 1,2x10⁻⁵ mol/L e 1,1x10⁻⁵ mol/L, respectivamente, usando DSPE-PEG 2000 de MM de 2806 g/mol em tampão HEPES pH 7,4.

A determinação do valor da CMC se faz útil para se estimar ou garantir que usar-se-á concentrações do polímero capazes de se organizarem na forma de micelas no meio. Além disso, a CMC é o principal parâmetro para avaliação da estabilidade termodinâmica de micelas poliméricas, em que baixos valores de CMC, como o encontrado para o DSPE-PEG, indicam alta estabilidade termodinâmica em solução aquosa e frente a grandes diluições (SEZGIN-BAYINDIR et al., 2016).

5.3 Desenvolvimento e otimização das micelas contendo ZnF

5.3.1 Preparação das micelas pela técnica de dissolução direta do fármaco e DSPE-PEG

Para a escolha da técnica de preparo das micelas foi incialmente buscados na literatura científica trabalhos que demonstrassem a incorporação de fármacos altamente hidrofóbicos, como a ZnF, em função das micelas de DSPE conjugada a diversos tamanhos de cadeias de polietilenoglicol (PEG) (LUKYANOV et al., 2002; SIBATA; TEDESCO; MARCHETTI, 2004; SEZGIN; YUKSEL; BAYKARA, 2006; SEZGIN-BAYINDIR et al., 2016; SUN et al., 2016).

A preparação das micelas pela técnica de dissolução direta do fármaco na solução de agente solubilizante é mais econômica e industrialmente escalonável do que outras técnicas (KORE et al., 2014; REDDY et al., 2015; MAIBACH; DRAGICEVIC, 2016). Entretanto, foi observado que o preparo de micelas de DSPE-PEG por essa técnica resultou em diminutas concentrações de ZnF solubilizadas nas micelas de DSPE-PEG.

As micelas de ZnF preparadas pela dissolução direta apresentaram tamanho médio de 99,6 ± 17,5 nm, PdI de 0,27 ± 0,03, população bimodal, potencial zeta de - 3 ± 12 mV e concentração de ZnF solubilizada de apenas 1,1 ± 0,8 µg/mL (n=3). De fato, em busca na literatura foi encontrado que essa técnica é comumente associada à ineficiente incorporação de fármacos (KORE et al., 2014; MAIBACH; DRAGICEVIC, 2016). A elevada lipofilicidade da ZnF (log K_{óleo/água} > 8) (DALMOLIN; LOPEZ, 2018) pode ter impedido sua interação com o meio aquoso e partição para a região hidrofóbica das micelas, apesar do aquecimento e agitação magnética fornecidos ao sistema durante o preparo. A coroa hidrofílica de PEG formada quando o DSPE-PEG é disperso em meio aquoso também pode ter dificultado a partição da ZnF para a região hidrofóbica micelar.

5.3.2 Preparação das micelas pela técnica de hidratação do filme lipídico

A preparação de micelas pela técnica da hidratação do filme lipídico se baseia na solubilização do agente anfifílico e do fármaco lipofílico em solvente orgânico de baixa temperatura de evaporação o qual, posteriormente, é evaporado sob pressão reduzida e rotação. Um filme lipídico formado no balão de fundo redondo é, em seguida, hidratado em uma solução aquosa. A adição da solução aquosa faz com que o agente anfifílico se auto-organize na forma de micelas para se manter disperso no meio (REDDY et al., 2015; MAIBACH; DRAGICEVIC, 2016). Diferentemente do método de dissolução direta, essa técnica está associada a maiores eficiências de incorporação de fármacos (SEZGIN; YUKSEL; BAYKARA, 2006; KORE et al., 2014; REDDY et al., 2015), e por isso, foi selecionada para obtenção das micelas de ZnF.

Micelas brancas (sem fármaco) foram inicialmente obtidas para se analisar a capacidade do método em resultar na formação de micelas a partir de DSPE-PEG. Elas apresentaram tamanho médio de aproximadamente 82 nm, PdI de 0,3 e potencial zeta de -9 mV. Quando obtidas na presença de ZnF, o tamanho médio das micelas foi aparentemente menor do que o das micelas brancas, de 13 nm, mas o PdI dobrou e a população observada de partículas foi polimodal, com potencial zeta de -11 mV. A concentração de fármaco solubilizada foi, no entanto, de 15 µg/mL, ou seja, 15 vezes maior do que a observada com o método de dissolução direta.

Visando melhorar o perfil de distribuição da população nanométrica de micelas, foram obtidas micelas adicionando-se os agentes estabilizantes TPGS, Poloxamer 477, Tween 80 ou Tween 80/Span 80 (1:3) às dispersões. Dos estabilizantes avaliados, apenas a adição da mistura dos tensoativos Tween 80 e Span 80 à solução de hidratação do filme lipídico resultou em um sistema nanoparticulado com distribuição populacional monomodal de tamanho nanométrico e PdI < 0,3 (Figura 12).

Figura 12. Tamanho médio das micelas preparadas pela técnica de hidratação do filme lipídico a partir de 15 mg de DSPE-PEG, 140 µg de ZnF e solução de hidratação do filme lipídico composta por 1% Tween 80/Span 80 (1:3 mol/mol) em tampão HEPES 20 mmol/L pH 7,4.



5.3.3 Delineamento experimental de Box-Behnken

Para controlar adequadamente os parâmetros críticos que pudessem influenciar as características das micelas de DSPE-PEG e ZnF foi empregada a estratégia de *Quality-by-Design* com a utilização de um delineamento experimental. Os fatores que potencialmente poderiam influenciar a qualidade desejada das micelas de ZnF foram definidos com base nos experimentos iniciais e na literatura vigente (MONTANHA et al., 2017; PATIL et al., 2018).

A Tabela 7 mostra a ordem de randomização dos 15 ensaios e os valores experimentais das variáveis dependentes (tamanho, PdI, potencial zeta e concentração de ZnF solubilizada) obtidas a partir da combinação das variáveis independentes (massa de DSPE-PEG, massa de ZnF e % de estabilizantes) de acordo com o delineamento experimental mostrado na Tabela 3.

Ordem de randomização dos ensaios	Tamanho (nm)	Pdl	Potencial zeta (mV)	Concentração de ZnF solubilizada (µg/mL)
7	141	0,285	-28	7,7
12	119	0,274	-27	9,8
9	41	1	-11	5,1
15	155	0,206	-25	9,7
13	152	0,173	-26	9,4
4	138	0,233	-24	12,9
1	152	0,232	-26	3,7
14	128	0,235	-24	6,4
11	116	0,279	-25	3,0
3	137	0,253	-25	7,1
8	116	0,327	-24	5,9
10	12	0,616	-11	15,1
5	0	1	-9	9,2
6	0	1	-10	8,3
2	145	0,204	-25	7,1

Tabela 7 - Características físico-químicas e concentração de ZnF das micelas preparadas com o delineamente do tipo Box-Behnken apresentado na Tabela 3.

Os ensaios do delineamento experimental geraram micelas de ZnF com tamanho médio que variaram de 0 (nenhum sistema formado) a 155 nm, PdI de 0,173 a 1, potencial zeta de -9 a -28 mV e concentração de ZnF solubilizada de 3,0 a 15,1 µg/mL (Tabela 7).

A Tabela 8 mostra as análises estatísticas realizadas por ANOVA para o modelo das respostas, para os termos da equação e para a falta de ajuste de modelo. As equações de cada modelo, os coeficientes de correlação ajustado e predito e os valores de precisão adequadas de cada modelo também estão apresentadas na Tabela 8.

			Respostas						
		Taman	ho (nm) PdI		'dl	Potencia	zeta (mV)	Concentração ZnF	
		(Y	'1)	(Y2)		(Y3)		solubilizada (µg/mL) (Y4)	
		Valor de F	Valor de p	Valor de F	Valor de p	Valor de F	Valor de p	Valor de F	Valor de p
Modelo da	predição	21,51	0,0018	18,8	0,0024	72,3	< 0,0001	12,55	0,0007
	X ₁	0,482	0,5185	0,0006	0,982	2,78	0,1561	0,5308	0,4815
	X ₂	1,17	0,3282	1,79	0,2391	0,0109	0,921	32,16	0,0001
Fatores	X ₃	100,56	0,0002	93,33	0,0002	471,85	< 0,0001	4,95	0,0479
	X ₁ X ₂	0,0789	0,79	0,002	0,9662	0,2923	0,6119	-	-
Interação	X_1X_3	0,6467	0,4578	0,0548	0,8242	3,67	0,1134	-	-
linear	X_2X_3	0,9849	0,3665	4,46	0,0883	0,2416	0,6439	-	-
	X ₁ ²	0,3531	0,5782	2,14	0,2033	0,1311	0,7321	-	-
Interação	X_2^2	0,1277	0,7354	0,8273	0,4048	0,67	0,4503	-	-
quadrática	X_3^2	88,44	0,0002	66,28	0,0005	168,24	< 0,0001	-	-
	Falta de	1,19	0.4864	13,27	0,0709	0,7666	0,6088	0,9926	0,5971
	ajuste								
	Equação	Y1 = 15,7 -	⊦ 419,5 <i>X</i> ₃-	$Y2 = 1,7 - 2,6X_3 + 1,5X_3^2$		Y 3= -11,2 - 47,9X₃ +		$Y4 = 0,7 + 0,05X_2 - 2,8X_3$	
		303,	$1X_{3}^{2}$			27,	$5X_3^2$		
	R ²	0,92	295	0,9	9196	0,9	786	0,7	122
	ajustado								
	R ² predito	0,7	213	0,5	5596	0,9	268	0,5	644

Tabela 8 - Resultados da análise por ANOVA para os modelos, termos da equação e falta de ajuste e um sumário com as equações dos modelos e os coeficientes de correlação ajustado e predito.

Os valores em vermelho enfatizam os valores estatisticamente significativos com p < 0,05, calculados por ANOVA. X₁: massa de DSPE-PEG (mg) em 3 mL de dispersão, X₂: massa de ZnF (μ g) em 3 mL de dispersão, X₃: % de Tween 80:Span 80 (1:3 mol/mol).

Como mostrado na Tabela 8, as respostas Y1, Y2 e Y3 foram ajustadas em um modelo quadrático e a resposta Y4, em um modelo linear (p < 0,05). Os fatores com nível de significância menor do que 0,05 (p < 0,05) foram estabelecidos como significativos e considerados nas equações do modelo. Os fatores com nível de significância maior que 0,05 (p > 0,05) foram negligenciados das equações.

Os testes de hipótese foram realizados com os modelos matemáticos definidos para verificar as diferenças entre os erros residuais e puros, as quais não se mostraram significativas, confirmando a validade dos modelos para construir as estimativas e predições como mostrado pelos valores de p para falta de ajuste (RODRIGUES e IEMMA, 2014).

5.3.3.1 Efeito sobre o tamanho das micelas (Y1)

O tamanho de partícula variou de 0 (formulações 5 e 6), isto é, nenhum sistema formado, a 155 nm (formulação 15) para as diferentes combinações de níveis (Tabela 7). O efeito dos fatores independentes sobre o tamanho de partícula está mostrado na equação quadrática Y1 da Tabela 8. Os gráficos de superfície de resposta tridimensional e bidimensional que permite observar o efeito de interações dos fatores sobre o tamanho das micelas estão mostrados na Figura 13.

Figura 13. Gráficos de superfície de resposta 2D e 3D mostrando o efeito das variáveis independentes sobre o tamanho das micelas: a. Em função da massa de DSPE-PEG e da % de agentes estabilizantes; b. Em função da massa de ZnF e da % de agentes estabilizantes.



Pode-se observar na Tabela 8 que houve uma diferença maior do que 0,2 entre o R² ajustado e predito para a resposta Y1, tamanho das micelas. O R² ajustado é uma medida da quantidade de variação sobre a média, explicada pelo modelo enquanto que o R² predito é uma medida de quão bem o modelo é capaz de predizer um valor de resposta. R² ajustado e R² predito devem apresentar uma diferença de até 0,2 para estarem em concordância aceitável (KAPOOR et al., 2019). A discordância entre esses coeficientes observada para essa resposta e para a resposta Y2 sugere um efeito de bloco grande ou um possível problema com os dados ou com o modelo obtido. No entanto, pode-se avaliar na prática a viabilidade do modelo preparando formulações desejadas em replicatas e comparando as respostas obtidas com as providas pelo modelo (RODRIGUES e IEMMA, 2014), replicatas essas que foram realizadas e serão discutidas mais adiante.

A Tabela 8 mostra também que, para o modelo de predição do tamanho das micelas, apenas o fator X_3 , isto é, a % de agentes estabilizantes, influencia significativamente a resposta. A equação Y1 e a Figuras 13 mostram que o tamanho

das micelas aumenta com o aumento de X₃ a partir de concentrações baixas até concentrações intermediárias. Acredita-se que as moléculas de estabilizantes interajam com a região hidrofóbica dos fosfolipídios, em menor extensão, e com a coroa de PEG das micelas, em maior extensão, aumentando assim o tamanho das micelas de DSPE-PEG em função de sua concentração. Nas concentrações mais altas de X₃, o aumento das micelas parece, no entanto, começar a decrescer. É muito provável que um excesso dos tensoativos estabilizantes passem a formar micelas próprias e não mais a interagir com as micelas de DSPE-PEG. A formação dessas micelas de tensoativos, muito provavelmente menores do que as formadas com o DSPE-PEG, levam a um aumento do PdI da dispersão e a diminuição do tamanho médio das partículas.

5.3.3.2 Efeito sobre o PdI das micelas (Y2)

O PdI das micelas variou de 0,173 (formulação 13) a 1 (formulações 5, 6 e 9) para as diferentes combinações de níveis (Tabela 7). O efeito dos fatores independentes sobre o PdI está mostrado na equação quadrática Y2 da Tabela 9 e os gráficos de superfície de resposta tridimensional e bidimensional para o efeito de interações dos fatores sobre o PdI das micelas estão mostrados na Figura 14.

Figura 14. Gráficos de superfície de resposta 2D e 3D mostrando o efeito das variáveis independentes sobre o PdI: c. Em função da massa de DSPE-PEG e da % de agentes estabilizantes; d. Em função da massa de ZnF e da % de agentes estabilizantes.



Da mesma forma que para o tamanho de partículas, o PdI, como mostra a Tabela 8, é influenciado apenas pelo fator X₃, isto é, pela % de agentes estabilizantes. Pode-se observar na Figura 15 que o aumento de X₃ até concentrações intermediárias causa redução dos valores de PdI, mas se o aumento de X₃ continua, o valor de PdI aumenta. A inserção de moléculas de estabilizantes na coroa de PEG das micelas pode aumentar seu tamanho, como observado na Figura 13, mas também causar uma melhora na distribuição populacional das partículas, possivelmente dificultando as eventuais trocas de moléculas de fosfolipídios entre partículas vizinhas. Seu excesso, no entanto, como já discutido para o tamanho de partículas, pode levar a formação de micelas menores compostas apenas por tensoativos, aumentando o PdI da dispersão.

5.3.3.3 Efeito sobre o potencial zeta das micelas (Y3)

O potencial zeta das micelas variou de -9,0 (formulação 5) a -28 mV (formulação 7) para as diferentes combinações de níveis (Tabela 7). O efeito dos fatores independentes sobre o potencial zeta está mostrado na equação quadrática

Y3 da Tabela 8 e os gráficos de superfície de resposta tridimensional e bidimensional para o efeito de interações dos fatores sobre o potencial zeta das micelas estão mostrados na Figura 15.

Figura 15. Gráficos de superfície de resposta 2D e 3D mostrando o efeito das variáveis independentes sobre o potencial zeta: e. Em função da massa de DSPE-PEG e da % de agentes estabilizantes; f. Em função da massa de ZnF e da % de agentes estabilizantes.



Novamente, apenas o fator X₃, isto é, a % de agentes estabilizantes influenciou significativamente a resposta. A equação Y3 e a Figura 16 sugerem que o potencial zeta se torna mais negativo à medida que X₃ aumenta. O aumento da carga superficial negativa das micelas pode ser atribuída as interações do Tween 80/Span 80 com o DSPE-PEG. Essas interações alteram a distribuição de íons do tampão e aumentam, em módulo, o potencial zeta. Além da estabilidade estérica da coroa de PEG das micelas, a estabilidade elétrica adicional adquirida pela adição dos tensoativos pode ser vantajosa para micelas, pois micelas de DSPE-PEG (sem estabilizantes) se mostraram instáveis com formação de precipitado em solução aquosa quando armazenadas por um período maior que sete dias a 25° C (JOHNSSON; HANSSON; EDWARDS, 2001). Dessa forma, a adição de Tween 80 e

Span 80 como estabilizantes pode conferir estabilidade eletro-estérica às micelas e evitar o problema de precipitação da nanopartícula.

5.3.3.4 Efeito sobre a concentração de fármaco solubilizada (Y4)

A concentração de ZnF solubilizada nas micelas variou de 3 (formulação 11) a 15,1 µg/mL (formulação 10) para as diferentes combinações de níveis (Tabela 7). O efeito dos fatores independentes sobre a concentração de fármaco solubilizada está mostrado na equação linear Y4 da Tabela 8 e os gráficos de superfície de resposta tridimensional e bidimensional para o efeito de interações dos fatores sobre a concentração de ZnF nas micelas estão mostrados na Figura 16.

Figura 16. Gráficos de superfície de resposta 2D e 3D mostrando o efeito das variáveis independentes sobre a concentração de ZnF: g. Em função da massa de DSPE-PEG e da % de agentes estabilizantes; h. Em função da massa de ZnF e da % de agentes estabilizantes.



A equação Y4 da Tabela 8 mostra que a concentração de ZnF solubilizada na dispersão micelar é influenciada linearmente pelos fatores X_2 e X_3 isto é, pela massa de ZnF e pela % de agentes estabilizantes. Pode-se observar na Figura 16 que o aumento de X_2 causa um aumento gradual na concentração de ZnF solubilizada, como esperado. Ou seja, a formação de um filme lipídico com mais ZnF (X_2) resulta

numa maior concentração de ZnF solubilizada na dispersão micelar. O aumento de X_3 , no entanto, reduz a resposta. Esse resultado sugere que os tensoativos competem com o fármaco pela micela de DSPE-PEG; assim, o aumento de sua porcentagem na dispersão resulta na diminuição da solubilidade do fármaco no meio. Esse resultado confirma a hipótese de que os tensoativos interagem com a micela, alterando seu tamanho (Figura 13), seu PdI (Figura 14) e seu potencial zeta (Figura 15) em função de sua concentração.

5.3.4 Otimização da formulação micelar

As micelas de ZnF foram otimizadas usando a função de desabilidade do *software* Design Expert, baseando-se na proximidade da função de desejabilidade de 1. A desejabilidade é uma função objetiva que varia de 0 (fora dos limites) até 1 (na meta) em que, para as várias respostas e fatores, as metas são combinadas em uma função denominada desejabilidade. A otimização numérica serve para encontrar um ponto que maximiza a função de desejabilidade. Na prática, não é necessário obter um valor de desejabilidade muito alto. O valor é completamente dependente de quão próximos os limites inferior e superior são definidos em relação ao ótimo real. O objetivo da otimização numérica é encontrar um bom conjunto de condições que atendam a todas as metas, e não atingir um valor de desejabilidade de 1,0. Resumidamente, a função de desabilidade é simplesmente um método matemático para encontrar o produto ótimo.

Com base nas respostas e suas interações obtidas pelo delineamento experimental e tendo como meta obter micelas de tamanho e PdI mínimos, potencial zeta negativo e o máximo de ZnF solubilizada nas micelas, mas com algumas restrições com relação às variáveis independentes, de acordo com a Tabela 9, a desejabilidade obtida foi de 0,756.

	Restrições				
			Limite	Limite	
	Objetivo	Prioridade	inferior	superior	
Variáveis independente					
X1: massa de DSPE-PEG (mg)	Maximizar	-	-1	+1	
X2: massa de ZnF (µg)	No intervalo	-	-1	+1	
X3: % estabilizantes (w/v)	Fixo em 0,5%	-	-	-	
Variáveis dependentes					
Tamanho (nm)	Minimizar	Alta	100	150	
Pdl	Minimizar	Alta	0,1	0,3	
Potencial zeta (mV)	Maximizar	Alta	-28	-9	
Concentração de ZnF solubilizada	Maximizar	Alta	3	15	
(µg/mL)					

Tabela 9 - Otimização das micelas de ZnF

A % de estabilizante foi fixada em 0,5% em virtude da possibilidade dos estabilizantes (tensoativos) competirem com o fármaco pela micela, como discutido anteriormente, diminuindo a solubilidade da ZnF. A ausência total dos estabilizantes, no entanto, prejudica a distribuição das partículas, aumentando o PdI e podendo resultar na precipitação do DSPE-PEG (JOHNSSON; HANSSON; EDWARDS, 2001). Considerou-se que a maximização da massa de DSPE-PEG auxiliaria na melhor incorporação da ZnF na formação do filme lipídico, primeira etapa do processo de obtenção da micela. A massa de ZnF adicionada foi estabelecida no intervalo porque independente de sua concentração um excesso de ZnF precipitava no final do preparo das micelas, indicando que a menor massa adicionada já poderia resultar em máxima solubilização do fármaco.

Os limites inferior e superior estabelecidos para as variáveis dependentes (Tabela 9) foram definidos de acordo com os resultados obtidos nos 15 ensaios realizados no delineamento experimental (Tabela 7). O tamanho de partícula é um parâmetro crítico que influencia a permeação de fármacos através das camadas da pele, assim foi estabelecido obter micelas com tamanho entre 100 e 150 nm. Valores de PdI entre 0,1 e 0,3 indicam alto grau de homogeneidade na distribuição da população de nanopartícula. Micelas com maiores valores de potencial zeta em

módulo e com maior massa de fármaco solubilizada são necessários para conferir estabilidade elétrica e garantir a penetração cutânea e internalização do fármaco em concentrações adequadas nas células-alvo, respectivamente.

Com a desejabilidade estabelecida, o software usado para análise das respostas gerou uma otimização gráfica, sobrepondo os gráficos de curvas de níveis das respostas críticas em um só, fornecendo um gráfico de sobreposição contendo duas regiões (Figura 17). A região em amarelo é o espaço de interesse definido a partir das restrições para as variáveis independentes e dependentes aplicadas (Tabela 10) e a região em cinza é a área onde os valores de respostas não se encaixam nos critérios de qualidade do produto.

Figura 17. Gráfico do espaço de interesse (em amarelo) em função da desejabilidade para as micelas otimizadas.



Com base na Figura 17, definiu-se a composição da formulação de micelas como mostrado na Tabela 10. Usando as equações do delineamento experimental, o software previu os valores de tamanho, PdI, potencial zeta e ZnF solubilizada que seriam obtidos a partir da composição micelar definida (Tabela 10).

Tabela 10 - Composição da formulação, para o preparo de 3,0 mL de micelas, para se obter as respostas desejadas e os intervalos estatísticos de predição para confirmação do modelo.

Formulação					
Variável Independente	Níveis otimizados				
A: DSPE-PEG (mg)	19,99				
B: ZnF (μg)	210				
C: % Tween 80/Span 80 (3:1)	0,5				
Respostas					

Variáveis Dependentes	Predito \pm DP Observado \pm DP ^a		Intervalo de	
			predição ^b (95%)	
Tamanho (nm)	136,6 ± 15,5	138 ± 10	95,2 a 178	
PdI	$0,18 \pm 0.09$	$0,25 \pm 0,01$	-0,005 a 0,42	
Potencial zeta (mV)	-25,0 ± 1,0	-27 ± 1	-27,7 a -22,3	
ZnF solubilizada (µg/mL)	11,9 ± 1,8	13 ± 2	8,68 a 15,05	

^a Determinações realizadas em quadruplicata. ^bComparação por intervalo bilateral, α =0,05.

Para validar o modelo, as formulações foram preparadas conforme definido, em quadruplicada, e caracterizadas quanto as variáveis dependentes pesquisadas. Como pode ser observado na Tabela 10, os valores obtidos experimentalmente ficaram dentro do intervalo de predição e foram estatisticamente semelhantes (teste T de Student pareado, p>0,05) aos previstos pelo modelo, evidenciando sua ótima capacidade de predição usando o delineamento experimental de Box-Behnken.

5.4 Caracterização das formulações contendo ZnF

5.4.1 Caracterização físico-química

A Tabela 11 mostra o tamanho das partículas e homogeneidade das micelas e da emulsão de ZnF após análise por DLS e NTA.

	Características						
	Tamanho por		Tamanho			Potencial	
	DLS ou	Pdl	por NTA	SPAN	Número de	zeta	
Formulação [§]	difração a		(nm)		partículas/mL	(mV)	
	laser						
Micela	134 ± 7,5 nm	0,27 ± 0,01	-	-	-	-26 ± 1	
Branca							
Micela de	138 ± 10 nm ^a	0,25 ± 0,01	206 ± 7.5	0,73 ± 0,09	$6,6 \times 10^{11} \pm$	-27 ± 1	
ZnF					1,86 x 10 ¹¹		
Emulsão de	37 ± 21 µm	-	-	1,64 ± 0,22	-	- 6,6 ± 3	
ZnF							

Tabela 11 - Caracterização físico-química das micelas contendo ou não ZnF e da emulsão de ZnF.

[§]Composição: 2,4 mmol/L DSPE/PEG, 0,5% de Tween 80/Span 80 (3:1) e 13 ± 2 μ g/mL de ZnF solubilizada quando presente. Resultados foram expressos como média ± desvio padrão da média (SD) (n=3). (a) indica diferença significativa no tamanho das micelas medida com o DLS e o NTA (p <0,05; teste T de Student não pareado).

Pode-se observar na Tabela 11 que a adição de ZnF às micelas não alterou seu tamanho e polidispersão significativamente quando analisadas por DLS (teste T de Student, p >0,05). Na análise por NTA, as micelas de ZnF apresentaram tamanho médio superior em relação às micelas medidas por DLS. Isso se deve ao fato de que no NTA, o diâmetro hidrodinâmico das partículas é medido de forma individual, isto é, partícula por partícula, enquanto que no DLS a intensidade do espalhamento da luz do conjunto de partículas é usada para o cálculo do tamanho hidrodinâmico das partículas. O PdI obtido pela análise do DLS e o SPAN calculado a partir do NTA foram menores de 0,3 e 1, respectivamente, confirmando o alto grau de homogeneidade no tamanho de partícula de população nanométrica (BENDER et al., 2012; RIBEIRO et al., 2018). Não houve diferença no valor de potencial zeta entre as micelas brancas e as micelas com ZnF, o que sugere que o incorporação do fármaco não influencia a carga superficial das micelas.

A emulsão do tipo óleo em água de ZnF mostrou tamanho de gotícula de aproximadamente 37 µm, baixo grau de homogeneidade na distribuição da população de gotículas, demonstrados pelo valor de SPAN de 1,64 e potencial zeta levemente negativo. O tamanho micrométrico da emulsão de ZnF preparada com 20% (m/v) vaselina líquida e 5% Tween 80 e Span 80 (1: 3 mol/mol) corrobora com resultados encontrados na literatura de emulsão de óleo de argan (10% m/v) e 6%

(m/v) de Tween 80 e Span 80 (YAGHMUR et al., 1999). Valores de índice de polidispersão ou potencial zeta para a emulsão preparada não foram reportados no trabalho de Yaghmur e colaboradores (1999). Diferentemente do valor de potencial zeta levemente negativo encontrado para a emulsão de ZnF, emulsões do tipo óleo em água, estabilizadas por 3,5% (m/v) de Tween 80 e Span 80 e contendo de 28% (m/v) de fase oleosa, composta por vaselina líquida, miristato de octildodecil e álcool cetílico, mostraram potencial zeta negativo entre -30 e -40 mV para as diferentes proporções de tensoativos estudadas (HONG; KIM; LEE, 2018).

As características físico-químicas das dispersões micelares podem ser modificados dependendo do modo de preparo. Dispersões de DSPE-PEG 2000 com diferentes proporções de fosfatidilcolina de ovo, por exemplo, obtidas pelo método de hidratação do filme lipídico, que tradicionalmente dariam origem a lipossomas, resultaram em micelas após serem submetidas a ciclos de extrusões através de um filtro de seringa (SUN et al., 2016). Sezgin-Bayindir e colaboradores investigaram a influência do comprimento da porção hidrofóbica e hidrofílica de nove polímeros anfifílicos no preparo de sistemas de liberação micelar e avaliaram a internalização desses sistemas de liberação em células endoteliais de cérebro murino (linhagem bEnd 3) com o marcador fluorescente rodamina. Utilizando o método de substituição de solvente, os autores obtiveram micelas de DSPE-PEG 2000 (sem adição de estabilizantes) com tamanho igual a 159 nm, Pdl de 0,198 e potencial zeta negativo de -47 mV (SEZGIN-BAYINDIR et al., 2016), condizentes com os resultados encontrados para as micelas de DSPE-PEG/Tween 80 e Span 80 obtidas nesse trabalho. Além do tipo de método de obtenção das micelas, o tamanho das micelas é um fator que também depende de parâmetros do próprio método de preparo, como tempo, velocidade de rotação, tipo de solvente orgânico, processo de evaporação de solvente e outros (SEZGIN-BAYINDIR et al., 2016). A densidade da coroa formada pelas cadeias de PEG, determinada pela massa de PEG utilizada, também é outro fator que pode influenciar algumas características das micelas, como tamanho e eficiência de solubilização de fármacos (SEZGIN-BAYINDIR et al., 2016).

Sibata e colaboradores, visando desenvolver um sistema de liberação com longo tempo de circulação sanguínea contendo ZnF, prepararam e caracterizaram fotofisicamente micelas de DSPE-PEG 5000/ZnF. Utilizando a técnica de hidratação filme lipídico, os autores obtiveram micelas de 163 nm contendo 5 µmol/L de ZnF (\cong 3 µg/mL), sem a adição de estabilizantes. Os valores de PdI e potencial zeta das

micelas de DSPE-PEG 5000/ZnF não foram informados no trabalho. (SIBATA; TEDESCO; MARCHETTI, 2004).

Uma das principais vantagens de se utilizar fosfolipídios conjugados ao PEG para obtenção de micelas está na menor CMC que eles conferem aos lipídios. Como discutido no item 5.2, a menor CMC confere maior estabilidade termodinâmica às micelas quando diluídas. O PEG também pode dificultar a liberação do fármaco da micela, sustentando-a, reduzir a agregação das micelas em virtude da repulsão estérica e evitar o efeito corona, ou seja, a adsorção de proteínas em sua superfície em meio biológico (CHE et al., 2015). Contudo, a escolha para obtenção de um sistema de liberação a partir do DSPE-PEG neste trabalho foi feita em função de sua característica hidrofílica e baixa CMC, que permitiriam o uso de menor quantidade do fosfolipídio e confeririam as micelas maior hidrofilicidade para veiculação posterior por sonoforese, a qual será melhor discutida posteriormente.

Micelas compostas por fosfolipídios peguilados, como o DSPE-PEG, estão no foco de investigação de diversos grupos de pesquisa e muitos achados promissores têm sido reportados sobre esses sistemas (RUPP; STECKEL; MÜLLER, 2010a; SEZGIN-BAYINDIR et al., 2016; SUN et al., 2016; ELSAID et al., 2017). Mas é importante esclarecer que fosfolipídios se organizam tipicamente em estruturas de bicamada, na forma de vesículas, e não em micelas de núcleo hidrofóbico, quando dispersos em meio aquoso. Isso se deve às longas cadeias carbônicas dos fosfolipídios, que conferem a molécula uma geometria quase cilíndrica, que tende a se empacotar formando superfícies retas e não cônicas, como as encontradas nas estruturas micelares (LICHTENBERG; OPATOWSKI; KOZLOV, 2000). Entretanto, sob condições específicas relacionadas ao preparo e a adição de determinadas substâncias a formulação, por exemplo tensoativos, as estruturas fosfolipídicas vesiculares podem se transformar em estruturas micelares, ou seja, pode ocorrer a micelização das vesículas. Essa transformação ou comportamento de fase ocorre em misturas de fosfolipídios e tensoativos e é de suma importância para a compreensão do processo de solubilização de fármacos (RUPP; STECKEL; MÜLLER, 2010b).

A combinação de fosfolipídios e tensoativos pode resultar na formação de agregados mistos organizados tanto na forma de micelas quanto na forma de lamelas ou vesículas, dependendo da relação entre esses dois componentes. Em geral, para uma dada concentração de fosfolipídio, a sua mistura com o tensoativo

formará agregados lamelares em baixas concentrações de tensoativo, agregados micelares em concentrações relativamente alta de tensoativo, e uma mistura desses dois tipos de agregados em uma concentração intermediária de tensoativo (LICHTENBERG; OPATOWSKI; KOZLOV, 2000).

O Tween 80 e o Span 80 usados como tensoativos nas dispersões micelares obtidas nesse trabalho tem MM de aproximadamente 1310 e 429 g/moL, respectivamente. Como foram usados 0,5% da mistura de Tween 80/Span 80 (1:3 mol/mol) na dispersão micelar, aproximadamente 3 mmol/L de cada um deles estavam presentes na formulação final. Com 2,4 mmol/L de DSPE-PEG (20 mg em 3 mL, MM_{DSPE-PEG} = 2788) na dispersão final otimizada, a proporção molar dos tensoativos/DSPE-PEG foi de aproximadamente 2,5:1. Essa alta proporção de tensoativos associada a técnica de preparo do sistema, de hidratação do filme lipídico, leva a supor que os tesoativos solubilizaram parte das bicamadas lipídicas formadas pelo DSPE-PEG em meio aquoso e deram origem a micelas. Na tentativa de confirmar esse arranjo, a morfologia das dispersões otimizadas obtidas foi analisada por MET (Figura 18).



Figura 18. Fotomicrografias obtidas por MET das micelas de ZnF (100.000x).

Quando observadas por MET, as micelas de DSPE-PEG/Tween 80:Span 80 aparecem como estruturas esféricas com tamanho de 25 nm (Figura 18), corroborando com resultados obtidos por outros autores para dispersões de DSPE- PEG contendo ou não tensoativos (SEZGIN-BAYINDIR et al., 2016; SUN et al., 2016; ELSAID et al., 2017). O núcleo e a coroa hidrofílica das micelas não podem ser distinguidos nas imagens apresentadas na Figura 18 devido ao curto comprimento do bloco hidrofílico (PEG) e ao baixo contraste na densidade eletrônica entre os blocos de polímero, portanto a determinação do tamanho das micelas por MET não contabiliza a porção da coroa hidrofílica. Ainda, as análises por MET são realizadas com as micelas secas sobre a lamínula. Sendo assim, seu volume hidrodinâmico não é levado em consideração nessa análise, por isso o tamanho diminuto quando comparado ao obtido a partir de análises por DLS e NTA (Tabela 11). No entanto, algumas estruturas na forma de bastonetes com tamanho de aproximadamente 150 nm e outras de 60 nm também puderam ser visualizadas na MET. Uma explicação para a formação de tais estruturas agregadas é que elas tenham se formado durante a evaporação da água realizada para a análise. Com ela há o aumento da concentração de eletrólitos e outros íons presentes na dispersão, reprimindo a repulsão eletrostática e promovendo a agregação de partículas. Além disso, o PEG pode induzir a fusão de lipídios no estado seco e consequentemente, levar a formação dessas estruturas (SUN et al., 2016).

5.4.2 Concentração de ZnF solubilizada nas micelas

As micelas otimizadas, obtidas com 210 μ g de ZnF em 3 mL de formulação final (70 μ g/mL) solubilizaram aproximadamente 13 μ g/mL de ZnF (Tabela 11). Dessa forma a eficiência de encapsulação (EE%) do sistema micelar foi próxima a 20%. Assume-se que a ZnF esteja solubilizada principalmente no núcleo hidrofóbico das micelas, mas sua presença na coroa mais hidrofílica não pode ser negada apesar de não ter sido observada nenhuma alteração do potencial zeta entre as micelas brancas e as micelas contendo ZnF (Tabela 11).

Vale salientar que a capacidade de sistemas micelares em solubilizar compostos lipofílicos depende diretamente da característica e do tamanho da porção hidrofóbica do polímero. Esses fatores podem influenciar as interações intermoleculares entre o fármaco e o polímero, que consequentemente, afetam o tamanho das micelas e a quantidade de fármaco que pode ser incorporado (MAIBACH; DRAGICEVIC, 2016).

Micelas de DSPE-PEG 5000 contendo ZnF, mas sem a adição agentes estabilizantes, solubilizaram 5 μmol/L de ZnF, ou seja, aproximadamente 3 μg/mL
(SIBATA; TEDESCO; MARCHETTI, 2004). As micelas otimizadas obtidas em nosso trabalho foram capazes de solubilizar, portanto, 4,3 vezes mais ZnF. Mas se comparada com trabalhos que utilizam sistemas de liberação que contém uma fase oleosa, como os sistemas emulsionados, a concentração de ZnF solubilizada nas micelas é quase 4 vezes menor: concentrações de 50 µg/mL (DALMOLIN; LOPEZ, 2018) e de 35 µg/mL (DE OLIVEIRA DE SIQUEIRA et al., 2017) de ZnF foram encapsuladas em nanoemulsões. Apesar da concentração de fármaco solubilizado nesses sistemas ser maior do que nas micelas, a fase lipídica que os compõe pode prejudicar o transporte sonoforético do fármaco através da pele devido a oclusão das LTRs formadas na pele pelo LFU. Alguns estudos tem indicado que o transporte sonoforético de fármacos a partir de sistemas de liberação com alto teor lipídico, como nanocarreadores lipídicos e lipossomas, pode resultar em menor penetração de fármaco (DAHLAN; ALPAR; MURDAN, 2009). Essa influência do conteúdo lipídico das formulações utilizadas na sonoforese na penetração cutânea da ZnF foi avaliado em nosso trabalho e será discutido mais adiante.

A solubilização da ZnF em meio aquoso com a utilização de sistemas de liberação é importante tanto para sua veiculação tópica como para sua atividade sonodinâmica em meio biológico. Sabe-se que a agregação exacerbada das moléculas de ZnF suprime sua atividade fotodinâmica (SIBATA; TEDESCO; MARCHETTI, 2004). Entretanto, ainda não se reconhece o efeito da agregação dos agentes sonossensibilizantes sobre a eficácia da TSD devido às diversas vias pelas quais acredita-se que a TSD possa elicitar a formação de ROS.

5.5 Influência dos meios de acoplamento na atividade cavitacional do LFU

A cavitação acústica inercial é o mecanismo mais importante envolvido no aumento da permeabilidade da pele usando LFU (MITRAGOTRI; KOST, 2004; POLAT; BLANKSCHTEIN; LANGER, 2010; POLAT et al., 2011b). Usando o método dosímetro de KI, a atividade cavitacional produzida pelo LFU foi avaliada em diferentes meios de acoplamento pelo monitoramento da formação de radicais hidroxila. Neste método, quando a solução de KI é sonicada, radicais hidroxila são formados, os quais oxidam os íons iodeto (I⁻), formando I₂. O excesso de íons I⁻ presente na solução reagem com I₂, originando íons triiodeto (I⁻₃). A concentração de

 Γ_3 pode ser quantificada por espectrofotometria no λ de absorção de 350 nm (EBRAHIMINIA; MOKHTARI-DIZAJI; TOLIYAT, 2016).

A Figura 19 mostra os valores de absorbância para o íon triiodeto em 350 nm após a sonicação de uma solução aquosa, do gel de HEC e das micelas brancas de DSPE-PEG desenvolvidas.

Figura 19. Avaliação da atividade de cavitação inercial usando o método do dosímetro de KI nos diferentes meios de acoplamentos.



O teste de normalidade de Shapiro-Wilk mostrou que os valores experimentais provêm de uma população de distribuição Gausiana. Os resultados foram analisados estatisticamente por análise de variância ANOVA, seguido pelo teste de Tukey. (*) apresenta diferença estatística significativa com p < 0,05 (n = 3 determinações para cada amostra). As barras de erro representam o desvio padrão.

A Figura 19 mostra que o gel de HEC e as micelas aumentaram 2,6 e 1,8 vezes, respectivamente, a atividade cavitacional do LFU em relação a solução aquosa. Não foi possível determinar a atividade cavitacional do meio de acoplamento tradicional na LFU, ou seja, da solução contendo 1% de SLS. A alta concentração de SLS no meio, mesmo após sua diluição, interferiu na absorbância do KI₃ demonstrando, portanto, uma limitação da utilização do método de KI para demonstração indireta da atividade de cavitação.

A maior atividade cavitacional verificada nos meios de acoplamento do gel de HEC e das micelas de DSPE-PEG implica em maior perturbação na estrutura do EC da pele, maior formação de LTRs e, consequentemente, maior permeabilidade da pele a fármacos.

O resultado da maior atividade cavitacional no gel de HEC suporta os resultados reportados na literatura em que o uso do gel de HEC como meio de resultou em maior acoplamento porcentagem de LTRs distribuídas homogeneamente na superfície da pele em comparação com o uso do meio de acoplamento tradicional composto por SLS (PEREIRA, 2015; PEREIRA; RAMOS; LOPEZ, 2017). Essa maior atividade cavitacional verificada na presença do gel de HEC pode ser explicada pela i) maior energia das microbolhas e ii) pela menor taxa de dissolução das microbolhas de cavitação no meio mais viscoso quando comparado a um meio menos viscoso. Juntamente, esses dois fatores podem fazer com que as microbolhas de cavitação formadas durante um ciclo de ultrassom estejam presentes nos ciclos subsequentes, aumentando assim a população de microbolhas e a ação LFU sobre a pele (PEREIRA; RAMOS; LOPEZ, 2017).

Outra explicação para maior atividade cavitacional do gel é com relação a possibilidade de maior incorporação de ar neste meio de acoplamento. O fluxo do estradiol através da pele, por exemplo, aumentou após o pré-tratamento da pele com LFU usando como meio de acoplamento uma solução aerada em relação ao pré-tratamento com a mesma solução não-aerada (MITRAGOTRI et al., 1995).

A influência das micelas na atividade cavitacional do LFU foi menor do que a do gel, mas maior do que a da solução. A menor atividade em relação ao gel pode ser explicada pela menor viscosidade da solução micelar, semelhante à da água, mas também pela presença de tensoativos na micela. É sabido que os tensoativos diminuem o número e o diâmetro das bolhas de ar formadas no meio de acoplamento (MITRAGOTRI, 2000; POLAT et al., 2011b). Essa diminuição é explicada em virtude da capacidade dos tensoativos em reduzirem a tensão superficial de soluções aguosas. A tensão superficial reduzida impacta significativamente na oscilação das bolhas de cavitação, pois aumenta a taxa de expansão e reduz a taxa de compressão do meio (POLAT et al., 2011b), o que acaba por estabilizar as bolhas de cavitação. Dessa forma, a utilização de tensoativos no meio de acoplamento pode levar a formação de uma população maior de microbolhas de cavitação com menor tamanho, mas, como resultado, há uma diminuição da cavitação inercial, devido à presença de uma população de bolhas de cavitação menos energética (LEE et al., 2005; POLAT et al., 2011b).

A inserção dos tensoativos nas micelas parece não reduzir tanto a atividade cavitacional como a solução de SLS a 1%. Apesar de não ter sido possível

determinar a atividade cavitacional do SLS pelo método do dosímetro de KI, estudos preliminares realizados com folhas de papel alumínio mostraram que as marcas da cavitação inercial deixadas nas folhas com a aplicação do LFU foram maiores quando as micelas foram usadas como meio de acoplamento do que quando a solução de SLS foi usada.

Já o aumento da atividade cavitacional provocado pelas micelas em relação a solução aquosa controle (Figura 19) pode estar relacionado a capacidade de sistemas nanoestruturados em influenciar positivamente sobre o fenômeno de cavitação, servindo de suporte para nucleação ou formação das microbolhas de cavitação acústica. Especificamente, quando sonicado, o meio de acoplamento das micelas brancas contendo ar, pode ter levado um organização das moléculas de DSPE-PEG/Tween 80 e Span 80 na interface ar-líquido, formando microbolhas de ar estabilizadas. Tais microbolhas de ar estabilizadas por DSPE-PEG/Tween 80 e Span 80, facilitariam a formação e o processo da atividade cavitacional inercial neste meio de acoplamento.

Neste contexto, também vale lembrar que os tensoativos presentes na micela também podem penetrar na pele em altas concentrações na presença do LFU funcionando como agentes químicos de penetração cutânea (POLAT et al., 2011b). Assim, a penetração de fosfolipídios e tensoativos na pele, facilitadas pelo LFU, pode: i) aumentar a fluidez do estrato córneo; ii) desorganizar a matriz lipídica; iii) reduzir a distância e a tortuosidade que o fármaco percorre no o estrato córneo para alcançar a epiderme viável; iv) aumentar o coeficiente de difusão da pele; v) aumentar o coeficiente de partição pele/meio de acoplamento do fármaco (POLAT et al., 2011b). Dessa forma, acredita-se que o LFU possa interagir sinergicamente com as substâncias tensoativas presentes na micela aumentando a concentração e dispersão delas dentro do estrato córneo (MITRAGOTRI, 2000; POLAT et al., 2012b), provocando a desorganização e fluidificação da matriz lipídica e a formação de regiões ou canais de transporte. Em suma, a soma desse efeitos levaria ao aumento da permeação cutânea de fármacos.

5.6 Estudos de permeação cutânea da ZnF

5.6.1 Resistividade do estrato córneo frente ao contato com o meio receptor

A alta lipofilicidade da ZnF requer a utilização, nos estudos de penetração, de um meio receptor modificado para garantir *sink conditions*. A solubilidade da ZnF na solução composta por 1% de SLS usada como solução receptora nos estudos de penetração é de 12,5 ± 0,1 µg/mL (DALMOLIN; LOPEZ, 2018). Como os experimentos foram realizados com aproximadamente essa mesma concentração de fármaco no doador (1 mL de formulação contendo 13 µg de fármaco), e o volume do receptor das células de difusão era de 16 mL, a concentração de fármaco no receptor, se toda a massa adicionada ao doador atravessasse a pele, seria menor do que os 10% da solubilidade do fármaco requeridos para se manter *sink* conditions, ou seja, essa condição foi garantida.

O SLS é, no entanto, um conhecido promotor de absorção que pode diminuir a integridade da pele quando em contato com ela por longos períodos. Para avaliar por quanto tempo os experimentos de penetração cutânea poderiam ser conduzidos usando o SLS a 1% como meio receptor, a resistividade da pele foi monitorada em função do tempo de contato da pele com essa solução (Figura 20).

Figura 20. Influência do meio receptor 1% SLS (m/v) em solução tampão PBS pH 7,4 sobre a resistividade da pele de orelha de suínos.



O teste de normalidade de Shapiro-Wilk mostrou que os valores experimentais provêm de uma população de distribuição Gausiana. Os resultados foram analisados estatisticamente por análise de variância ANOVA, seguido pelo teste de Tukey. (*)

apresenta diferença estatística significativa em relação ao tempo 0, com p < 0,05 (n = 4 determinações). As barras de erro representam o desvio padrão.

A Figura 20 mostra que após 6 h de contato com a solução que continha SLS, a resistividade da pele reduziu significativamente (One-way ANOVA seguida pelo teste de Tukey, n = 4, p < 0,05) frente ao controle (solução receptora composta apenas por tampão PBS, pH 7,4). Desta forma, a maioria dos experimentos de permeação da ZnF foram realizados por no máximo 6 h. No entanto, a penetração da ZnF a partir das micelas na pele íntegra, não tratada com LFU, também foi realizada por 24 h. Neste caso, no entanto, não foi adicionado SLS na solução receptora para garantir a integridade do estrato córneo neste longo tempo de experimento. Nesses estudos considerou-se que as outras camadas da pele além do estrato córneo forneceriam as condições para que a ZnF pudesse se difundir antes de alcançar a solução receptora.

5.6.2 Influência da formulação na penetração da ZnF: micela versus emulsão

É de suma importância a penetração da ZnF em concentrações adequadas para internalização do fármaco pelas células-alvo, pelo menos até o estrato germinativo da epiderme viável para o tratamento sonodinâmico do câncer de pele, pois é na epiderme onde as células tumorais do carcinoma de célula escamosa, de célula basal e melanoma se desenvolvem (CHUMMUN; MCLEAN, 2017; CRAYTHORNE; AL-NIAMI, 2017). Nos estudos *in vitro*, quanto maior a quantidade de fármaco acumulado nas camadas mais profundas da pele, ou seja, na derme, maiores os indícios de que o fármaco é capaz de se distribuir por toda a epiderme viável e alcançar as células tumorais em altas concentrações. Dessa forma, o desempenho de veiculação da ZnF para a epiderme viável e a derme a partir das micelas e da emulsão, associada ou não ao tratamento sonoforético com LFU, foi avaliada.

A Figura 21 mostra as quantidades de ZnF veiculada pelas micelas e pela emulsão na epiderme viável (A) e na derme (B), após experimentos de 6 h de permeação na ausência e na presença de tratamento sonoforético da pele com LFU.

Figura 21. Efeito das características da formulação na penetração da ZnF na A) epiderme viável e B) derme (n≥5), passivamente e sob os protocolos de prétratamento e tratamento simultâneo.



Α

Os tratamentos com LFU de 20 kHz, 10 ± 0.5 W/cm² e ciclo de trabalho de 50% foram realizados até a resistividade da pele atingir 1,2 \pm 0,1 K Ω .cm² usando gel 1% HEC (modo de pré-tratamento) ou micelas contendo ZnF como meio de acoplamento (tratamento simultâneo). O tratamento sonoforético total durou 4 ± 1 min. O teste de normalidade de Shapiro-Wilk mostrou que os valores experimentais provêm de uma população distribuição Gausiana. resultados foram de Os analisados estatisticamente por análise de variância ANOVA, seguido pelo teste de Tukey: * indica diferença estatística significativa com p < 0,05. (n = 4-7 determinações para cada amostra). As barras de erro representam o desvio padrão.

Na epiderme viável, pode-se observar na Figura 21A que a formulação de micelas foi capaz de entregar mais fármaco do que a emulsão em todos os

protocolos de tratamento. A quantidade de ZnF recuperada da epiderme viável após 6 h de permeações passiva, pré-tratamento com LFU e tratamento simultâneo foi, respectivamente, 27,5, 2 e 5,7 vezes maior quando o fármaco foi veiculado pela micela do que pela emulsão.

Na derme, a quantidade de ZnF que alcançou esta camada a partir das micelas foi 11,2 e 7 vezes maior quando comparada com a emulsão para os tratamentos com o LFU, respectivamente, pré-tratamento e tratamento simultâneo. Por outro lado, na permeação passiva a emulsão veiculou mais ZnF na derme do que a micela (cerca de 3,7 vezes) em 6 horas de permeação.

Passivamente, na ausência do tratamento com o LFU, as micelas foram capazes de facilitar significativamente a penetração da ZnF na epiderme viável quando comparada com a emulsão (Figura 21A), mas a partição da ZnF dessa camada para a derme foi menor do que a conferida pela emulsão (Figura 21B). Assim, a micela colocou 403,5 ng/cm² de ZnF dentro da pele (epiderme viável e derme), mas 47,6% se mantiveram na epiderme viável. Já a partir da emulsão, 43,3 ng/cm² penetraram a pele e se partilharam igualmente entre as duas camadas viáveis. Dessa forma, a micela aumentou significativamente a penetração da ZnF através do estrato córneo em relação a emulsão. Os componentes da micela parecem, no entanto, ter aumentado a interação da ZnF pela epiderme viável, dificultando sua partilha para a derme. Este comportamento pode ser vantajoso no tratamento tópico de doenças que acometam camadas superiores da pele, com menos efeitos adversos decorrentes de uma provável absorção sistêmica proveniente de fármaco na derme. No entanto, para o tratamento de tumores, é importante que o fármaco se difunda por toda a epiderme e derme, pois, em estudos in vitro, a partilha do fármaco lipofílico para a derme sugere que o mesmo não está acumulado apenas nos primeiros estratos da epiderme viável.

Ambas as formulações, micela e emulsão, tinham Tween 80/Span 80 (1:3 mol/mol) em sua composição, mas a porcentagem desses tensoativos era 10 vezes maior na emulsão. Desta forma, não foram os tensoativos que contribuíram para a maior penetração passiva da ZnF através do estrato córneo para a epiderme viável quando a micela foi usada. É o fosfolipídio que a compõe e seu tamanho nanométrico que, possivelmente, facilitaram a penetração do fármaco. Atribui-se ao DSPE-PEG, inclusive, a maior interação da ZnF com a epiderme viável, devido a

afinidade desse fosfolipídio com essa camada lipofílica da pele quando comparada à hidrofílica derme.

O DSPE-PEG tem a capacidade de alterar as propriedades de barreira da pele, se fundir e difundir pelo estrato córneo, desorganizando o empacotamento lipídico da matriz lipídica e promovendo uma alteração das propriedades de solubilidade da pele em relação ao fármaco permeante. Tais efeitos são atribuídos à similaridade da molécula do DSPE com os fosfolipídios naturais da pele (MAHMOUD et al., 2019).

Outros estudos tem destacado o tamanho nanométrico de micelas como uma vantagem para a utilização de sistemas micelares poliméricos na veiculação de fármacos através da pele (BACHHAV et al., 2011) e é claro que a maior quantidade de ZnF que atravessou o estrato córneo a partir das micelas também pode ser atribuída ao menor tamanho de partículas das micelas em relação ao tamanho das partículas da emulsão. Van de Bergh et al. mostraram, por exemplo, a penetração intercelular homogênea de micelas de octaoxietileno lauril ester marcadas com fluoresceína-DHPE (VAN DEN BERGH et al., 1999) ao passo que Honeywell-Nguyen et al. demonstraram a presença de estruturas irregulares e grosseiras provenientes das micelas poliméricas cobrindo uma ampla área da superfície do estrato córneo, mas não nas camadas mais internas da pele (LOAN HONEYWELL-NGUYEN et al., 2002). É necessário enfatizar que a temperatura de transição do polímero também pode desempenhar um papel importante na penetração das micelas através da pele. A baixa temperatura de transição do polímero de DSPE-PEG pode ter mantido o núcleo da micela no seu estado viscoso, conferindo maior flexibilidade para a estrutura micelar (BACHHAV et al., 2011), resultando em uma melhor interação dos constituintes das micelas com o estrato córneo. Os apêndices da pele também podem constituir vias importantes para a penetração cutânea passiva de micelas poliméricas (MAIBACH; DRAGICEVIC, 2016). Nesse caso, porém, uma distribuição mais heterogênea do fármaco é normalmente observada na pele.

Nos experimentos com o LFU, a micela aumentou significativamente a penetração da ZnF em todas as camadas viáveis da pele quando comparada com a emulsão, independente do protocolo de aplicação do ultrassom (Figura 21).

A emulsão se mostrou menos efetiva na veiculação de ZnF nos experimentos com o LFU quando comparada com as micelas, apesar de i) conter 10 vezes mais

tensoativos na formulação do que as micelas, os quais podem agir como promotores da permeação nas não-LTRs, ii) ser formada por gotículas flexíveis potencialmente capazes de adentrar as LTRs micrométricas na pele e ii) possuir elevado poder de oclusão que também favoreceria a penetração da ZnF pelas regiões nãopermeabilizadas.

Assim, acredita-se que a característica hidrofílica das micelas de ZnF possa ter desempenhado uma função primordial na sonoforese. É provável que o baixo teor lipídico da formulação de micelas tenha mantido as LTRs por mais tempo disponíveis ou abertas, permitindo a maior penetração do fármaco através da pele por essas vias. Por analogia, é possível que o maior conteúdo lipídico da emulsão possa ter bloqueado ou reestruturado as LTRs, dificultando a penetração da ZnF por essa via. Assim, a associação do LFU com a emulsão para veicular o fármaco lipofílico não se mostrou mais vantajosa do que a administração passiva. Na derme, o tratamento simultâneo resultou em quantidades similares as encontradas após o tratamento passivo.

No protocolo de pré-tratamento, a penetração da ZnF veiculada com a emulsão foi menor do que a penetração passiva na derme. Esse resultado confirma a hipótese de que a formulação com conteúdo oleoso bloqueia as LTRs e acaba por dificultar a penetração do fármaco. Corrobora também com os trabalhos de Dahlan e colaboradores que observaram a penetração reduzida de antígeno proteico quando a pele foi pré-tratada com LFU, seguido da aplicação dos lipossomas contendo o antígeno (DAHLAN; ALPAR; MURDAN, 2009) e de Pereira com nanocarreadores lipídicos associados a LFU que observaram reduzida penetração de fármacos, limitada às camadas mais superiores da pele (PEREIRA, 2015).

Dessa forma, supõe-se que a característica hidrofílica das micelas de ZnF possa ter facilitado a penetração das micelas íntegras através do estrato córneo pelas LTRs de igual natureza hidrofílica. Acredita-se que ao longo de seu percurso de penetração, as micelas de ZnF que entram nas LTRs perdem sua estrutura devido às tortuosidades que esses canais de transporte sonoforéticos apresentam. Durante esse processo, a ZnF pode então ser liberada para se particionar e se difundir, com o auxílio dos fosfolipídios e tensoativos que compõe a micela, através das LTRs para outros compartimentos da pele ou para a circulação sistêmica.

5.6.3 Influência do tratamento sonoforético na penetração da ZnF a partir das micelas

A Tabela 12 mostra as quantidades de ZnF recuperadas das diferentes camadas da pele a partir das micelas após 6 h de tratamento passivo ou sonoforético da pele com LFU em ambos os modos de pré-tratamento e tratamento simultâneo.

Tabela 12 - Quantidade de ZnF acumulada nas diferentes camadas da pele após 6 h de contato das micelas com a pele sem tratamento (permeação passiva) e após o tratamento com LFU nos protocolos de pré-tratamento e tratamento simultâneo.

Camada da	ZnF acumulada a partir das micelas (ng/cm²)				
pele Permeação		Pré-tratamento	Tratamento		
	passiva		simultâneo		
Estrato córneo	366,0 ± 130,4	98,5 ± 7,6 (n=7) ^b	743,9 ± 306,7 (n=6) ^c		
	(n=5) ^a				
Epiderme viável	395,6 ± 39,2 (n=5)	104,0 ± 12,4 (n=7) ^a	343,7 ± 143,0 (n=6)		
Derme	7,9 ± 1,8 (n=4) [#]	71,7 ± 34,2 (n=7)	324,2 ± 226,8 (n=6) ^a		

Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão da média (n = 4 - 7 determinações). Os tratamentos com LFU de 20 kHz, 10 \pm 0,5 W/cm² e ciclo de trabalho de 50% foram realizados até a resistividade da pele atingir 1,2 \pm 0,1 K Ω .cm² usando gel 1% HEC (modo de pré-tratamento) ou micelas contendo ZnF como meio de acoplamento (tratamento simultâneo). O tratamento sonoforético total durou 4 \pm 1 min. O teste de normalidade de Shapiro-Wilk mostrou que os valores experimentais provêm de uma população de distribuição Gausiana. Os resultados foram analisados estatisticamente por análise de variância ANOVA, seguido pelo teste de Tukey: a, b e c indicam diferença estatística (p < 0,05) em relação aos dados apresentados na mesma linha; # indica diferença estatística (p < 0,05) em relação aos dados apresentados na mesma coluna.

A Tabela 12 mostra que o tratamento passivo, como discutido anteriormente, resultou em uma alta quantidade de fármaco na epiderme viável, semelhante a observada no tratamento simultâneo. A quantidade de fármaco na derme, no entanto, foi 41 vezes menor após o tratamento passivo; diferente do tratamento simultâneo que resultou em quantidades semelhantes de fármaco na epiderme e na derme. O mesmo perfil observado com o tratamento simultâneo foi observado após o pré-tratamento com LFU. Esse, apesar de levar quantidades de ZnF para a epiderme viável menores do que o tratamento passivo, resultou em 9,1 vezes mais ZnF na derme após 6 h do que o tratamento passivo.

A quantidade semelhante de fármaco encontrada na epiderme viável e na derme após os tratamentos sonoforéticos sugere que o estado estacionário de distribuição e penetração do fármaco através da pele com a solução receptora (*steady state*) foi alcançado num curto período de permeação, 6 h, o que não ocorreu para o tratamento passivo.

Acredita-se, desta forma, que tanto no tratamento simultâneo como no prétratamento, houve a permeação de ZnF por toda a extensão da pele e a chegada do fármaco ao compartimento receptor da célula de Franz em virtude do estado estacionário de penetração do fármaco ter sido atingido em ambos os casos, evidenciado pelas quantidades de ZnF similares entre a epiderme viável e derme. Entretanto, não foi possível quantificar a ZnF no meio receptor para comprovar essa pressuposição devido ao grande volume de meio receptor e a sensibilidade do método analítico para quantificação da ZnF.

Se essa hipótese for verdadeira, a maior quantidade de ZnF encontrada na epiderme viável após o tratamento passivo em relação ao pré-tratamento com o LFU se deve, portanto, a permeação mais lenta da ZnF no primeiro caso, que ainda não atingiu o *steady state*. Dessa forma, para se comparar a penetração passiva com a sonoforética é necessário aumentar o tempo de penetração passiva, para que os resultados sejam comparados no estado estacionário. Assim, a penetração da ZnF foi avaliada após 24 h de tratamento passivo (Tabela 13).

Camada da	ZnF acumulada a partir das micelas (ng/cm ²)				
pele	Permeação passiva por 6h	Permeação passiva por 24h			
Estrato córneo	366,0 ± 130,4 (n=5)	470,7 ± 26,2 (n=6) [#]			
Epiderme viável	395,6 ± 39,2 (n=5)	99,8 ± 28,5 (n=5) ^a			
Derme	$7,9 \pm 1,8 (n=4)^{\#}$	138,5 ± 71,6 (n=5) ^a			

Tabela 13 - Quantidade de ZnF acumulada nas diferentes camadas da pele após 6 h e 24 h de contato da formulação micelar de ZnF sem tratamento com LFU (permeação passiva).

Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão da média (n = 4 - 6 determinações). O teste de normalidade de Shapiro-Wilk mostrou que os valores experimentais provêm de uma população de distribuição Gausiana. Os resultados foram analisados estatisticamente por análise de variância ANOVA, seguido pelo teste de Tukey: a indica diferença estatística (p < 0,05) em relação aos dados apresentados na mesma linha; # indica diferença estatística (p < 0,05) em relação aos dados aos dados apresentados na mesma coluna.

A Tabela 13 mostra que quando o tempo de permeação foi aumentado de 6 h para 24 h, a quantidade de fármaco retida na epiderme viável após o tratamento passivo diminuiu ao passo que na derme, aumentou, de forma que se nivelaram após 24 h de experimento, quando atingem o *steady state*. O maior tempo que o fármaco leva para atingir o steady state após o tratamento passivo se deve a menor permeabilidade da pele não tratada com o LFU. O ZnF segue, portanto, rotas mais tortuosas através dos lipídios intercelulares no estrato córneo, levando mais tempo para que o equilíbrio de distribuição e penetração seja atingido em toda a extensão da pele. Pode-se sugerir também que a alta quantidade de ZnF na epiderme viável nas primeiras 6 h de experimento seja resultado do acúmulo de micelas nas regiões lacunares do estrato córneo, demandando de um tempo mais longo para o fármaco difundir da micela e se partilhar pelos outros estratos da pele até atingir suas camadas mais profundas.

Com todos os experimentos no *steady state* é possível comparar as quantidades de ZnF penetradas na derme após os tratamentos passivo e sonoforético. Parar tanto é necessário, no entanto, dividir o valor encontrado pelo tempo de penetração. Desta forma, a quantidade de fármaco encontrada na derme após 24 h de experimento passivo (Tabela 13) foi dividida por 24, resultando em 9,9 ng/cm²/h de ZnF penetrada, e a quantidade aí encontrada após 6 h do pré-tratamento e do tratamento simultâneo com LFU (Tabela 12) foi dividida por 6, resultando em 29,3 e 111,3 ng/cm²/h de ZnF, respectivamente. Pode-se observar então, que, em relação ao tratamento passivo, o pré-tratamento com LFU aumentou a penetração cutânea da ZnF em aproximadamente 3 vezes e o tratamento simultâneo em 11,3 vezes.

O tratamento simultâneo da pele com LFU seguido da permeação das micelas de ZnF foi, portanto, o tratamento que resultou nas maiores quantidades de ZnF em todas as camadas da pele. Essa maior penetração da ZnF nessas camadas da pele com o tratamento simultâneo ocorre por conta tanto da penetração sonoforética através das LTRs como também pelas forças convectivas e da transmissão (*streaming*) acústico induzidas pelo LFU (MITRAGOTRI; KOST, 2004; POLAT et al., 2011b; ITA, 2017). O efeito de convecção e de transmissão acústica do ultrassom sobre o fármaco deriva da pressão acústica criada no meio, que resulta em um fluxo das bolhas de cavitação que, por sua vez, empurram o fármaco contra a pele, forçando sua entrada. Como resultado disso, a extensão de penetração e

distribuição do fármaco na pele é superior quando comparada ao pré-tratamento, onde a penetração sonoforética conta apenas com a formação das LTRs para a entrada e distribuição do fármaco.

São escassos os estudos comparativos que analisam os modos de aplicação da sonoforese, e mais escassos ainda aqueles que avaliam a influência de sistemas de liberação no transporte sonoforético mediado pelo LFU, pois a vasta maioria dos estudos avalia a permeação sonoforérica da fármaco hidrofílicos ou macromoléculas (TEZEL; SENS; MITRAGOTRI, 2003; KUSHNER IV; BLANKSCHTEIN; LANGER, 2008b; POLAT; BLANKSCHTEIN; LANGER, 2010).

Dos trabalhos que compararam a sonoforese simultânea com o prétratamento ou com o tratamento passivo, o tratamento simultâneo, como no nosso trabalho, também se apresentou mais vantajoso. Substâncias hidrofílicas foram avaliadas, no entanto, e apenas na solução receptora. Assim, Tezel et al. (2004) observaram que a LFU simultânea de oligonucletotídeos aumentou 10 vezes a permeação desses através da pele em relação ao pré-tratamento com SLS como meio de acoplamento (TEZEL et al., 2004). Baji et al. (2018) verificaram que a sonoforese simultânea com LFU da gencitabina aumentou 3 vezes a sua permeação em relação ao tratamento passivo (BAJI et al., 2018). Em ambos os trabalhos descritos a formulação foi uma solução simples e o perfil de penetração do fármaco na pele não foi acompanhado. Ainda, as permeações foram comparadas, como realizado em nosso trabalho, dividindo-se os valores encontrados na solução receptora pelo tempo de experimento, mas o tratamento simultâneo foi realizado por um período bem maior do que o realizado nesse trabalho: 10 min, para o oligonucleotídeo, e 30 min, para a gencitabina. No presente trabalho a sonoforese simultânea foi aplicada por apenas 4 ± 1 min, tempo esse necessário para que a pele adquirisse a resistividade padronizada de 1,0 KΩ.cm², seguido das 6 h de permeação passiva da ZnF. Desta forma, o tratamento simultâneo aumentou 4,8 vezes a penetração da ZnF em relação ao pré-tratamento. É importante salientar que a ZnF não é solúvel em água, portanto, é imprescindível a avaliação do sistema de liberação que a carreia, como feito nesse trabalho.

As quantidades de ZnF que penetraram a pele após 6 h do tratamento sonoforético ou 24 h do tratamento passivo já parecem ser suficientes para elicitar uma resposta antitumoral, como demonstrado pelo estudo de Dalmolin (2018). Neste estudo, a ZnF foi veiculada em nanoemulsão em associação com a iontoforese. *In*

vitro, cerca de 40 ng/cm² foram recuperados do conjunto epiderme viável e derme, os quais foram capazes, *in vivo*, em modelo xenográfico de melanoma, reduzir o volume tumoral com a terapia fotodinâmica.

5.6.4 Influência do fluxo convectivo e transmissão acústica induzidso pelo LFU na penetração da ZnF a partir das micelas

Durante a aplicação do LFU no modo simultâneo, isto é, usando como meio de acoplamento a solução ou formulação do fármaco, além do transporte da ZnF através das LTRs que ocorre após o tratamento, ocorre a penetração do fármaco pela convecção e transmissão acústica induzidos pelo ultrassom.

Nas configurações de aplicação *in vitro* do LFU para permeabilização da pele, a distância entre a sonda do ultrassom e a pele foi estabelecida em 10 cm. Uma vez que o comprimento de onda do ultrassom de 20 kHz tem 7,5 cm (POLAT et al., 2011b), a distância entre o ultrassom e pele equivale a aproximadamente 13% do comprimento de onda do ultrassom. Essa curta distância (de 10 mm) corresponde ao primeiro antinodo de pressão do ultrassom e as microbolhas de cavitação tendem a ser empurradas e se mover em favor do gradiente de pressão acústica, isto é, em direção à superfície da pele. As forças de Bjerkness, oriundas do movimento das microbolhas no antinodo do ultrassom, são criadas sob o campo acústico e empurram a molécula do fármaco contra a pele, aumentando a taxa de penetração e difusão do fármaco por convecção (POLAT et al., 2011b).

A entrada do fármaco pelo processo de transmissão acústica é resultado do fluxo unidirecional da solução de acoplamento em resposta à dinâmica das microbolhas presentes no campo acústico, caracterizada por um elevado gradiente de velocidade e estresse de cisalhamento hidrodinâmico. Neste processo, o movimento da formulação contendo fármaco contra a superfície da pele, causado pela presença do campo acústico do ultrassom, também favorece a penetração e difusão da molécula do fármaco (ITA, 2017). Ambos os processo de convecção e transmissão acústica cessam quando a aplicação do ultrassom é descontinuada (MITRAGOTRI; KOST, 2004).

A partir dos experimentos de permeação sob influência do LFU é possível estimar a contribuição da penetração de ZnF por convecção induzida e transmissão acústica levando em consideração que nos experimentos com a pele pré-tratada com gel, a penetração do fármaco ocorre sob domínio apenas das LTRs enquanto

que nos experimentos no modo simultâneo, a penetração da ZnF pode contar tanto com a formação das LTRs quanto com o fluxo convectivo e streaming induzidos pelo ultrassom.

A Tabela 14 mostra as quantidades de ZnF acumuladas em cada camada da pele em função das contribuições das LTRs e dos fluxos convectivo e transmissão acústica induzidos pelo LFU após sonoforese simultânea, calculados de acordo com a Equação 7.

Tabela 14 - Contribuição do fluxo convectivo e da transmissão acústica induzidos pelo LFU simultâneo na penetração da ZnF nas diferentes camadas da pele a partir das micelas.

ZnF (ng/cm²)				
Camada da Pele	Contribuição Global	Contribuição das LTRs	Contribuição dos fluxos convectivo e transmissão acústica	% de convecção e transmissãoo acústica
Estrato córneo	744 ± 307	98 ± 8	645	87
Epiderme viável	194 ± 81	59 ± 7	136	70
Derme	183 ± 128	51 ± 6	132	72

Pode-se observar na Tabela 14 que aproximadamente 70% da quantidade de ZnF que penetrou nas camadas viáveis da pele se deveu ao fluxo convectivo e a transmissão acústica induzidos pelo LFU na sonoforese simultânea.

É importante ressaltar, no entanto, que a contribuição das LTRs foi estimada em função da penetração da ZnF após um experimento de pré-tratamento, no qual foi utilizado como meio de acoplamento gel de HEC no lugar das micelas. Assim, para o cálculo dessa contribuição não se levou em consideração as eventuais alterações que a micela e o próprio DSPE-PEG podem causar nas LTRs e nas não-LTRs. Mas, para efeito de estimativa, fica claro que a contribuição dos fluxos convectivo e streaming são bastante relevantes na penetração da ZnF por LFU.

Especificamente, a aplicação simultânea do LFU e das micelas de ZnF é responsável pelas maiores penetração e extensão de distribuição do fármaco na pele, sendo ambos os processos influenciados pela convecção e transmissão induzidos pelo ultrassom. Na sonoforese simultânea, o fármaco é forçado a adentrar

a pele por esses processos desde a primeira aplicação do ultrassom até a completa permeabilização da pele. A partir de então, o fármaco penetra na pele tanto pelas LTRs como pelas não-LTRs. Essas são formadas sob a influência dos componentes presentes no meio de acoplamento, como as micelas e seus tensoativos e DSPE-PEG, os quais também sofrem influência do fluxo convectivo e transmissão acústica e, como o fármaco, podem penetrar na pele em maior extensão e alterar as LTRs e não-LTRs. Essas regiões alteradas também influenciam a partilha e difusão da ZnF pelas camadas da pele, podendo modificar sua distribuição em relação a penetração pelas LTRs formadas com outro meio de acoplamento (o gel de HEC, por exemplo). Esse processo complexo de partilha e difusão da ZnF e dos componentes da formulação no tratamento simultâneo pode ter colaborado com o alto desvio padrão observado nos estudos de penetração (Tabela 12).

A distribuição e a extensão da penetração da ZnF nas camadas da pele após tratamento passivo, pré-tratamento com LFU e tratamento simultâneo seguido ou não de aplicação passiva das micelas contendo ZnF por 6 h foi avaliado por microscopia confocal (Figura 22).

Figura 22. Imagens representativas de cortes transversais da pele obtidas em microscópio confocal após os experimentos de penetração passiva e sonoforética de micelas contendo ZnF.



A fluorescência da ZnF foi observada no canal vermelho em aumento de 20 vezes (λ ex = 638 nm e λ em = 640 -700 nm). A pele foi avaliada após 6 h de (A) aplicação passiva das micelas, (B) pré-tratamento com gel HEC seguido de aplicação passiva das micelas, (C) tratamento simultâneo analisado imediatamente após aplicação do LFU e (D) tratamento simultâneo com as micelas seguido de aplicação passiva das micelas. Em todos os estudos de sonoforese a resistividade da pele foi mantida em aproximadamente 1 K Ω .cm² por 4 min.

Pode-se observar na Figura 22 que a penetração da ZnF veiculada pelas micelas sob o modo de tratamento simultâneo seguido da administração passiva das micelas contendo ZnF por mais 6 h, resultou na distribuição maior e mais homogênea da ZnF por toda a extensão da epiderme e derme (Figura 22D) quando comparada aos outros tratamentos. O tratamento simultâneo não seguido da administração passiva da ZnF, onde se pode observar apenas o efeito do fluxo convectivo e streaming causados pelo LFU, parece ter possibilitado a entrada da ZnF já em toda a extensão da pele (Figura 22C), porém em menores concentrações do que o tratamento seguido da exposição da pele ao fármaco. A subseguente exposição da pele às micelas contendo ZnF possibilita a penetração de mais fármaco para as camadas mais profundas possivelmente através das LTRs criadas, como observado na Figura 22D. Já o pré-tratamento, onde a contribuição dos fluxos convectivos e streaming não estão presentes, uma alta concentração de fármaco é observada no estrato córneo (Figura 22B), mas distribuída de forma bem mais homogênea do que na administração passiva (Figura 22A). Nessa última, a fluorescência característica da ZnF é bem menor quando comparada aos outros tratamentos e localizada em regiões específicas, ou seja, heterogênea.

A maior fluorescência e distribuição da ZnF encontrada em todas as camadas da pele após o tratamento simultâneo corrobora com os resultados de quantificação apresentados na Tabela 12. A alta concentração de ZnF quantificada na epiderme viável no tratamento passivo, no entanto, não foi visualizada na microscopia confocal. Essa discrepância pode estar relacionada a distribuição heterogênea das micelas contendo ZnF na superfície da pele, como observado na Figura 22A. De fato, como discutido anteriormente, micelas poliméricas podem se acumular nas regiões lacunares da pele e nos apêndices cutâneos (MAIBACH; DRAGICEVIC, 2016; DRAGICEVIC; MAIBACH, 2018) A distribuição mais homogênea conferida pelo pré-tratamento com o LFU (Figura 22B), já nas primeiras 6 h de tratamento, em relação ao tratamento passivo, apesar da menor quantidade de ZnF encontrada na epiderme viável em relação ao tratamento passivo (Tabela 12), sustenta a maior contribuição conferida pelo tratamento sonoforético para a administração da ZnF.

Comparando a penetração da calceína em estudos de microscopia confocal *in vitro*, Herwadkar et al. (2012) também verificaram maior acúmulo do corante com a sonoforese em comparação com a permeação passiva da calceína (HERWADKAR et al., 2012). Mas a penetração heterogênea observada após o pré-tratamento,

relacionada a distribuição heterogênea das LTRs, observada em outros trabalhos com o LFU (Weimann e Wu, 2002, Tezel et al., 2004, Paliwal, Menon e Mitragotri, 2006, Lee et al., 2010, Rangsimawong et al., 2015), não foi observada em nosso trabalho. Isto é, a distribuição da ZnF após o pré-tratamento com o LFU, como mostrado na Figura 24B, foi homogênea. Essa maior homogeneidade está relacionada ao fato do meio de acoplamento utilizado em nosso estudo, o gel de HEC, distribuir melhor as LTRs na superfície da pele (PEREIRA; RAMOS; LOPEZ, 2017) do que o meio de acoplamento tradicional de SLS usado nos ouros trabalhos.

5.6.5 Comparação entre os métodos físicos promotores de penetração de sonoforese e iontoforese para veiculação da ZnF

Dalmolin e Lopez (2018) investigaram o efeito da aplicação, por 1 h, de uma corrente elétrica de baixa intensidade, método conhecido como iontoforese, na penetração cutânea da ZnF a partir de uma nanoemulsão. A fim de comparar a penetração da ZnF sob influência dos métodos físicos da sonoforese e iontoforese, experimentos de permeação sob influência do LFU foram realizados por 1 h com as micelas de ZnF.

A Tabela 15 mostra as quantidades de ZnF extraídas do estrato córneo e da pele remanescente (epiderme viável e derme), como realizado por Dalmolin e Lopez (2018) em seu trabalho com a iontoforese, a partir dos experimentos de sonoforese usando o protocolo de pré-tratamento e simultâneo seguido do contato da micela contendo ZnF com a pele por 1 h.

Tabela 15 - Quantidade de ZnF acumulada no estrato córneo e na pele remanescente (epiderme viável e derme) após 1h de contato da formulação micelar de ZnF aplicada após o tratamento com o LFU no modo de pré-tratamento e tratamento simultâneo.

	ZnF acumulada (ng/cm²)		
Camada da pele	Permeação Pré-tratamento		Tratamento
	passiva		simultâneo
Estrato córneo	32,5 ± 8 (n=7) ^a	10 ± 2 (n=6) ^b	283 ± 86 (n=5) ^{c,#}
Epiderme viável +	23 ± 10 (n=7) ^a	12 ± 2 (n=6) ^b	78 ± 6 (n=5) ^c
derme			

Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão da média (n = 5 - 7 determinações). Os tratamentos com LFU de 20 kHz, 10 \pm 0,5 W/cm² e ciclo de

trabalho de 50% foram realizados até a resistividade da pele atingir $0.9 \pm 0.3 \text{ K}\Omega.\text{cm}^2$ usando gel 1% HEC (modo de pré-tratamento) ou micelas contendo ZnF como meio de acoplamento (tratamento simultâneo). O tratamento sonoforético total durou 4 ± 1 min. O teste de normalidade de Shapiro-Wilk mostrou que os valores experimentais provêm de uma população de distribuição Gausiana.Os resultados foram analisados estatisticamente por análise de variância ANOVA, seguido pelo teste de Tukey: a e b indicam diferença estatística (p < 0.05) em relação aos dados apresentados na mesma linha. # indica diferença estatística (p < 0.05) em relação aos dados apresentados na mesma coluna.

Como já observado nas 6 h de experimento, o tratamento simultâneo aumentou a penetração da ZnF em relação ao pré-tratamento. Após apenas 1 h de tratamento, no entanto, a extensão do aumento provocado pelo tratamento simultâneo foi ainda maior do que após 6 h, de 6 vezes contra as 3,8 vezes observadas após 6 h.

Para comparar os métodos iontoforese e sonoforese, a quantidade de fármaco encontrada na pele remanescente foi dividida pela concentração inicial de ZnF nas formulações. Isto porque as nanoemulsões estudadas no trabalho com iontoforese (DALMOLIN; LOPEZ, 2018) continham quase 4 vezes mais ZnF do que a as micelas utilizadas no presente trabalho. Após 1 h de iontoforese de uma nanoemulsão contendo 50 µg/mL de ZnF, 10 ng/cm² foram encontrados na pele remanescente, ou seja, a ZnF atravessou 0,2x10⁻³ cm/h da pele. Após a sonoforese da micela contendo 13 µg/mL de ZnF, a extensão da penetração foi de 0,9x10⁻³ e 6x10⁻³ cm/h, respectivamente, para o pré-tratamento e tratamento simultâneo. Ou seja, num curto período de aplicação, a sonoforese foi capaz de aumentar a extensão da penetração da ZnF 4,5 vezes e 30 vezes em comparação com a iontoforese para o pré-tratamento e tratamento simultâneo. Hedge et al. (2017) também observaram que maiores quantidades de cetoprofeno atravessaram a pele com a sonoforese quando comparada com a iontoforese (HEGDE et al., 2017).

Curiosamente, no entanto, 30 min de iontoforese resultaram numa concentração de ZnF na pele 4 vezes maior do que 30 min (Dalmolin e Lopez, 2019). Os autores explicaram essa diminuição na quantidade de ZnF na pele com o tempo de aplicação da iontoforese em função da maior permeação do fármaco para a solução receptora. Esse comportamento não foi observado quando a sonoforese foi utilizada como método físico, ou seja, o aumento do tempo de experimento aumentou a concentração de ZnF encontrada na pele. Essas diferenças no

comportamento da permeação cutânea da ZnF podem estar relacionadas aos diferentes sistemas de liberação utilizados para administrar o fármaco; micela, no tratamento sonoforético e nanoemulsão, na iontoforese. Mas a duração do estímulo físico parece ser o maior responsável por elas. Especificamente, nos experimentos com iontoforese, a corrente elétrica foi aplicada durante todos o tempo de experimento; ao contrário da sonoforese, quando o estímulo físico foi aplicado somente pelo tempo necessário para diminuir a resistividade da pele para 1,0 K Ω .cm², isto é, em torno de 4 min.

5.7 Avaliação da produção de ROS visando a terapia sonodinâmica com o LFU

5.7.1 Avaliação da geração de radicais hidroxila

É sabido que as microbolhas de cavitação formadas pelo LFU, cujo conteúdo é predominantemente vapor de água, podem atingir tamanhos maiores de até 100 µm. No momento do colapso, esse vapor de água dentro de bolha pode sofrer pirólise decorrente das condições drásticas de pressão e temperatura (ROSENTHAL; SOSTARIC; RIESZ, 2004). A pirólise gera radicais hidroxila e átomo de hidrogênio, conforme mostrado pela reação (i) mais abaixo. A partir de então, uma série de reações sonoquímicas ocorrem após o colapso energético das bolhas de cavitação, reação (ii) a (vi). Os átomos de hidrogênio podem reagir com o oxigênio na bolha e produzir radicais hidroxiperóxido, conforme reação (5), o qual se dissocia em ânions radicais superóxido em pH biológico ou reagem entre si formando peróxido de hidrogênio (ROSENTHAL; SOSTARIC; RIESZ, 2004; WAN; TER HAAR, 2015). Assim, os radicais hidroxilas produzidos pela pirólise da água podem contribuir direta ou indiretamente para a citotoxicidade da célula tumoral através da formação de outros radicais livres (ROSENTHAL; SOSTARIC; RIESZ, 2004).

(i)
$$H_2O \rightarrow H^{\bullet} + HO^{\bullet}$$

- (ii) $O_2 \rightarrow O + O$
- (iii) HO' + HO' \rightarrow H₂O₂
- $(iv)O + H_2O \rightarrow HO' + HO'$
- (v) $H' + O_2 \rightarrow HO_2'$
- $(vi) HO_2 + HO_2 \rightarrow O_2 + H_2O_2$

Para avaliar o potencial de geração de radicais hidroxila pelo LFU usou-se o mesmo método utilizado na avaliação da eficiência da cavitação no meio de acoplamento, ou seja, o dosímetro de KI. Resumidamente, quando ocorre a formação de radicais hidroxila no meio, esse reage com o iodo resultando na formação do complexo KI₃, como pode ser observado nas reações de (i) a (v) descritas a seguir, o qual pode ser lido em espectrofotômetro em 350 nm (EBRAHIMINIA; MOKHTARI-DIZAJI; TOLIYAT, 2016).

- (i) [•]OH + I⁻ → OH⁻ + I
- (ii) $H_2O_2 + 2I^2 + 2H^+ \rightarrow I_2 + 2H_2O_2$
- (iii) $| + |^{-} \rightarrow |2^{-}$
- $(iv) 2l_2 \rightarrow l_2 + 2l_2$
- (v) $I_2 + I^- \rightarrow I_3^-$

Assim, a absorbância de uma solução aquosa contendo KI foi avaliada antes e após a irradiação com LFU por 1 min (Figura 23).

Figura 23. Produção de radicais hidroxila quantificados por dosímetro de KI em solução tampão HEPES 20 mmol/L, pH 7,4.



A irradiação com LFU de 20 kHz, intensidade de $10 \pm 0.5 \text{ W/cm}^2$, ciclo de trabalho de 50% foi realizada por 1 min. Controle: solução tampão HEPES 20 mmol/L, pH 7,4. O teste de normalidade de Shapiro-Wilk mostrou que os valores experimentais provêm de uma população de distribuição Gausiana. Os resultados foram analisados estatisticamente por teste T de Student. (*) apresenta diferença estatística significativa com p < 0,05 (n= 3 determinações). As barras de erro representam o desvio padrão.

Os resultados mostram que a irradiação do LFU aumentou em mais de 26 vezes a absorbância do KI₃ em comparação ao controle. Esse aumento da absorbância do íon triiodeto é decorrente da oxidação dos íons iodeto pelos radicais hidroxila gerados pelo LFU, indicando o potencial do LFU em produzir ROS na TSD até mesmo na ausência do agente sonossensibilizante.

Ebrahiminia et al. (2016) também observaram uma produção de radicais hidroxila semelhante usando o método indireto do dosímetro de KI com a irradiação com ultrassom de 20 kHz. Usando a técnica de *spin trapping* outros estudos tem demonstrado a formação de adutos do spin trap com os radicais hidroxila e os átomos de hidrogênio formados pela sonólise da água (MAKINO; MOSSOBA; RIESZ, 1983).

A avaliação da formação dessa espécie reativa é importante pelo seu potencial em causar danos direto e indiretos às células tumorais na TSD. Os radicais hidroxila formados podem se recombinar ou reagir com moléculas endógenas, causando modificações nas bases de purínicas e pirimidínicas do DNA como mostrado por (KONDO; KRISHNA; RIESZ, 1988). Além desse efeito, essa espécie reativa pode agir indiretamente, causando efeitos biológicos através da formação de compostos reativos residuais de tempo de meia-vida longo, formados da reação com os radicais hidroxila. Por exemplo, quebras das fitas de DNA foram induzidas em células de ovário de hamster chinese tanto durante quanto após o término da irradiação do ultrassom de alta frequência (1 – 2 MHz), provavelmente pela ação do H₂O₂ residual (MILLER; THOMAS; FRAZIER, 1991; MILLER; THOMAS; BUSCHBOM, 1995)

5.7.2 Avaliação da produção de oxigênio singleto

Uma importante espécie reativa que pode ser gerada a partir da cavitação inercial na TSD é o ${}^{1}O_{2}$ cuja geração depende do sonossensibilizante, dos parâmetros do ultrassom e da presença de oxigênio molecular (PAN et al., 2018). Semelhante ao processo da TFD, o sonossensibilizante é ativado do seu estado fundamental para seu estado excitado após receber energia acústica ou sonoluminescente provenientes da cavitação ultrassônica. Quando regressam para seu estado fundamental, o sonossensibilizante libera energia a qual pode diretamente reagir com o oxigênio no estado tripleto presente para produzir oxigênio singleto. O ${}^{1}O_{2}$ recém-gerado é um agente altamente reativo e induz danos celulares

irreversíveis, culminando com a morte das células cancerosas (ROSENTHAL; SOSTARIC; RIESZ, 2004; PANG et al., 2016).

Dessa forma, a geração sonodinâmica de oxigênio singleto mediada pelo LFU foi investigada. A geração de ${}^{1}O_{2}$ na TSD mediada pela TSD tem sido demonstrada com o uso do sensor verde de oxigênio singleto (SOSG), o qual é altamente sensível e seletivo ao ${}^{1}O_{2}$ (KIM; FUJITSUKA; MAJIMA, 2013). Ademais, outra vantagem é que, diferente da maioria dos sensores para detecção de ROS, os quais são moléculas lipofílicas, o SOSG apresenta solubilidade em meio aquoso (KIM; FUJITSUKA; MAJIMA, 2013), o que é interessante quando pretende-se verificar a produção de ${}^{1}O_{2}$ a partir de sistemas nanoestruturados contendo o agente sonossensibilizante e manter a organização estrutural do sistema nanoestruturado disperso em meio aquoso.

Não se conhece exatamente a estrutura molecular do SOSG, mas é quase certo que o SOSG é composto por dois cromóforos principais: fluoresceína e antraceno, exibindo uma florescência verde através da reação com ¹O₂ (KIM; FUJITSUKA; MAJIMA, 2013). Antes da reação do SOSG com o oxigênio singleto, a transferência eletrônica intramolecular reprime a fluorescência. Entretanto, quando o SOSG reage com oxigênio singleto, ocorre a formação de um endoperóxido (SOSG-EP) e o impedimento da transferência de elétrons intramolecular (HARADA et al., 2013).

A Figura 24 relaciona a intensidade de fluorescência do endoperóxido de SOSG (SOSG-PE) em 525 nm após a sonicação das micelas de ZnF, micelas brancas e solução tampão HEPES pH 7.4 com LFU ($10 \pm 0.5 \text{ W/cm}^2$, 50% de ciclo de trabalho em intervalos de 5 s e duração total de 1 min).

Figura 24. Investigação da geração sonodinâmica de oxigênio singleto com LFU através do método do sensor verde de oxigênio singleto.



A irradiação com LFU de 20 kHz, 10 \pm 0,5 W/cm², ciclo de trabalho de 50% foi realizada por 1 min (em intervalos de 5 s) na presença e na ausência da ZnF. Controle: solução tampão HEPES 20 mmol/L, pH 7,4.

Foi possível observar o aumento da fluorescência do SOSG-PE em todos os grupos experimentais, isto é, mesmo na ausência do agente sonossensibilizante (grupo controle – solução aquosa). Comparado ao controle, no entanto, a adição das micelas, brancas ou contendo o sonossensibilizante, reduziram a presença de ¹O₂ no meio e não a aumentaram, como esperado. Este resultado intrigante pode estar relacionado ao sequestro dos radicais livres formados na presença do LFU pelas micelas, o que acaba por mascarar o efeito do agente sonossensibilizante e da própria terapia sonodinâmica. O curto tempo de aplicação do LFU, apenas 1 min, também pode ter contribuído para a dificuldade em se detectar a formação de oxigênio singleto na presença das micelas. Se as micelas realmente sequestram essa espécie radicalar, um tempo maior de irradiação do LFU poderia ter levado a geração de mais espécies reativas e a possibilidade de se avaliar melhor a sua formação na presença do agente sonossensibilizante.

Apesar de não terem sido encontrados na literatura estudos com o LFU associado a sistemas de liberação que tenham avaliado a geração de ¹O₂ usando SOSG, essa hipótese da necessidade de um tempo maior para observar a geração do radical livre pode ser confirmada com base em experimentos realizados com o ultrassom de alta frequência. De fato, experimentos usando SOSG como sonda para quantificar o ¹O₂ que apresentaram sucesso foram realizados sob influência do

ultrassom de alta frequência por um período de pelo menos 10 min. Por exemplo, Harada *et al.* verificaram um aumento de 50 unidades na intensidade de fluorescência do SOSG-EP em relação aos controles quando irradiaram uma solução aquosa contendo nanopartículas de TiO₂ usando ultrassom de 1 MHz, 0,5 W/cm², 10% de ciclo de trabalho por um tempo de irradiação de 10 min (HARADA et al., 2013). Já McEwan e colaboradores (2015), também usando ultrassom a 1 MHz, adicionaram oxigênio encapsulado em microbolhas ao meio de acoplamento e observaram um aumento de quase 3 vezes na geração de ¹O₂ quando a aplicação do ultrassom foi associada ao agente sonossensibilizante rosa de bengala e irradiado por 30 min (MCEWAN et al., 2015). Ainda em meio contendo as microbolhas de oxigênio e mesma frequência do ultrassom, mas usando indocianina verde como agente sonossensibilizante e irradiação por apenas 30 s, Ma e colaboradores observaram um aumento pífio de apenas 1,07 vezes na geração de ¹O₂, mesmo no meio contendo o excesso de oxigênio (presente nas microbolhas) (MA et al., 2017).

O uso do SOSG como sonda para detectar o ¹O₂ apresentou ainda outros problemas na presença do LFU. Dentre eles está a observação do aumento da fluorescência da sonda mesmo quando histidina e azida de sódio, conhecidos sequestradores de ¹O₂ (YUMITA et al., 2010, 2013; XU et al., 2015a; YANG et al., 2015), foram adicionados ao meio (dados não mostrados). Os resultados encontrados podem ser explicados em virtude de possíveis modificações na estrutura molecular da sonda de modo a aumentar sua fluorescência, dificultando a interpretação dos resultados. Ainda, a própria molécula de SOSG pode agir como agente sensibilizante, levando a formação de oxigênio singleto e SOSG-PE sem a participação do agente sonossensibilizante nesse processo (GOLLMER et al., 2011). Recentemente, foi demonstrado que radicais hidroxila podem também estar envolvidos direta ou indiretamente no processo de ativação do SOSG através de mecanismos ainda desconhecidos, o que pode também explicar o aumento da fluorescência do SOSG-PE com a irradiação do LFU mesmo na ausência do agente sonossensibilizante (LIU et al., 2019).

O método indireto do p-nitrosodimetilanilina e imidazol foi então usado para investigação da formação de oxigênio singleto através da terapia sonodinâmica mediada pelo LFU. A Figura 25a e 25b mostram a absorbância do p-NMDA em 440 nm antes e após a sonicação das micelas de ZnF, micelas brancas e solução

aquosa de p-NMDA e imidazol com LFU e a porcentagem residual da concentração de ZnF após a irradiação com LFU ($10 \pm 0.5 \text{ W/cm}^2$, 50% de ciclo de trabalho por 1 min), respectivamente.

Figure 25. Investigação da geração de oxigênio singleto pelo LFU através do método indireto do p-nitrosodimetilanilina e imidazol (A) e porcentagem da concentração residual de ZnF após irradiação da formulação de micelas (B).



A irradiação com LFU de 20 kHz, 10 ± 0.5 W/cm², ciclo de trabalho de 50% foi realizada por 1 min na presença e na ausência da ZnF. Controle: solução aquosa de p-NMDA e imidazol em solução tampão HEPES, pH 7,4. O teste de normalidade de Shapiro-Wilk mostrou que os valores experimentais provêm de uma população de distribuição Gausiana. Os resultados foram analisados estatisticamente por análise de variância ANOVA, seguido pelo teste de Tukey: (*) indica diferença estatística (p < 0,05) (n = 3 determinações). As barras de erro representam o desvio padrão.

Não foi observado o decaimento da absorbância do p-NDMA no grupo controle após a irradiação com LFU enquanto que uma redução significativa da absorbância do p-NDMA em 440 nm tanto com as micelas brancas como com as micelas de ZnF (Figura 25a) foi observada. Esse resultado é bastante inquietante, pois sugere que a produção de oxigênio singleto ocorra na presença do sistema de liberação, sem a participação do agente sonossensibilizante. Ademais, a absorção da ZnF também reduziu após irradiação com LFU por 1min, sugerindo a degradação ou consumo do fármaco (Figura 25b).

Esses resultados corroboram os estudos de Liang e colaboradores (2013) que observaram a produção de oxigênio singleto por este método em meio de cultura celular, irradiando soluções de hematoporfirina monometil éter e doxorrubicina de concentrações iguais a 5 a 80 µg/mL e 0,06 a 4 µg/mL, respectivamente, com o ultrassom de alta de 1,2 MHz, no modo pulsátil, com intensidade de 1,0 W/cm² por 2

min. Takamae et al. (2019) também verificaram a degradação epirrubicina encapsulada em micelas após a irradiação da solução do fármaco por 10 min com ultrassom focado de alta intensidade (HIFU) (TAKEMAE et al., 2019).

Para confirmar a produção sonodinâmica de ROS pelo LFU se faz necessária a utilização de outras técnicas e métodos mais específicos para a detecção das ROS e radicais livres gerados por LFU, como a espectroscopia paramagnética de elétrons ou a detecção do efeito de estresse oxidativo originado por tais ROS e radicais livres através de ensaios como o da peroxidação lipídica em células ou em tecido cutâneo, como descrito no próximo item (5.7.3).

5.7.3 Avaliação da peroxidação lipídica pela terapia sonodinâmica com o IFU na pele de suínos

A quantificação de MDA, um dos diversos bioprodutos do processo de peroxidação lipídica, é um parâmetro comumente avaliado para indicar a extensão da peroxidação lipídica resultante do estresse oxidativo celular (NIELSEN et al., 1997; ANTUNES et al., 2008). O método para avaliação da peroxidação lipídica foi introduzido por Yagi (1976) e baseia-se na reação do TBA com o MDA, formando do aduto MDA-ATB₂, o qual apresenta alta absorbância em 532 nm e pode ser detectado por espectrofotometria.

A Figura 26 mostra o efeito da peroxidação lipídica em pele de orelha de suínos mediado pela TSD com LFU na presença e na ausência da ZnF.

Figura 26. Efeito da peroxidação lipídica em pele pela terapia sonodinâmica com LFU.



A irradiação com LFU de 20 kHz, 5,5 W/cm², ciclo de trabalho de 50% foi realizada por 1 min na presença e ausência das micelas contendo ZnF. Controle: pele não

irradiada pelo LFU. O teste de normalidade de Shapiro-Wilk mostrou que os valores experimentais provêm de uma população de distribuição Gausiana. Os resultados foram analisados estatisticamente por análise de variância ANOVA, seguido pelo teste de Tukey. (*) apresenta diferença estatística significativa com p < 0,05 (n = 3 - 4 determinações). As barras de erro representam o desvio padrão.

Pode-se observar na Figura 26 que a irradiação da pele com LFU aumentou sensivelmente a peroxidação lipídica na pele, mas sem diferença estatística em relação ao controle. A aplicação do LFU na pele anteriormente submetida a permeação passiva com as micelas contendo ZnF por 6 h, no entanto, dobrou a peroxidação lipídica. Esse resultado sugere, dessa forma, que a presença do agente sonossensibilizante é importante nessa resposta para a TSD com o LFU. É importante salientar, no entanto, que o experimento foi realizado na pele submetida apenas a permeação passiva, não exposta anteriormente a sonoforese. Apesar da alta concentração de ZnF encontrada na epiderme após a permeação passiva (aproximadamente 400 ng/cm², Tabela 14), ela estava distribuída heterogeneamente na pele, provavelmente mais nos estratos superiores (Figura 22A). Assim, é possível que o tratamento anterior da pele com o LFU, que resultou em alta penetração (Tabela 13) e homogênea distribuição (Figura 22D) da ZnF na pele, apresentasse um resultado ainda melhor de peroxidação lipídica quando exposta novamente ao LFU para a TSD.

De fato, a peroxidação lipídica na presença do ultrassom de alta frequência já foi demonstrada em cultura de células de eritrócitos murinos, na presença da hematoporfirina, e em células tumorais de sarcoma, na presença de polidroxifulereno (YUMITA et al., 1996, 2010, 2014). Acredita-se que a ativação sonodinâmica do sonossensibilizante ocorra dentro ou na interface entre gás e meio aquoso da bolha de cavitação, onde os radicais livres derivados do agente sonossensibilizante podem ser formados por clivagem hemolítica de ligações químicas do sonossensibilizante ou por reações dele com átomos de hidrogênios e radicais hidroxil formados. Alguns estudos têm sugerido que os radicais alcoxil e peroxil produzidas na TSD são as principais espécies citotóxicas, capazes de migrar longas distâncias e reagir com sítios celulares específicos como a membrana celular. Dessa forma, o processo de peroxidação lipídica pode ser iniciado, causando consequências deletérias nas membranas celulares. (ROSENTHAL; SOSTARIC; RIESZ, 2004).

Embora a quantificação dos adutos de MDA seja um método amplamente utilizado na avaliação da peroxidação lipídica (NIELSEN et al., 1997; ANTUNES et al., 2008), é necessário salientar que o TBA também pode reagir com outras substâncias interferentes, como hidroperóxidos, carboidratos e aminoácidos, tornando o método inespecífico para a detecção exclusiva dos produtos de peroxidação lipídica, uma vez que é a soma das diferentes substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico que é quantificada (GUTTERIDGE, 1981). Por isso, os grupos controles devem ser cautelosamente selecionados e avaliados quando se faz a análise desse método por espectrofotometria ou espectrofluorimetria. Para melhorar a especificidade do método, técnicas como a de cromatografia líquida de alta eficiência para determinação de MDA tem sido propostas (NIELSEN et al., 1997; ANTUNES et al., 2008).

6. CONCLUSÃO

O delineamento experimental possibilitou a determinação da composição e do preparo otimizado de micelas contendo ZnF de tamanho nanométrico, monodispersas e com concentração adequada de ZnF para administração tópica. Essas micelas aumentaram a atividade cavitacional do LFU em comparação a uma solução aquosa simples, o que implica em maior perturbação do estrato córneo e maior penetração de fármaco através dessa barreira com aplicação do LFU. De fato, 0 tratamento simultâneo com LFU usando essa formulação aumentou significativamente a quantidade de ZnF em todas as camadas da pele. Em comparação com a emulsão, as micelas possibilitaram que a ZnF atravessasse maiores extensões da pele em função do tempo em todos os protocolos de tratamento. No protocolo de pré-tratamento, a diminuição significativa da ZnF na derme provocada pela emulsão, 21 vezes menor do que a ocorrida a partir das micelas, confirma o efeito reparador das LTRs pela emulsão, com consequente impacto negativo na permeabilização por LFU, o que não ocorre com as micelas. Assim, formulações mais hidrofílicas, como as micelas de DSPE-PEG, promovem uma maior extensão de penetração do fármaco através das LTRs por manterem os poros formados na pele disponíveis por maior tempo. Finalmente, o LFU também se mostrou capaz de elicitar a formação de ROS evidenciado pela produção de oxigênio singleto e pela peroxidação lipídica de tecido de pele porcina. Desta forma, a associação do LFU a micelas de ZnF promoveu a penetração cutânea da ZnF e gerou espécies radicalares, sendo uma estratégia potencialmente promissora para a TSD de tumores cutâneos.

7. DIFICULDADES ENCONTRADAS

Inicialmente pretendia-se usar a clorina-e6 (Ce6) como o agente sonossensibilizante, que então foi substituída pela ftalocianina de zinco já que a formação de partículas em escala manométrica com Ce6 e DSPE-PEG após análise por DLS não foi observada. Dois métodos de preparo de micelas foram empregados, o da solubilização direta e da hidratação do filme lipídico, sem sucesso. Dessa forma, algumas investigações foram realizadas para compreender esses resultados partindo do pressuposto que a Ce6 apresenta em um lado da molécula três grupos carboxílicos, os quais podem existir em diferentes formas iônicas dependendo do pH.

A Figura 27 mostra os espectros de absorção da Ce6 (2,5 mM e λ_{abs} = 405 nm) realizando em água deionizada (pH 5,0), em solução tampão HEPES pH 7,4 e DMSO.

Figura 27. Espectro de absorção da Ce6 em água deionizada pH 4,5 (linha preta), em solução tampão HEPES (linha azul) e DMSO (linha vermelha).



A Figura 28 mostra os espectros de fluorescência da Ce6 (2,5 mM λ_{exc} = 408 nm λ_{em} = 600 – 800 nm) também realizados em água deionizada (pH 5,0), em solução tampão HEPES pH 7,4 e DMSO.

Figura 28. Espectro de fluorescência da Ce6 em água deionizada pH 4,5 (linha preta), em solução tampão HEPES pH 7,4 (linha azul) e DMSO (linha vermelha).



Os resultados obtidos no espectro de absorção e fluorescência da Ce6 foram similares àqueles apresentados por Isakau et al. (2008), Paul et al., (2013) e Paul et al., (2013).

O espectro de absorção mostrou que a intensidade de absorção (Figura 26) (I_A) (em relação a da banda de Soret) da Ce6 solubilizada foi aproximadamente 9 vezes maior em tampão HEPES pH 7,4 (I_A = 9,0) e DMSO (I_A = 8,5) quando comparada com a Ce6 em água deionizada na mesma concentração (I_A = 1,0).

A intensidade de fluorescência (Figura 28) da Ce6 aumentou aproximadamente 10 vezes quando solubilizada em solução tampão HEPES pH 7,4 ($I_F = 8773$) e em DMSO ($I_F = 8827$) quando comparadas com a intensidade de fluorescência do fármaco em água deionizada ($I_{F} = 868$).

Esses resultados sugerem a Ce6 apresenta um maior grau de ionização dos seus grupamentos carboxílicos em pH neutro, conferindo maior solubilidade do fármaco em solução tampão HEPES pH 7,4, observados pela maior intensidade de absorbância e fluorescência neste meio, como mostrados nas Figuras 27 e 28, respectivamente.

Experimento confirmatório foi realizado solubilizando a 2,5 mM de Ce6 em meio aquoso com diferentes valores de pH (de 3,4 a 9,0). A Figura 29 mostra que a intensidade de absorbância da Ce6 aumenta do pH mais ácido ao pH mais alcalino, onde a Ce6 se encontra mais ionizada. Essa ionização e, consequente aumento da

solubilidade em água, pode ter prejudicado a solubilização do fármaco no núcleo hidrofóbico das micelas de DSPE-PEG e a formação das micelas.

Figura 29. Espectro de absorção da Ce6 na faixa de pH de 3,4 a 9,0. As linhas em vermelho - pH ácido com valores de 3,4; 4,5 e 5,5; linha verde - pH neutro de 7,0 e as linhas em azul - pH alcalino com valores de 7,5; 8,0 e 9,0.



Quando realizou-se o preparo das micelas de DSPE-PEG com a ZnF, um fármaco altamente lipofílico (log $K_{{
m óleo/água}} > 8$), pode-se obter a formação de partículas nanométricas que foram verificadas por DLS. Esse resultado confirmou a hipótese de que a ionização da Ce6 em pH 7,4 não permitiu sua incorporação nas micelas. Dessa forma, a Ce6 foi substituída pela ZnF como fármaco sonossensibilizante para TSD.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGÁFICAS

ABD EL-KAREAM, S. A.; ABD ELSAMIE, G. H.; ABD-ALKAREEM, A. S. Sonophotodynamic modality for cancer treatment using bio-degradable bio-conjugated sonnelux nanocomposite in tumor-bearing mice: Activated cancer therapy using light and ultrasound. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 503, n. 2, p. 1075–1086, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.06.119>.

AHMED, K. S. et al. Derma roller® microneedles-mediated transdermal delivery of doxorubicin and celecoxib co-loaded liposomes for enhancing the anticancer effect. **Materials Science and Engineering C**, v. 99, n. January, p. 1448–1458, 2019. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.02.095>.

ALAMOLHODA, M.; MOKHTARI-DIZAJI, M. Evaluation of Fractionated and Repeated Sonodynamic Therapy by Using Dual Frequency for Murine Model of Breast Adenocarcinoma. **Journal of therapeutic ultrasound**, v. 3, n. 1, p. 10, 24 dez. 2015. Disponível em: http://www.jtultrasound.com/content/3/1/10. Acesso em: 24 out. 2017.

ALVAREZ-ROMÁN, R. et al. Skin permeability enhancement by low frequency sonophoresis: Lipid extraction and transport pathways. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 92, n. 6, p. 1138–1146, 2003.

ANTUNES, M. V. et al. Estudo pré-analítico e de validação para determinação de malondialdeído em plasma humano por cromatografia líquida de alta eficiência, após derivatização com 2,4-dinitrofenilhidrazina. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 2, p. 279–287, 2008.

ASANO, J. et al. Effect of Pulsed Output Ultrasound on the Transdermal Absorption of Indomethacin from an Ointment in Rats. **Biological & pharmaceutical bulletin**, v. 20, n. 3, p. 228–291, 1997.

BACHHAV, Y. G. et al. Novel micelle formulations to increase cutaneous bioavailability of azole antifungals. **Journal of Controlled Release**, v. 153, n. 2, p. 126–132, 2011. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.03.003>.

BAI, W.-K.; SHEN, E.; HU, B. The Induction of the Apoptosis of Cancer Cell by Sonodynamic Therapy: A Review. **Chinese journal of cancer research**, v. 24, n. 4, p. 368–73, 2012. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23359780>.

BAILEY, M. R. et al. Physical mechanisms of the therapeutic effect of ultrasound (a
review). **Acoustical Physics**, v. 49, n. 4, p. 369–388, 2003. Disponível em: http://link.springer.com/10.1134/1.1591291>.

BAJI, S. et al. Skin permeation of gemcitabine hydrochloride by passive diffusion, iontophoresis and sonophoresis: In vitro and in vivo evaluations. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 47, n. 4, p. 49–54, 2018.

BENDER, E. A. et al. Hemocompatibility of $poly(\epsilon$ -caprolactone) lipid-core nanocapsules stabilized with polysorbate 80-lecithin and uncoated or coated with chitosan. **International journal of pharmaceutics**, v. 426, n. 1–2, p. 271–279, 15 abr. 2012. Disponível em:

https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378517312001056>.

BLANCO, K. C. et al. A multicenter clinical study of expected and unexpected side reactions during and after skin cancer treatment by photodynamic therapy. **Skinmed**, v. 15, n. 2, p. 113–118, 2017.

BOUCAUD, A. et al. In vitro study of low-frequency ultrasound-enhanced transdermal transport of fentanyl and caffeine across human and hairless rat skin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 228, n. 1–2, p. 69–77, 2001.

CANAVESE, G. et al. Nanoparticle-assisted ultrasound: A special focus on sonodynamic therapy against cancer. **Chemical Engineering Journal**, v. 340, n. 1, p. 155–172, maio 2018. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.cej.2018.01.060>.

CHE, J. et al. DSPE-PEG: A Distinctive Component in Drug Delivery System. **Current Pharmaceutical Design**, v. 21, n. 12, p. 1598–1605, 20 fev. 2015. Disponível em:

http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1381-

6128&volume=21&issue=12&spage=1598>.

CHEN, B. et al. The tumor affinity of chlorin e6 and its sonodynamic effects on nonsmall cell lung cancer. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 20, n. 2, p. 667–673, mar. 2013. Disponível em:

http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1350417712001915>. Acesso em: 24 out. 2017.

CHEN, H.-J. et al. Synthesis and biological characterization of novel rose bengal derivatives with improved amphiphilicity for sono-photodynamic therapy. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 145, n. 2, p. 86–95, fev. 2018. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.12.091>.

CHEN, L. et al. Combination of sonodynamic with temozolomide inhibits C6 glioma

migration and promotes mitochondrial pathway apoptosis via suppressing NHE-1 expression. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 39, n. 11, p. 654–661, 2017a. Disponível em: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1350417717302225>.

CHEN, M. et al. Ultrasound triggered drug delivery for mitochondria targeted sonodynamic therapy. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 39, n. 5, p. 501–507, jun. 2017b. Disponível em: http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L616282162>.

CHEN, Y.-W. et al. A Theranostic NrGO@MSN-ION Nanocarrier Developed to Enhance the Combination Effect of Sonodynamic Therapy and Ultrasound Hyperthermia for Treating Tumor. **Nanoscale**, v. 8, n. 25, p. 12648–12657, 2016. Disponível em: http://xlink.rsc.org/?DOI=C5NR07782F>. Acesso em: 24 out. 2017.

CHEN, Z. et al. Use of a Novel Sonosensitizer in Sonodynamic Therapy of U251 Glioma Cells in Vitro. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 3, n. 2, p. 273– 278, fev. 2012. Disponível em: https://www.spandidospublications.com/10.3892/etm.2011.390>.

CHUMMUN, S.; MCLEAN, N. R. The management of malignant skin cancers. **Surgery (United Kingdom)**, v. 35, n. 9, p. 519–524, 2017. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.mpsur.2014.06.008>.

COSTLEY, D. et al. Treating Cancer with Sonodynamic Therapy: A Review. **International Journal of Hyperthermia**, v. 31, n. 2, p. 107–117, 2015. Disponível em: http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/02656736.2014.992484>. Acesso em: 24 out. 2017.

CRAYTHORNE, E.; AL-NIAMI, F. Skin cancer. **Medicine (United Kingdom)**, v. 45, n. 7, p. 431–434, 2017. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.mpmed.2017.04.003>.

DAHLAN, A.; ALPAR, H. O.; MURDAN, S. An investigation into the combination of low frequency ultrasound and liposomes on skin permeability. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 379, n. 1–2, p. 139–142, 2009.

DAI, C. et al. Two-Dimensional Graphene Augments Nanosonosensitized Sonocatalytic Tumor Eradication. **ACS nano**, v. 11, n. 9, p. 9467–9480, 26 set. 2017. Disponível em: http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acsnano.7b05215. Acesso em: 24 out. 2017.

DAI, S. et al. In Vitro Stimulation of Calcium Overload and Apoptosis by

Sonodynamic Therapy Combined with Hematoporphyrin Monomethyl Ether in C6 Glioma Cells. **Oncology letters**, v. 8, n. 4, p. 1675–1681, out. 2014. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25202390>. Acesso em: 24 out. 2017.

DAI, S.; HU, S.; WU, C. Apoptotic Effect of Sonodynamic Therapy Mediated by Hematoporphyrin Monomethyl Ether on C6 Glioma Cells in Vitro. **Acta neurochirurgica**, v. 151, n. 12, p. 1655–1661, dez. 2009. Disponível em: http://link.springer.com/10.1007/s00701-009-0456-5. Acesso em: 24 out. 2017.

DALMOLIN, L. F. lontoforese de nanodispersões visando a imunoterapia associada à terapia fotodinâmica tópica do melanoma. 2019. Universidade de São Paulo, 2019.

DALMOLIN, L.; LOPEZ, R. Nanoemulsion as a Platform for Iontophoretic Delivery of Lipophilic Drugs in Skin Tumors. **Pharmaceutics**, v. 10, n. 4, p. 214, 4 nov. 2018. Disponível em: http://www.mdpi.com/1999-4923/10/4/214.

DE OLIVEIRA DE SIQUEIRA, L. B. et al. Development and evaluation of zinc phthalocyanine nanoemulsions for use in photodynamic therapy for Leishmania spp . **Nanotechnology**, v. 28, n. 6, p. 065101, 10 fev. 2017. Disponível em: http://stacks.iop.org/0957-

4484/28/i=6/a=065101?key=crossref.d4efe2383ff6a13ee1443b5d91849090>.

DEEPAGAN, V. G. et al. Long-Circulating Au-TiO 2 Nanocomposite as a Sonosensitizer for ROS-Mediated Eradication of Cancer. **Nano Letters**, v. 16, n. 10, p. 6257–6264, 12 out. 2016. Disponível em: http://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.nanolett.6b02547>.

DRAGICEVIC, N.; MAIBACH, H. Combined use of nanocarriers and physical methods for percutaneous penetration enhancement. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 127, p. 58–84, mar. 2018. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.02.003>.

EBRAHIMINIA, A.; MOKHTARI-DIZAJI, M.; TOLIYAT, T. Dual frequency cavitation event sensor with iodide dosimeter. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 28, p. 276–282, 2016.

EL-KAMEL, A.; AL-FAGIH, I.; ALSARRA, I. Effect of Sonophoresis and Chemical Enhancers on Testosterone Transdermal Delivery from Solid Lipid Microparticles: An In Vitro Study. **Current Drug Delivery**, v. 5, n. 1, p. 20–26, 1 jan. 2008. Disponível em: ">http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1567-2018&volume=5&issue=1&spage=20>">http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1567-2018&volume=5&issue=1&spage=20>">http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1567-2018&volume=5&issue=1&spage=20>">http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1567-2018&volume=5&issue=1&spage=20>">http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1567-2018&volume=5&issue=1&spage=20>">http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1567-2018&volume=5&issue=1&spage=20>">http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1567-2018&volume=5&issue=1&spage=20>">http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1567-2018&volume=5&issue=1&spage=20>">http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1567-2018&volume=5&issue=1&spage=20>">http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1567-2018&volume=5&issue=1&spage=20>">http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1567-2018&volume=5&issue=1&spage=20>">http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1567-2018&volume=5&issue=1&spage=20>">http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issue=1&spage=20>">http://www.eurekaselect.com/openut/content.php?genre=article&issue=1&spage=20">http://www.eurekaselect.com/openut/content.php?genre=article&issue=1&spage=20">http://www.eurekaselect.com/openut/content.php?genre=article&issue=1&spage=20">http://www.eurekaselect.com/openut/content.phttp://www.eurekaselect.com/openut/content.phttp://www.eurek ELSAID, Z. et al. Mixed micelles of lipoic acid-chitosan-poly(ethylene glycol) and distearoylphosphatidylethanolamine-poly(ethylene glycol) for tumor delivery. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 101, p. 228–242, abr. 2017. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2017.02.001>.

ENDO, S. et al. Porphyrin Derivatives-Mediated Sonodynamic Therapy for MalignantGliomas In Vitro. Ultrasound in Medicine & Biology, v. 41, n. 9, p. 2458–2465, set.2015.Disponívelem:

http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0301562915003567>. Acesso em: 24 out. 2017.

FANG, J. Y. et al. Capsaicin and nonivamide as novel skin permeation enhancers for indomethacin. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 12, n. 3, p. 195–203, 2000.

GAO, Z. et al. Sonodynamic Therapy Inhibits Angiogenesis and Tumor Growth in a Xenograft Mouse Model. **Cancer letters**, v. 335, n. 1, p. 93–99, jul. 2013. Disponível em: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304383513001171. Acesso em: 24 out. 2017.

GENG, C. et al. Sonodynamic therapy: A potential treatment for atherosclerosis. Life Sciences, v. 207, n. 6, p. 304–313, ago. 2018. Disponível em: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0024320518303606>.

GOLLMER, A. et al. Singlet Oxygen Sensor Green®: Photochemical Behavior in Solution and in a Mammalian Cell. **Photochemistry and Photobiology**, v. 87, n. 3, p. 671–679, maio 2011. Disponível em: ">http://doi.wiley.com/10.1111/j.1751-1097.2011.00900.x>.

GOU, M. et al. Transdermal Anaesthesia with Lidocaine Nano-Formulation Pretreated with Low-Frequency Ultrasound in Rats Model. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 9, n. 11, p. 6360–6365, 2009.

GRATIERI, T. et al. Princípios básicos e aplicação da iontoforese na penetração cutânea de fármacos. **Química Nova**, v. 31, n. 6, p. 1490–1498, 2008.

GUTTERIDGE, J. M. C. Thiobarbituric acid-reactivity following iron-dependent free radical damage amino acids and carbohydrates. **FEBS Letters**, v. 128, n. 2, p. 343–346, 1981.

HAO, D. et al. Calcium Overload and in Vitro Apoptosis of the C6 Glioma Cells Mediated by Sonodynamic Therapy (Hematoporphyrin Monomethyl Ether and Ultrasound). **Cell Biochemistry and Biophysics**, v. 70, n. 2, p. 1445–1452, 27 nov.

2014. Disponível em: http://link.springer.com/10.1007/s12013-014-0081-7>. Acesso em: 24 out. 2017.

HARADA, A. et al. Titanium dioxide nanoparticle-entrapped polyion complex micelles generate singlet oxygen in the cells by ultrasound irradiation for sonodynamic therapy. **Biomater. Sci.**, v. 1, n. 1, p. 65–73, 2013. Disponível em: http://xlink.rsc.org/?DOI=C2BM00066K>.

HARADA, Y. et al. Ultrasound Activation of TiO2 in Melanoma Tumors. **Journal of Controlled Release**, v. 149, n. 2, p. 190–195, 20 jan. 2011. Disponível em: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S016836591000800X>. Acesso em: 24 out. 2017.

HARRIS, G. R.; MARUVADA, S.; GAMMELL, P. M. Two efficient methods for measuring hydrophone frequency response in the 100 kHz to 2 MHz range. **Journal of Physics: Conference Series**, v. 1, n. 26, p. 26–31, 1 jan. 2004. Disponível em: http://stacks.iop.org/1742-

6596/1/i=1/a=008?key=crossref.9a8de35a2a478d5a7c553e8364470252>.

HEGDE, A. R. et al. Peptide dendrimer-conjugates of ketoprofen: Synthesis and ex vivo and in vivo evaluations of passive diffusion, sonophoresis and iontophoresis for skin delivery. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 102, p. 237–249, 2017.

HERWADKAR, A. et al. Low frequency sonophoresis mediated transdermal and intradermal delivery of ketoprofen. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 423, n. 2, p. 289–296, 2012. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.11.041>.

HODGKINSON, N. et al. Cervical cancer cells (HeLa) response to photodynamic therapy using a zinc phthalocyanine photosensitizer. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 177, n. October, p. 32–38, 2017. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2017.10.004>.

HONG, I. K.; KIM, S. I.; LEE, S. B. Effects of HLB value on oil-in-water emulsions: Droplet size, rheological behavior, zeta-potential, and creaming index. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 67, p. 123–131, 2018. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.jiec.2018.06.022>.

HORISE, Y. et al. Sonodynamic Therapy With Anticancer Micelles and High-Intensity Focused Ultrasound in Treatment of Canine Cancer. **Frontiers in Pharmacology**, v. 10, n. May, p. 1–11, 2019. HUANG, B. et al. Dendrimer-coupled sonophoresis-mediated transdermal drugdelivery system for diclofenac. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 9, p. 3867–3876, jul. 2015. Disponível em: .

HUANG, P. et al. Metalloporphyrin-Encapsulated Biodegradable Nanosystems for Highly Efficient Magnetic Resonance Imaging-Guided Sonodynamic Cancer Therapy.

Journal of the American Chemical Society, v. 139, n. 3, p. 1275–1284, jan. 2017. Disponível em: http://pubs.acs.org/doi/10.1021/jacs.6b11846>. Acesso em: 24 out. 2017.

HUBER, L. A. et al. Topical skin cancer therapy using doxorubicin-loaded cationic lipid nanoparticles and iontophoresis. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 11, n. 11, p. 1975–1988, 2015.

ICH, 2003. Validation of analytical procedures text and methodology (Q2R1). INCA. INCA - Instituto Nacional do Câncer, 2019.

INUI, T. et al. Case Report: A Breast Cancer Patient Treated with GcMAF, Sonodynamic Therapy and Hormone Therapy. **Anticancer research**, v. 34, n. 8, p. 4589–4593, ago. 2014. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25075104>. Acesso em: 24 out. 2017.

INUI, T. et al. Case Report: A Non-Small Cell Lung Cancer Patient Treated with GcMAF, Sonodynamic Therapy and Tumor Treating Fields. **Anticancer research**, v. 36, n. 7, p. 3767–3770, jul. 2016.

ITA, K. Percutaneous penetration of anticancer agents: Past, present and future. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 84, p. 1428–1439, dez. 2016. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2016.09.098>.

ITA, K. Recent progress in transdermal sonophoresis. **Pharmaceutical Development and Technology**, v. 22, n. 4, p. 458–466, 19 maio 2017. Disponível em: https://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/10837450.2015.1116566>.

JIA, Y. et al. Sonodynamic Action of Hypocrellin B Triggers Cell Apoptoisis of Breast Cancer Cells Involving Caspase Pathway. **Ultrasonics**, v. 73, p. 154–161, jan. 2017. Disponível em: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0041624X16301937. Acesso em: 24 out. 2017.

JIN, Z. H. et al. Combination effect of photodynamic and sonodynamic therapy on experimental skin squamous cell carcinoma in C3H/HeN mice. The Journal of

dermatology, v. 27, n. 5, p. 294–306, 2000.

JOHNSON, M. E. et al. Synergistic Effects of Chemical Enhancers and Therapeutic Ultrasound on Transdermal Drug Delivery. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 85, n. 7, p. 670–679, 1996.

JOHNSSON, M.; HANSSON, P.; EDWARDS, K. Spherical Micelles and Other Self-Assembled Structures in Dilute Aqueous Mixtures of Poly (Ethylene Glycol) Lipids. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 105, n. 35, p. 8420–8430, 2001.

KAPOOR, H. et al. Formulation of amlodipine nano lipid carrier: Formulation design, physicochemical and transdermal absorption investigation. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 49, n. October 2018, p. 209–218, fev. 2019. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.jddst.2018.11.004>.

KASETVATIN, C.; RUJIVIPAT, S.; TIYABOONCHAI, W. Combination of elastic liposomes and low frequency ultrasound for skin permeation enhancement of hyaluronic acid. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 135, p. 458–464, nov. 2015. Disponível em:

https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0927776515301120.

KIM, S.; FUJITSUKA, M.; MAJIMA, T. Photochemistry of singlet oxygen sensor green. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 117, n. 45, p. 13985–13992, 2013.

KONDO, T.; KRISHNA, C. M.; RIESZ, P. Sonolysis, Radiolysis, and Hydrogen Peroxide Photolysis of Pyrimidine Derivatives in Aqueous Solutions : A Spin-Trapping Study. **Radiation Research**, v. 116, n. 1, p. 56–73, 1988.

KORE, G. et al. Polymeric Micelle as Multifunctional Pharmaceutical Carriers. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 14, n. 1, p. 288–307, 2014.

KUSHNER IV, J.; BLANKSCHTEIN, D.; LANGER, R. Experimental demonstration of the existence of highly permeable localized transport regions in low-frequency sonophoresis. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 93, n. 11, p. 2733–2745, 2004.

KUSHNER IV, J.; BLANKSCHTEIN, D.; LANGER, R. Ultrasound, Heterogeneity in Skin Treated with Low-Frequency. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 97, n. 10, p. 4119–4128, 2008a.

KUSHNER IV, 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. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 97, n. 2, p. 906– 918, 2008b.

KWAN, J. J. et al. Ultrasound-induced inertial cavitation from gas-stabilizing nanoparticles. **Physical Review E - Statistical, Nonlinear, and Soft Matter Physics**, v. 92, n. 2, p. 1–5, 2015.

LAI-CHEONG, J. E.; MCGRATH, J. A. Structure and function of skin, hair and nails. **Medicine**, v. 45, n. 6, p. 347–351, jun. 2017. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.mpmed.2017.03.004>.

LEE, J. et al. Effect of Surfactants on Inertial Cavitation Activity in a Pulsed Acoustic Field. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 109, n. 35, p. 16860–16865, set. 2005. Disponível em: https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jp0533271.

LEE, S. E. et al. Penetration Pathways Induced by Low-Frequency Sonophoresis with Physical and Chemical Enhancers: Iron Oxide Nanoparticles versus Lanthanum Nitrates. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 130, n. 4, p. 1063–1072, abr. 2010. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1038/jid.2009.361>.

LI, E. et al. Sinoporphyrin sodium based sonodynamic therapy induces anti-tumor effects in hepatocellular carcinoma and activates p53/caspase 3 axis. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, n. October 2018, p. 1–11, jan. 2019. Disponível em: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1357272519300160>.

LI, J.-H. et al. Calcium Overload Induces C6 Rat Glioma Cell Apoptosis in Sonodynamic Therapy. International journal of radiation biology, v. 87, n. 10, p. 1061–1066, out. 2011. Disponível em: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/09553002.2011.584938>. Acesso em: 24 out. 2017.

LI, Q. et al. The Effects of Ce6-Mediated Sono-Photodynamic Therapy on Cell Migration, Apoptosis and Autophagy in Mouse Mammary 4T1 Cell Line. **Ultrasonics**, v. 54, n. 4, p. 981–989, abr. 2014. Disponível em: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0041624X13003338>. Acesso em: 24 out. 2017.

LIANG, L. et al. The Combined Effects of Hematoporphyrin Monomethyl Ether-SDT and Doxorubicin on the Proliferation of QBC939 Cell Lines. **Ultrasound in medicine**

& biology, v. 39, n. 1, p. 146–160, jan. 2013. Disponível em: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0301562912005182. Acesso em: 24 out. 2017.

LICHTENBERG, D.; OPATOWSKI, E.; KOZLOV, M. M. Phase boundaries in mixtures of membrane-forming amphiphiles and micelle-forming amphiphiles. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1508, n. 1–2, p. 1–19, 2000.

LIU, H. et al. Singlet Oxygen Sensor Green is not a Suitable Probe for 1O2 in the Presence of Ionizing Radiation. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 8393, 10 dez. 2019. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1038/s41598-019-44880-2>.

LOAN HONEYWELL-NGUYEN, P. et al. The in vivo and in vitro interactions of elastic and rigid vesicles with human skin. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) -General Subjects**, v. 1573, n. 2, p. 130–140, nov. 2002. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304416502004154>.

LOGAN, K. et al. Targeted chemo-sonodynamic therapy treatment of breast tumours using ultrasound responsive microbubbles loaded with paclitaxel, doxorubicin and Rose Bengal. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 139, n. January, p. 224–231, 2019. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2019.04.003>.

LOPEZ, R. F. V. et al. Enhancing the transdermal delivery of rigid nanoparticles using the simultaneous application of ultrasound and sodium lauryl sulfate. **Biomaterials**, v. 32, n. 3, p. 933–941, jan. 2011. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.09.060>.

LOPEZ, R. F. V.; GRATIERI, T.; GELFUSO, G. M. **Physical Methods to Increase Topical and Transdermal Drug Delivery**. 1st. ed. Kerala: Transworld Research Network, 2012.

LUKYANOV, A. N. et al. Polyethylene Glycol-Diacyllipid Micelles Demonstrate Increased Acculumation in Subcutaneous Tumors in Mice. **Pharmaceutical Research**, v. 19, n. 10, p. 1424–1429, jul. 2002.

LUKYANOV, A. N.; TORCHILIN, V. P. Micelles from lipid derivatives of water-soluble polymers as delivery systems for poorly soluble drugs. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, n. 9, p. 1273–1289, maio 2004. Disponível em: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169409X04000468>.

MA, R. et al. Oxygen and Indocyanine Green Loaded Microparticles for Dual-Mode Imaging and Sonodynamic Treatment of Cancer Cells. **Ultrasonics sonochemistry**, v. 39, p. 197–207, nov. 2017. Disponível em: <http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L61 5632772>. Acesso em: 24 out. 2017. MAHMOUD, N. N. et al. Preferential Accumulation of Phospholipid-PEG and Cholesterol-PEG Decorated Gold Nanorods into Human Skin Layers and Their Photothermal-Based Antibacterial Activity. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 5796, 8 dez. 2019. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1038/s41598-019-42047-7.

MAIBACH, H. I.; DRAGICEVIC, N. Percutaneous Penetration Enhancers Chemical Methods in Penetration Enhancement. New York: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2016.

MAKINO, K.; MOSSOBA, M. M.; RIESZ, P. Chemical effects of ultrasound on aqueous solutions. Formation of hydroxyl radicals and hydrogen atoms. **Journal of Physical Chemistry**, v. 87, n. 8, p. 1369–1377, 1983.

MANIKKATH, J. et al. Influence of peptide dendrimers and sonophoresis on the transdermal delivery of ketoprofen. **International journal of pharmaceutical Sciences and Research**, v. 521, n. 2, p. 110–119, 2017a.

MANIKKATH, J. et al. Low frequency ultrasound and PAMAM dendrimer facilitated transdermal delivery of ketoprofen. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 41, p. 334–343, 2017b. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.jddst.2017.07.021>.

MARUANI, A. et al. Low-frequency ultrasound sonophoresis to increase the efficiency of topical steroids: A pilot randomized study of humans. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 395, n. 1–2, p. 84–90, 2010a.

MARUANI, A. et al. Efficiency of low-frequency ultrasound sonophoresis in skin penetration of histamine: A randomized study in humans. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 385, n. 1–2, p. 37–41, 2010b.

MCEWAN, C. et al. Polymeric Microbubbles as Delivery Vehicles for Sensitizers in Sonodynamic Therapy. Langmuir: the ACS journal of surfaces and colloids, v. 30, n. 49, p. 14926–14930, dez. 2014. Disponível em: http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/la503929c>. Acesso em: 24 out. 2017.

MCEWAN, C. et al. Oxygen Carrying Microbubbles for Enhanced Sonodynamic Therapy of Hypoxic Tumours. **Journal of Controlled Release**, v. 203, p. 51–56, abr. 2015. Disponível em:

http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168365915000942>. Acesso em: 24 out. 2017.

MCEWAN, C. et al. Combined Sonodynamic and Antimetabolite Therapy for the Improved Treatment of Pancreatic Cancer Using Oxygen Loaded Microbubbles as a Delivery Vehicle. **Biomaterials**, v. 80, p. 20–32, fev. 2016a. Disponível em: http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L60 7408556>. Acesso em: 24 out. 2017.

MCEWAN, C. et al. Comparing the Efficacy of Photodynamic and Sonodynamic Therapy in Non-Melanoma and Melanoma Skin Cancer. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 24, n. 13, p. 3023–3028, jul. 2016b. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0968089616303406>. Acesso em: 24 out. 2017.

MCHALE, A. P. et al. Sonodynamic Therapy: Concept, Mechanism and Application to Cancer Treatment. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 880, p. 429–450, 2016. Disponível em: http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-22536-4_22>. Acesso em: 24 out. 2017.

MD, S. et al. Lipid based nanocarriers system for topical delivery of photosensitizers. **Drug Discovery Today**, v. 22, n. 8, p. 1274–1283, 2017. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.drudis.2017.04.010>.

MILLER, D. L.; THOMAS, R. M.; BUSCHBOM, R. L. Comet assay reveals DNA strand breaks induced by ultrasonic cavitation in vitro. **Ultrasound in Medicine and Biology**, v. 21, n. 6, p. 841–848, 1995.

MILLER, D. L.; THOMAS, R. M.; FRAZIER, M. E. Ultrasonic cavitation indirectly induces single strand breaks in DNA of viable cells in vitro by the action of residual hydrogen peroxide. **Ultrasound in Medicine and Biology**, v. 17, n. 7, p. 729–735, 1991.

MILOWSKA, K.; GABRYELAK, T. Synergistic effect of ultrasound and phthalocyanines on nucleated erythrocytes in vitro. **Ultrasound in Medicine and Biology**, v. 31, n. 12, p. 1707–1712, 2005.

MITRAGOTRI, S. et al. A mechanistic study of ultrasonically-enhanced transdermal drug delivery. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 84, n. 6, p. 697–706, 1995.

MITRAGOTRI, S. Synergistic effect of enhancers for transdermal drug delivery. **Pharmaceutical Research**, v. 17, n. 11, p. 1354–1359, 2000.

MITRAGOTRI, S.; BLANKSCHTEIN, D.; LANGER, R. Transdermal drug delivery using low-frequency sonophoresis. **Pharmaceutical Research**, v. 13, n. 3, p. 411–420, 1996.

MITRAGOTRI, S.; KOST, J. Low-frequency sonophoresis: A review. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, n. 5, p. 589–601, 2004.

MIYOSHI, N. et al. Combination of Sonodynamic and Photodynamic Therapy against Cancer Would Be Effective through Using a Regulated Size of Nanoparticles. **Nanoscience and nanoengineering**, v. 4, n. 1, p. 1–11, fev. 2016.

MOCANU, M. N.; YAN, F. Ultrasound-Assisted Interaction between Chlorin-E6 and Human Serum Albumin: PH Dependence, Singlet Oxygen Production, and Formulation Effect. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 190, p. 208–214, fev. 2018. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1386142517307357>. Acesso em: 24 out. 2017.

MONTANHA, M. C. et al. Response surface method optimization of a novel Hypericin formulation in P123 micelles for colorectal cancer and antimicrobial photodynamic therapy. **Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology**, v. 170, p. 247–255, 2017. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2017.04.008>.

MOOSAVI NEJAD, S. et al. Acute Effects of Sono-Activated Photocatalytic Titanium Dioxide Nanoparticles on Oral Squamous Cell Carcinoma. Ultrasonics Sonochemistry, 32. 95–101, 2016. Disponível v. p. set. em: <a>http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1350417716300669>. Acesso em: 24 out. 2017.

MORIMOTO, Y. et al. Elucidation of the transport pathway in hairless rat skin enhanced by low-frequency sonophoresis based on the solute-water transport relationship and confocal microscopy. **Journal of Controlled Release**, v. 103, n. 3, p. 587–597, 2005.

NEVES BORGHETI-CARDOSO, L. et al. Topical and Transdermal Delivery of Drug-Loaded Nano/ Microsystems with Application of Physical Enhancement Techniques. **Current Drug Targets**, v. 17, n. 13, p. 1545–1559, set. 2016. Disponível em: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1389-4501&volume=17&issue=13&spage=1545>.

NIELSEN, F. et al. Plasma malondialdehyde as biomarker for oxidative stress: Reference interval and effects of life-style factors. **Clinical Chemistry**, v. 43, n. 7, p. 1209–1214, 1997.

NOMIKOU, N. et al. The Effects of Ultrasound and Light on Indocyanine-Green-Treated Tumour Cells and Tissues. **ChemMedChem**, v. 7, n. 8, p. 1465–1471, ago. 2012. Disponível em: http://doi.wiley.com/10.1002/cmdc.201200233>. Acesso em: 24 out. 2017. NOMIKOU, N. et al. A versatile, stimulus-responsive nanoparticle-based platform for use in both sonodynamic and photodynamic cancer therapy. **Acta Biomaterialia**, v. 49, p. 414–421, 2017.

OSMINKINA, L. A. et al. Nanoparticles Prepared from Porous Silicon Nanowires for Bio-Imaging and Sonodynamic Therapy. **Nanoscale research letters**, v. 9, n. 1, p. 463, 2014. Disponível em: <http://nanoscalereslett.springeropen.com/articles/10.1186/1556-276X-9-463>. Acesso em: 24 out. 2017.

OSMINKINA, L. A. et al. Porous silicon nanoparticles as efficient sensitizers for sonodynamic therapy of cancer. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 210, p. 169–175, jul. 2015. Disponível em: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1387181115001213>.

PALIWAL, S.; MENON, G. K.; MITRAGOTRI, S. Low-frequency sonophoresis: Ultrastructural basis for stratum corneum permeability assessed using quantum dots. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 126, n. 5, p. 1095–1101, 2006. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1038/sj.jid.5700248>.

PAN, X. et al. Sonodynamic therapy (SDT): a novel strategy for cancer nanotheranostics. **Science China Life Sciences**, v. 61, n. 4, p. 415–426, 2018.

PANG, X. et al. Natural Products in the Discovery of Novel Sonosensitizers. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 162, p. 144–151, jun. 2016. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0163725815002302>. Acesso em: 24 out. 2017.

PATIL, P. H. et al. Aripiprazole-Loaded Polymeric Micelles: Fabrication, Optimization and Evaluation using Response Surface Method. **Recent Patents on Drug Delivery & Formulation**, v. 12, p. 53–64, 2018.

PEREIRA, T. A. Influência do ultrassom de baixa frequência associado à hidrogéis na permeabilidade da pele e no tratamento tópico do câncer de pele Influência do ultrassom de baixa frequência associado à hidrogéis na permeabilidade da pele e no tratamento tópico do cânc. 2015. Universidade de São Paulo, 2015.

PEREIRA, T. A.; RAMOS, D. N.; LOPEZ, R. F. V. Hydrogel increases localized transport regions and skin permeability during low frequency ultrasound treatment. **Scientific Reports**, v. 7, n. February, p. 1–10, 2017. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1038/srep44236>.

PETRILLI, R. et al. Skin cancer treatment effectiveness is improved by iontophoresis of EGFR-targeted liposomes containing 5-FU compared with subcutaneous injection. **Journal of Controlled Release**, v. 283, n. June, p. 151–162, ago. 2018. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2018.05.038>.

POLAT, B. E. et al. Transport Pathways and Enhancement Mechanisms Within Localized and Non-Localized Transport Regions in Skin Treated with Low-Frequency Sonophoresis and Sodium Lauryl Sulfate. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 100, n. 2, p. 512–529, 2011a.

POLAT, B. E. et al. Ultrasound-mediated transdermal drug delivery: Mechanisms, scope, and emerging trends. **Journal of Controlled Release**, v. 152, n. 3, p. 330–348, jun. 2011b. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.01.006>.

POLAT, B. E. et al. **Physical Methods to Increase Topical and Transdermal Drug Delivery**. 1st. ed. Kerala: Transworld Research Network, 2012a.

POLAT, B. E. et al. A physical mechanism to explain the delivery of chemical penetration enhancers into skin during transdermal sonophoresis - Insight into the observed synergism. **Journal of Controlled Release**, v. 158, n. 2, p. 250–260, 2012b. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.11.008>.

POLAT, B. E.; BLANKSCHTEIN, D.; LANGER, R. Low-frequency sonophoresis: application to the transdermal delivery of macromolecules and hydrophilic drugs. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 7, n. 12, p. 1415–1432, 2010. Disponível em: http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1517/17425247.2010.538679>.

RANGSIMAWONG, W. et al. Mechanistic study of decreased skin penetration using a combination of sonophoresis with sodium fluorescein-loaded PEGylated liposomes with D-limonene. **International Journal of Nanomedicine**, v. 10, p. 7413–7423, dez. 2015. Disponível em: ">https://www.dovepress.com/mechanistic-study-of-decreased-skin-penetration-using-a-combination-of-peer-reviewed-article-IJN>">https://www.dovepress.com/mechanistic-study-of-decreased-skin-penetration-using-a-combination-of-peer-reviewed-article-IJN>">https://www.dovepress.com/mechanistic-study-of-decreased-skin-penetration-using-a-combination-of-peer-reviewed-article-IJN>">https://www.dovepress.com/mechanistic-study-of-decreased-skin-penetration-using-a-combination-of-peer-reviewed-article-IJN>">https://www.dovepress.com/mechanistic-study-of-decreased-skin-penetration-using-a-combination-of-peer-reviewed-article-IJN>">https://www.dovepress.com/mechanistic-study-of-decreased-skin-penetration-using-a-combination-of-peer-reviewed-article-IJN>">https://www.dovepress.com/mechanistic-study-of-decreased-skin-penetration-using-a-combination-of-peer-reviewed-article-IJN>">https://www.dovepress.com/mechanistic-study-of-decreased-skin-penetration-using-a-combination-of-peer-reviewed-article-IJN>">https://www.dovepress.com/mechanistic-study-of-decreased-skin-penetration-using-a-combination-of-peer-reviewed-article-IJN>">https://www.dovepress.com/mechanistic-study-of-decreased-skin-penetration-using-a-combination-of-peer-reviewed-article-IJN>">https://www.dovepress.com/mechanistic-study-of-decreased-skin-penetration-using-a-combination-of-peer-reviewed-article-IJN>">https://www.dovepress.com/mechanistic-study-of-decreased-skin-penetration-using-a-combination-of-peer-reviewed-article-IJN>">https://www.dovepress.com/mechanistic-study-of-decreased-skin-penetration-using-a-combination-of-peer-reviewed-article-IJN>">https://www.dovepress.c

REDDY, B. P. K. et al. Polymeric Micelles as Novel Carriers for Poorly SolubleDrugs— Review. Journal of Nanoscience and Nanotechnology, v. 15, n. 6, p.4009–4018,1jun.2015.Chttp://openurl.ingenta.com/content/xref?genre=article&issn=1533-

4880&volume=15&issue=6&spage=4009>.

RENGENG, L. et al. Sonodynamic Therapy, a Treatment Developing fromPhotodynamic Therapy.Photodiagnosis and photodynamic therapy, v. 19, p.159–166,set.2017.Disponívelem:

http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1572100016302320>. Acesso em: 24 out. 2017.

RIBEIRO, L. N. D. M. et al. Use of nanoparticle concentration as a tool to understand the structural properties of colloids. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–8, 2018.

ROSENTHAL, I.; SOSTARIC, J. Z.; RIESZ, P. Sonodynamic therapy: a review of the synergistic effects of drugs and ultrasound. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 11, n. 6, p. 349–363, 2004.

RUPP, C.; STECKEL, H.; MÜLLER, B. W. Solubilization of poorly water-soluble drugs by mixed micelles based on hydrogenated phosphatidylcholine. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 395, n. 1–2, p. 272–280, 2010a.

RUPP, C.; STECKEL, H.; MÜLLER, B. W. Mixed micelle formation with phosphatidylcholines: The influence of surfactants with different molecule structures. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 387, n. 1–2, p. 120–128, 2010b.

SAZGARNIA, A. et al. Detection of Sonoluminescence Signals in a Gel Phantom in the Presence of Protoporphyrin IX Conjugated to Gold Nanoparticles. **Ultrasonics**, v. 53, n. 1, p. 29–35, jan. 2013. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0041624X12000704>. Acesso em: 24 out. 2017.

SETO, J. E. et al. 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. **Journal of Controlled Release**, v. 145, n. 1, p. 26–32, 1 jul. 2010. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2010.03.013>.

SEZGIN-BAYINDIR, Z. et al. Evaluation of various block copolymers for micelle formation and brain drug delivery: In vitro characterization and cellular uptake studies. Journal of Drug Delivery Science and Technology, v. 36, p. 120–129, dez. 2016. Disponível em:

https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1773224716303355>

SEZGIN, Z.; YUKSEL, N.; BAYKARA, T. Preparation and Characterization of Polymeric Micelles for Solubilization of Poorly Soluble Anticancer Drugs. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 64, n. 3, p. 261–268, nov. 2006.

SHANEI, A. et al. Sonodynamic Therapy Using Protoporphyrin IX Conjugated to Gold Nanoparticles: An In Vivo Study on a Colon Tumor Model. **Iranian journal of basic medical sciences**, v. 15, n. 2, p. 759–767, mar. 2012.

SHEN, S. et al. Core-Shell Structured Fe3O4@TiO2-Doxorubicin Nanoparticles for Targeted Chemo-Sonodynamic Therapy of Cancer. **International journal of pharmaceutics**, v. 486, n. 1–2, p. 380–388, maio 2015. Disponível em: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378517315002860>. Acesso em: 24 out. 2017.

SHENG, Y. et al. Magnetically Responsive Microbubbles as Delivery Vehicles for Targeted Sonodynamic and Antimetabolite Therapy of Pancreatic Cancer. **Journal of**

Controlled Release, v. 262, p. 192–200, set. 2017. Disponível em: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168365917307605>. Acesso em: 24 out. 2017.

SIBATA, M. N.; TEDESCO, A. C.; MARCHETTI, J. M. Photophysicals and photochemicals studies of zinc(II) phthalocyanine in long time circulation micelles for photodynamic therapy use. European journal of pharmaceutical sciences: official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences, v. 23, n. 2, p. 131–138, 2004.

SU, X. et al. Protoporphyrin IX-Mediated Sonodynamic Action Induces Apoptosis of K562 Cells. **Ultrasonics**, v. 54, n. 1, p. 275–284, jan. 2014. Disponível em: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0041624X13002187. Acesso em: 24 out. 2017.

SU, X. et al. The Role of Beclin 1 in SDT-Induced Apoptosis and Autophagy in Human Leukemia Cells. **International Journal of Radiation Biology**, v. 91, n. 6, p. 472–479, 3 jun. 2015. Disponível em: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/09553002.2015.1021961>. Acesso em: 24 out. 2017.

SUN, F. et al. A Mixed Micelle Formulation for Oral Delivery of Vitamin K. **Pharmaceutical Research**, v. 33, n. 9, p. 2168–2179, 2016.

TAKEMAE, K. et al. Function of Epirubicin-Conjugated Polymeric Micelles inSonodynamic Therapy. Frontiers in Pharmacology, v. 10, n. May, p. 1–10, 21 maio2019.Disponívelem:

https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fphar.2019.00546/full.

TANG, H. et al. An investigation of the role of cavitation in low-frequency ultrasoundmediated transdermal drug transport. **Pharmaceutical Research**, v. 19, n. 8, p. 1160–1169, 2002.

TANG, Q. et al. Efficacy of Indocyanine Green-Mediated Sonodynamic Therapy on

Rheumatoid Arthritis Fibroblast-like Synoviocytes. **Ultrasound in medicine & biology**, v. 43, n. 11, p. 2690–2698, nov. 2017. Disponível em: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0301562917302983. Acesso em: 24 out. 2017.

TERAHARA, T. et al. Dependence of low-frequency sonophoresis on ultrasound parameters; distance of the horn and intensity. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 235, n. 1–2, p. 35–42, 2002.

TEZEL, A. et al. Frequency dependence of sonophoresis. **Pharmaceutical Research**, v. 18, n. 12, p. 1694–1700, 2001.

TEZEL, A. et al. Synergistic effect of low-frequency ultrasound and surfactants on skin permeability. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 91, n. 1, p. 91–100, 2002.

TEZEL, A. et al. Topical delivery of anti-sense oligonucleotides using low-frequency sonophoresis. **Pharmaceutical Research**, v. 21, n. 12, p. 2219–2225, 2004.

TEZEL, A.; SENS, A.; MITRAGOTRI, S. Description of transdermal transport of hydrophilic solutes during low-frequency sonophoresis based on a modified porous pathway model. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 92, n. 2, p. 381–393, 2003.

TRAN, M. A. et al. Targeting V600EB-Raf and Akt3 Using Nanoliposomal-Small Interfering RNA Inhibits Cutaneous Melanocytic Lesion Development. **Cancer Research**, v. 68, n. 18, p. 7638–7649, 15 set. 2008. Disponível em: <http://cancerres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/0008-5472.CAN-07-6614>.

TRENDOWSKI, M. The Promise of Sonodynamic Therapy. Cancer and Metastasis Reviews. 33. n. 1. p. 143–160, 18 mar. 2014. Disponível V. em: <a>http://link.springer.com/10.1007/s10555-013-9461-5>. Acesso em: 24 out. 2017. TRENDOWSKI, M. Using the Promise of Sonodynamic Therapy in the Clinical Setting against Disseminated Cancers. Chemotherapy research and practice, v. 2015. 316015. 2015a. p. Disponível em: http://www.hindawi.com/journals/cherp/2015/316015/. Acesso em: 24 out. 2017. TRENDOWSKI, M. The Inherent Metastasis of Leukaemia and Its Exploitation by Sonodynamic Therapy. Critical reviews in oncology/hematology, v. 94, n. 2, p. 149-163, maio 2015b. Disponível em: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1040842814002339>. Acesso em: 24 out. 2017.

TZERKOVSKY, D. A. et al. Sono-Photodynamic Therapy with Photolon for Recurrence Glioblastoma Grade IV: Case Report and Review of Experimental Studies. Journal of Analytical Oncology, v. 5, n. 2, p. 62–66, 9 maio 2016. Disponível em:

http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L61 0726504>.

UEDA, H.; SUGIBAYASHI, K.; MORIMOTO, Y. Skin penetration-enhancing effect of drugs by phonophoresis. **Journal of Controlled Release**, v. 37, n. 3, p. 291–297, 1995.

UMEMURA, S.-I. et al. Sonodynamic Approach to Tumor Treatment. In: IEEE 1992 Ultrasonics Symposium Proceedings, Tucson, AZ, USA. **Anais**... Tucson, AZ, USA: IEEE, 1992.

UMEMURA, S.-I.; YUMITA, N.; NISHIGAKI, R. Enhancement of Ultrasonically Induced Cell Damage by a Gallium-Porphyrin Complex, ATX-70. Japanese Journal of Cancer Research, v. 84, p. 582–588, 1993.

VAN DEN BERGH, B. A. I. et al. Interactions of elastic and rigid vesicles with human skin in vitro: electron microscopy and two-photon excitation microscopy. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1461, n. 1, p. 155–173, nov. 1999. Disponível em: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0005273699001765>.

WAN, G.-Y. et al. Recent Advances of Sonodynamic Therapy in Cancer Treatment. **Cancer biology & medicine**, v. 13, n. 3, p. 325–338, set. 2016. Disponível em: http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L61 2916662>.

WAN, M.; TER HAAR, Y. F. G. **Cavitation in Biomedicine**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2015.

WANG, H. et al. Changes in cell migration due to the combined effects of sonodynamic therapy and photodynamic therapy on MDA-MB-231 cells. **Laser Physics Letters**, v. 12, n. 3, 2015a.

WANG, S. et al. 5-Aminolevulinic Acid-Mediated Sonodynamic Therapy Reverses Macrophage and Dendritic Cell Passivity in Murine Melanoma Xenografts. **Ultrasound in medicine & biology**, v. 40, n. 9, p. 2125–2133, set. 2014. Disponível em: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0301562914002920. Acesso em: 24 out. 2017.

WANG, X. et al. Sonodynamic and Photodynamic Therapy in Advanced Breast

Carcinoma: A Report of 3 Cases. Integrative cancer therapies, v. 8, n. 3, p. 283– 287, 8 set. 2009. Disponível em: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1534735409343693>. Acesso em: 24 out. 2017.

WANG, X. et al. Combination of Protoporphyrin IX-Mediated Sonodynamic Treatment with Doxorubicin Synergistically Induced Apoptotic Cell Death of a Multidrug-Resistant Leukemia K562/DOX Cell Line. **Ultrasound in medicine & biology**, v. 41, n. 10, p. 2731–2739, out. 2015b. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0301562915003981>. Acesso em: 24 out. 2017.

WEBBER, S. E. Fluorescence of polymers: A probe of polymer assemblies. **Macromolecular Symposia**, v. 143, n. 1, p. 359–370, ago. 1999. Disponível em: http://doi.wiley.com/10.1002/masy.19991430126>.

WEIMANN, L. J.; WU, J. Transdermal delivery of poly-I-lysine by sonomacroporation. **Ultrasound in Medicine and Biology**, v. 28, n. 9, p. 1173–1180, 2002.

WOLLOCH, L.; KOST, J. The importance of microjet vs shock wave formation in sonophoresis. **Journal of Controlled Release**, v. 148, n. 2, p. 204–211, 2010. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2010.07.106>.

WOOD, A. K. W. W.; SEHGAL, C. M. A Review of Low-Intensity Ultrasound for Cancer Therapy. Ultrasound in Medicine and Biology, v. 41, n. 4, p. 905–928, abr.
2015. Disponível em:

http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0301562914007662>. Acesso em: 24 out. 2017.

XIE, R. et al. The Combination of Glycolytic Inhibitor 2-Deoxyglucose and Microbubbles Increases the Effect of 5-Aminolevulinic Acid-Sonodynamic Therapy in Liver Cancer Cells. **Ultrasound in medicine & biology**, v. 43, n. 11, p. 2640–2650, nov. 2017. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0301562917302995>. Acesso em: 24 out. 2017.

XU, H. et al. The decomposition of protoporphyrin IX by ultrasound is dependent on the generation of hydroxyl radicals. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 27, p. 623–630, 2015a.

XU, H. N. et al. Preparation and sonodynamic activities of water-soluble tetra- α -(3-carboxyphenoxyl) zinc(II) phthalocyanine and its bovine serum albumin conjugate.

Ultrasonics Sonochemistry, v. 22, p. 125–131, 2015b. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.ultsonch.2014.05.019>.

YAGHMUR, A. et al. Argan Oil-In-Water Emulsions: Preparation and Stabilization. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 76, n. 1, p. 15–18, 1999.

YAGI, K. A simple fluorometric assay for lipoperoxide in blood plasma. **Biochemical Medicine**, v. 15, n. 2, p. 212–216, abr. 1976. Disponível em: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0006294476900491>.

YAMAGUCHI, S. et al. Sonodynamic Therapy Using Water-Dispersed TiO2-Polyethylene Glycol Compound on Glioma Cells: Comparison of Cytotoxic Mechanism with Photodynamic Therapy. **Ultrasonics sonochemistry**, v. 18, n. 5, p. 1197–1204, set. 2011. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1350417710002683>. Acesso em: 24 out. 2017.

YAMAMOTO, S. et al. In Vitro Sonodynamic Therapeutic Effect of Polyion Complex
Micelles Incorporating Titanium Dioxide Nanoparticles. Nanomaterials (Basel,
Switzerland), v. 7, n. 9, p. 268, set. 2017. Disponível em:
http://www.mdpi.com/2079-4991/7/9/268. Acesso em: 24 out. 2017.

YANG, L. et al. The Efficacy and Mechanism of Apoptosis Induction by Hypericin-Mediated Sonodynamic Therapy in THP-1 Macrophages. **International journal of nanomedicine**, v. 10, p. 821–838, jan. 2015. Disponível em: <http://www.dovepress.com/the-efficacy-and-mechanism-of-apoptosis-induction-byhypericin-mediate-peer-reviewed-article-IJN>. Acesso em: 24 out. 2017.

YANG, Y. et al. Photo- and Sono-dynamic therapy: A review of mechanisms and considerations for pharmacological agents used in therapy incorporating light and sound. **Current Pharmaceutical Design**, v. 24, p. 1–12, 2019.

YILDIRIM, A. et al. Understanding Acoustic Cavitation Initiation by Porous Nanoparticles: Toward Nanoscale Agents for Ultrasound Imaging and Therapy. **Chemistry of Materials**, v. 28, n. 16, p. 5962–5972, ago. 2016. Disponível em: http://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.chemmater.6b02634>.

YUE, W. et al. Checkpoint blockade and nanosonosensitizer-augmented noninvasive sonodynamic therapy combination reduces tumour growth and metastases in mice. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, p. 2025, dez. 2019. Disponível em: http://www.nature.com/articles/s41467-019-09760-3>.

YUMITA, N. et al. Hematoporphyrin as a Sensitizer of Cell-damaging Effect of

Ultrasound. Japanese Journal of Cancer Research, v. 80, p. 219–222, 1989.

YUMITA, N. et al. Synergistic Effect of Ultrasound and Hematoporphyrin on Sarcoma 180. Japanese Journal of Cancer Research, v. 81, p. 304–308, 1990.

YUMITA, N. et al. Membrane lipid peroxidation as a m echanism of sonodynam ically induced erythrocyte lysis. **International journal of radiation biology**, v. 69, n. 3, p. 397–404, 1996.

YUMITA, N. et al. Sonodynamically induced cell damage and membrane lipid peroxidation by novel porphyrin derivative, DCPH-P-Na(I). **Anticancer Research**, v. 30, n. 6, p. 2241–2246, 2010.

YUMITA, N. et al. Sonodynamically-Induced Anticancer Effects by Functionalized Fullerenes. **Anticancer research**, v. 33, n. 8, p. 3145–3151, ago. 2013.

YUMITA, N. et al. Involvement of Reactive Oxygen Species in the Enhancement of Membrane Lipid Peroxidation by Sonodynamic Therapy with Functionalized Fullerenes. **Anticancer research**, v. 34, n. 11, p. 6481–6487, nov. 2014. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25368249. Acesso em: 24 out. 2017.

ZHANG, Q. et al. Sonodynamic therapy-assisted immunotherapy: A novel modality for cancer treatment. **Cancer Science**, v. 109, n. 5, p. 1330–1345, 2018.

ZHENG, X. et al. Apoptosis of THP-1 Macrophages Induced by Pseudohypericin-Mediated Sonodynamic Therapy Through the Mitochondria-Caspase Pathway. **Cellular physiology and biochemistry: international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology**, v. 38, n. 2, p. 545–557, 1 fev. 2016. Disponível em: http://www.karger.com/?doi=10.1159/000438649>. Acesso em: 24 out. 2017.