UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Nanopartículas lipídicas sólidas e vesículas cataniônicas contendo
ftalocianina de cloro alumínio aplicadas nos processos
fotodinâmicos**

Patrícia Leme Goto

Ribeirão Preto
2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Nanopartículas lipídicas sólidas e vesículas cataniônicas contendo
ftalocianina de cloro alumínio aplicadas nos processos
fotodinâmicos**

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

Área de Concentração: Medicamentos e
Cosméticos

Orientado(a): Patrícia Leme Goto

Orientador(a): Prof. Dr. Antonio Claudio
Tedesco

Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de pós-graduação
em Ciências Farmacêuticas em 15/03/2016. A versão original encontra-se disponível
na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto
2016

FICHA CATALOGRÁFICA

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

Goto, Patrícia Leme

Nanopartículas lipídicas sólidas e vesículas cataniônicas contendo ftalocianina de cloro alumínio aplicadas nos processos fotodinâmicos. Ribeirão Preto, 2016.
143 p.; 30cm.

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

Orientador: Tedesco, Antonio Claudio.

1. Nanopartículas lipídicas sólidas. 2. Vesículas cataniônicas. 3. Terapia fotodinâmica. 4 . Ftalocianina de cloro alumínio. 5. Câncer de pele tipo melanoma.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do aluno: Patrícia Leme Goto

Título do trabalho: Nanopartículas lipídicas sólidas e vesículas cataniônicas contendo ftalocianina de cloro alumínio aplicadas nos processos fotodinâmicos.

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

Área de Concentração: Medicamentos e
Cosméticos

Orientador(a): Prof. Dr. Antonio Claudio
Tedesco

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por sempre iluminar meu caminho e colocar nele pessoas e oportunidades que me ajudaram a crescer e evoluir.

Aos meus pais Carlos e Rosângela e à minha irmã Renata, nunca terei palavras para agradecer todo o apoio e amor incondicionais de vocês. Obrigada pelo incentivo e amparo, por possibilitarem a oportunidade de realizar meus sonhos e sempre acreditarem na minha capacidade. Sem vocês eu não conseguiria chegar aqui.

Ao meu orientador Prof. Dr. Antonio Claudio Tedesco agradeço pela oportunidade de desenvolver este projeto e pela orientação, confiança, respeito, compreensão, dedicação e todos os ensinamentos durante esses 4 anos de convivência e trabalho.

À colaboradora Profa. Dra. Muriel Blanzat, agradeço toda a confiança, apoio e cookies.

Ao Prof. Dr. Marigilson Pontes Siqueira-Moura, obrigada pela amizade, companheirismo, idéias e discussões brilhantes.

Ao Prof. Dr. Orlando David Henrique dos Santos, quem me indicou para o doutorado e abriu essa porta, quando eu não via mais saídas.

À técnica do laboratório Olímpia Paschoal Martins, meu anjo da guarda, agradeço por toda a sua ajuda que foi fundamental para o meu trabalho. Obrigada também pela amizade linda e sincera, pela alegria e incentivo todos os dias.

Ao Rodrigo Moreira, não consigo imaginar como seria passar por essa etapa sem você, companheiro para todas as horas e que torna meus dias mais leves e alegres. Obrigada por tudo!

À todos os CNETianos pelo apoio e amizade, em especial à Gra Gobbo, Nathy Nossi, Mary Melo e Nay Rezende, minhas grandes parceiras, agradeço por toda a ajuda dentro e fora do laboratório, pelos momentos de distração e por serem minhas confidentes.

Ao pessoal do IMRCP, pela ajuda e paciência, especialmente à Marie Belières e Hanh, pela amizade, apoio e preocupação, à Florence, pelo alto astral contagiante, e aos amigos Stephany Bëor, Camille, Guillaume Bordeaux, Claire Lafossas, Jérémy Le Dall, Ophelie Riou, Stephane Lemonier, Alix Poinso e Baptiste.

Aos amigos que me acompanharam aqui em Ribeirão Preto André Miotello, Andrielle Castilho, Dani Jardim, Gisele Sakamoto, Ivanildes Vasconcelos, Juliana Neves, Bruna

Melchior e meu Tufãozinho, Nathalia Cury, Thiago Munhoz, Natalia Versiane e sua família linda que me acolheram, Melina Mathiessen pela cia nas idas e vindas de Ilha.

Aos queridos amigos italianos Marta Penconi, Luca Golinucci, Alessio Fuoco, Stéfano Di Sabatino e aos brasileiros Giani Garcia, Hydor Mezdri, Angelica Santos, Sofia Mafra, Rafael Esteves, Igor Duff, Priscila Evangelista e Luiza Morin pelas inesquecíveis viagens e aventuras.

Um agradecimento especial à madame Catherine Barengo, por todo o apoio e amizade.

Aos amigos de Ilha Solteira e de Ouro Preto e aos tios, tias, primos e primas Leme, Goto e Ferrari, obrigada por sempre estarem ao meu lado e me apoiaram nessa caminhada.

Aos técnicos Henrique Diniz, José Augusto Maulin, Ivana Aparecida Borim, Lourivaldo dos Santos Pereira e ao Marcelo Rodrigues Pinto, pela ajuda nas análises realizadas.

Ao programa de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da FCFRP – USP e à Universidade de São Paulo, por todo apoio.

À Capes, CNPq e ao programa Ciências sem Fronteiras, pelo apoio financeiro.

RESUMO

Goto, P.L. **Nanopartículas lipídicas sólidas e vesículas cataniônicas contendo ftalocianina de cloro alumínio aplicadas nos processos fotodinâmicos**. 2016. 143 f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

O trabalho apresentado foi realizado em duas etapas independentes e baseou-se no estudo de diferentes sistemas nanométricos para viabilizar a aplicação da ftalocianina de cloro alumínio (CIAIPc) na terapia fotodinâmica (TFD) para o tratamento do câncer de pele do tipo melanoma. O fármaco fotossensibilizante (FS) utilizado apresenta propriedades físico-químicas que lhe permitem exercer sua atividade fotodinâmica com excelência, sem a interferência do cromóforo endógeno melanina existente nas células melanocíticas. Para driblar sua elevada hidrofobicidade, CIAIPc foi encapsulada em sistemas nanométricos para administração em meio fisiológico. Inicialmente nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) foram desenvolvidas por emulsificação direta, após um estudo de elaboração do diagrama de fases. O compritol foi o lipídio sólido escolhido para compor as NLS, com diferentes concentrações de CIAIPc. Todas as formulações desenvolvidas foram devidamente caracterizadas, com tamanho médio entre 100 e 200 nm, baixa polidispersão, potencial zeta adequadamente negativo ($\sim |30|$ mV), *drug loading* de CIAIPc entre 76-94% (com pequena redução após 24 meses) e alta eficiência de encapsulação (E.E.). A morfologia arredondada das nanopartículas foi confirmada por microscopia eletrônica de transmissão e de força atômica. A estabilidade das NLS foi de 24 meses. A avaliação da cristalinidade do lipídio revelou a integração da CIAIPc à matriz lipídica da NLS, presença de estruturas polimórficas e grau de cristalinidade adequado, sem alterações após 24 meses. Nos estudos de difusão *in vitro*, observou-se que ftalocianina encapsulada nas NLS acumulam-se preferencialmente na epiderme e derme do que no estrato córneo, sem traços de permeação do ativo. Foi confirmado o caráter biocompatível das NLS sobre fibroblastos NIH-3T3. A ftalocianina encapsulada nas NLS não foi tóxica na linhagem de melanoma B16-F10 na ausência de luz, porém, apresentou excelente efeito fototóxico ($0,75 \mu\text{g mL}^{-1}$ de CIAIPc nanoencapsulada e irradiação entre 0,5 e 2,0 J cm⁻²), com redução da viabilidade celular de 87%. O segundo sistema de veiculação estudado foram as vesículas cataniônicas (VesCat), que se formam espontaneamente em água com o tensoativo TriCat 12. A obtenção das vesículas contendo CIAIPc envolve uma etapa adicional, para remoção de solvente orgânico, que foi aprimorada, reduzindo o tempo de produção em 55%. As VesCat/CIAIPc obtidas mantiveram suas propriedades físico-químicas e morfologia arredondada (confirmada por microscopia eletrônica de varredura), *drug loading* de 47% e alta E.E. Os resultados comprovaram que a aplicação desses dois sistemas nanométricos é altamente eficiente para aplicação da TFD no tratamento do câncer de pele do tipo melanoma ou outras doenças cutâneas, apresentando características favoráveis para avanços nos estudos de fase clínica e pré-clínica.

Palavras chave: nanopartículas lipídicas sólidas, vesículas cataniônicas, terapia fotodinâmica, ftalocianina de cloro alumínio, câncer de pele tipo melanoma.

ABSTRACT

Goto, P.L. **Solid lipid nanoparticles and catanionic vesicles loaded with aluminum phthalocyanine chloride to be applied in photodynamic process**. 2016. 143 f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

The present work was conducted in two independent steps, which were based on the study of different nanometric systems that make feasible the application of aluminum phthalocyanine chloride (ClAlPc) in the photodynamic therapy (PDT) to the melanoma skin cancer treatment. The photosensitizer (PS) used has physical-chemical properties that allow it to perform its photodynamic activity with excellence, without the interference of the melanin, an endogenous chromophore found in melanotic cells. In order to circumvent the high PS hydrophobicity, ClAlPc was encapsulated into nanosystems to administration in physiological environment. At first, solid lipid nanoparticles (SLN) were developed by direct emulsification process after drawing up phase diagram study. The solid lipid compritol was chosen to make the SLN, produced with different ClAlPc concentrations. The developed samples were properly characterized with mean size between 100-200 nm, low polydispersity, negative zeta potential ($\sim|30|$ mV), ClAlPc drug loading around 76-94% (with slight decrease after 24 months) and high encapsulation efficiency (EE). The round shape of SLN was confirmed by transmission electron microscopy and atomic force microscopy. The nanoparticles were stable for at least 24 months. The evaluation of lipid crystallinity has proved the ClAlPc integration to SLN lipid matrix, the presence of polymorphic structures and a suitable crystalline degree, without large variations after 24 months. In the *in vitro* diffusion studies were observed that phthalocyanine conveyed in the nanoparticles accumulates preferably in the epidermis and dermis than in the stratum corneum, without any drug permeation traits. The NLS biocompatibility was confirmed on NIH-3T3 fibroblasts. ClAlPc-loaded NLS did not exhibit toxicity on B16-F10 melanoma cell line in the dark, but it was shown their outstanding phototoxicity effect ($0.75 \mu\text{g mL}^{-1}$ of encapsulated ClAlPc and irradiation between 0.5 and 2.0 J cm^{-2}) with cell viability reduction of 87%. The second drug delivery system studied were the catanionic vesicles (VesCat) that are spontaneously obtained by mixing the self-assembly surfactant TriCat 12 in water. The production of ClAlPc-loaded vesicles comprises an additional step (to remove the organic solvent) that was optimized, saving 55% of the production time. The final VesCat/ClAlPc kept their physical-chemical properties and round shape (confirmed by scanning electron microscopy), *drug loading* of 47% and high EE. Hence, the results have proved the great efficiency of these two nanometric systems applied in the PDT to the treatment of melanoma skin cancer and other cutaneous disease, useful features for further progress towards preclinical and clinical trials.

Keywords: solid lipid nanoparticles, catanionic vesicles, photodynamic therapy, aluminum phthalocyanine chloride, melanoma skin cancer.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática das diferentes camadas da epiderme (Ferreira, 2015).....	1
Figura 2. Vias de permeação de fármacos através da pele (adaptado de LIPPOLD, 1984). 2	
Figura 3. Imagens dos quatro principais tipos de melanomas cutâneos: (a) melanoma extensivo superficial, (b) melanoma nodular, (c) melanoma lentigo maligno e (d) melanoma lentiginoso acral (GANDHI e KAMPP, 2015; INGRAFFEA, 2013).	4
Figura 4. Representação do Diagrama de Jablonski representando alguns processos fotodinâmicos quando o fármaco fotossensibilizante (FS) absorve um fóton de luz (adaptado de DEBELE, PENG e TSAI, 2015). CI = conversão interna; CIS = conversão intersistema; FS ₀ = estado fundamental; ¹ FS ₁ * = estado singlete excitado; ¹ FS _n * = estado singlete superior; T ₁ = estado triplete excitado; R = substrato biológico; R* = substrato biológico oxidado; H ₂ O ₂ = peróxido de hidrogênio; O ₂ * = superóxido; HO* = radical hidroxila.	6
Figura 5. Representação esquemática da estrutura da ftalocianina de Cloro Alumínio (Sigma Aldrich, 2014).....	9
Figura 6. Representação esquemática da estrutura do tensoativo cataniônico tricatênario derivado de lactose (TriCat 12) (adaptado de SOUSSAN, E., 2007; SOUSSAN et al., 2008).....	17
Figura 7. Representação esquemática das estruturas de (a) mono, (b) di e (c) triglicerídeos do ácido behênico (ABURAHMA e BADR-ELDIN, 2014).....	19
Figura 8. Representação esquemática da estrutura do ácido esteárico (Sigma Aldrich, 2015)	19
Figura 9. Representação esquemática da estrutura do isoestearato de sorbitano (LANIGAN e YAMARIK, 2002).	20
Figura 10. Representação esquemática da estrutura do óleo de rícino hidrogenado etoxilado n = 40 (MARUNO, M., 2009).....	20
Figura 11. Fluxograma dos métodos utilizados para desenvolvimento e caracterização das nanopartículas lipídicas sólidas.	22
Figura 12. (a) Diagrama ternário, destacando em vermelho a região de interesse neste estudo, e (b) área de interesse ampliada, com os pontos avaliados.	24
Figura 13. Escala Equilíbrio Hidrofílico-Lipofílico (adaptado de Jadhav, 2004).	25
Figura 14. Representação esquemática dos princípios da tecnologia <i>STEP™</i> (<i>Space and Time Resolved Extinction Profiles</i>). (Adaptado de L.U.M.GmbH, 2010).....	34
Figura 15. Representação esquemática da célula de difusão vertical do tipo Franz (adaptado de KARPANEN et al., 2008 e Centralx Atlas, 2015).....	36
Figura 16. Fluxograma dos métodos utilizados para desenvolvimento e caracterização das vesículas cataniônicas.....	44
Figura 17. Representação esquemática do diagrama de fases utilizando como lipídio sólido (a) compritol ou (b) ácido esteárico, com as características macroscópicas das dispersões obtidas identificadas por símbolos, sendo: (▲) creme (✕) líquido translúcido azulado, (⊗) líquido opaco (◇) sólido perolizado e (○) separação de fases.....	52

Figura 18. Valores de pH das formulações de nanopartículas lipídicas sólidas (NLS), contendo ou não ftalocianina de cloro alumínio (CIAIPc) em diferentes concentrações teóricas, com análise estatística ANOVA unilateral, seguida do pós-teste de *Tukey* ($p < 0,05$). As concentrações teóricas de CIAIPc de A a G estão indicadas na **Tabela 1**. Média da triplicata $\pm$ desvio padrão..... 58

Figura 19. Fotomicrografias das formulações de (a e c) NLS vazia e (b e d) CIAIPc-C-NLS obtidas por microscopia eletrônica de transmissão, em 50kx de tamanho. Escala de 200 nm. 59

Figura 20. Fotomicrografias obtidas por microscopia de força atômica com imagens (a) topográfica e (b) tridimensional de nanopartículas lipídicas sólidas vazias e imagens (c) topográfica e (d) tridimensional de nanopartículas lipídicas sólidas com ftalocianina de cloro-alumínio..... 60

Figura 21. Difrátogramas obtidos por difração de raios-X das amostras: lipídio sólido compritol 100%, formulações de nanopartículas lipídicas sólidas vazias (NLS Vazia), com tempo de vida de 1 e 24 meses, e nanopartículas lipídicas sólidas com ftalocianina de cloro alumínio (CIAIPc-NLS), com tempo de vida de 1 e 24 meses..... 62

Figura 22. Termogramas, obtidos por DSC, do aquecimento das amostras: lipídio sólido compritol 100%, formulações de nanopartículas lipídicas sólidas vazias (NLS Vazia), com tempo de vida de 1 e 24 meses, e nanopartículas lipídicas sólidas com ftalocianina de cloro alumínio (CIAIPc-NLS), com tempo de vida de 1 e 24 meses..... 63

Figura 23. Espectros de absorção UV-visível das curvas de calibração da ftalocianina de cloro alumínio (CIAIPc) na mistura de solvente clorofórmio e etanol (1:1, em volume), com comprimento de onda máximo em 679 nm, e gráfico da curva padrão relacionando concentração de CIAIPc ($0,47\text{-}2,34 \text{ ug mL}^{-1}$) versus absorvância; $y = 0,424x + 0,0206$; $r = 0,999$ 66

Figura 24. Espectros de emissão de fluorescência da ftalocianina de cloro alumínio (CIAIPc) utilizando como solvente o metanol puro (comprimento de onda de emissão máximo em 675 nm)..... 67

Figura 25. Gráficos das curvas-padrão de calibração, relacionando concentração de ftalocianina de cloro alumínio (CIAIPc) versus emissão de fluorescência, das linearidades construídas para o ativo em (a) metanol puro ($y = 1E+08 x + 2808,3$, $r = 0,999$) e em (b) PBS–etanol (4:1, em volume) ($y = 1003933x + 23268$, $r = 0,997$). 68

Figura 26. Gráficos com valores médios do tamanho (*z-average*, em barras), do índice de polidispersão (em linhas) e do potencial zeta (gráfico em linhas inserido) das formulações de (a) nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) vazias e nano

partículas contendo ftalocianina de cloro alumínio (CIAIPc) em diferentes concentrações: (b) CIAIPc-A-NLS, (c) CIAIPc-B-NLS e (d) CIAIPc-C-NLS, para estudo de estabilidade no período de 0 a 24 meses, com análise estatística ANOVA unilateral, seguida do pós-teste de *Tukey* ($p < 0,05$). Média da triplicata $\pm$ desvio padrão. 72

Figura 27. Gráficos com valores médios do tamanho (*z-average*, em barras), do índice de polidispersão (em linhas) e do potencial zeta (gráfico em linhas inserido) das formulações de nanopartículas contendo ftalocianina de cloro alumínio (CIAIPc) em diferentes concentrações: (a) CIAIPc-D-NLS, (b) CIAIPc-E-NLS, (c) CIAIPc-F-NLS, (d) CIAIPc-G-NLS para estudo de estabilidade no período de 0 a 24 meses, com análise estatística ANOVA unilateral, seguida do pós-teste de *Tukey* ($p < 0,05$). Média da triplicata $\pm$ desvio padrão. 73

Figura 28. Gráfico da transmissão normalizada de NIR versus posição da cubeta, representando o perfil de transmitância da formulação de nanopartículas lipídicas sólidas vazias na análise de estabilidade por centrifugação com o *LUMiSizer*, com inserto do desenho

esquemático da posição da cubeta. Os perfis iniciais estão em vermelho e a coloração verde sinaliza perfis registrados próximo ao fim do experimento. 74

Figura 29. Gráfico da transmissão normalizada de NIR versus posição da cubeta, representando o perfil de transmitância da formulação de nanopartículas lipídicas sólidas com ftalocianina de cloro alumínio CIAIPc-C-NLS, na análise de estabilidade por centrifugação com o *LUMiSizer*. Os perfis iniciais estão em vermelho e a coloração verde sinaliza perfis registrados próximo ao fim do experimento. 75

Figura 30. Gráfico da integral da transmitância das formulações de NLS com diferentes concentrações de ftalocianina de cloro alumínio (CIAIPc), no estudo de estabilidade por centrifugação, com uso do *LUMiSizer*. ( ) NLS vazia, ( ) CIAIPc-A-NLS, ( ) CIAIPc-B-NLS, ( ) CIAIPc-C-NLS, ( ) CIAIPc-D-NLS, ( ) CIAIPc-E-NLS, ( ) CIAIPc-F-NLS, ( ) CIAIPc-G-NLS. 76

Figura 31. Gráficos com valores médios do tamanho (*z-average*, em barras), do índice de polidispersão (em linhas) da formulação de nanopartículas contendo ftalocianina de cloro alumínio (CIAIPc-A-NLS) para avaliação da estabilidade à 32 °C, com análise estatística ANOVA unilateral, seguida do pós-teste de *Tukey* ($p < 0,05$). Média da triplicata $\pm$ desvio padrão. 77

Figura 32. Gráfico do ensaio de biocompatibilidade *in vitro* pelo método colorimétrico MTT, com células NIH-3T3. O ( ) controle negativo, tratado apenas com meio de cultura, foi parâmetro de comparação para ( ) nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) vazias em diferentes concentrações no meio de cultura. Resultados analisados com ANOVA unilateral, seguida do pós-teste de *Dunnnett* ($p < 0,05$). Média da triplicata $\pm$ desvio padrão. 80

Figura 33. Gráfico do ensaio de toxicidade *in vitro* na ausência de luz, pelo método colorimétrico MTT, com células B16-F10. Sendo CN = controle negativo (tratado apenas com meio de cultura), utilizado como parâmetro de comparação, CP = controle positivo (tratado com nanopartículas lipídicas vazias em meio de cultura), CIAIPc-C-NLS e CIAIPc-G-NLS são formulações de nanopartículas lipídicas contendo ftalocianina de cloro alumínio nas concentrações finais de 0,31 e 0,75 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de CIAIPc, respectivamente. Resultados analisados com ANOVA unilateral, seguida do pós-teste de *Tukey* ($p < 0,05$). Média da triplicata $\pm$ desvio padrão. 81

Figura 34. Gráfico do ensaio de toxicidade *in vitro* na ausência de luz, pelo método colorimétrico MTT, com células B16-F10. Sendo CN = controle negativo (tratado apenas com meio de cultura), utilizado como parâmetro de comparação, CP = controle positivo (tratado com nanopartículas lipídicas vazias em meio de cultura), CEt = controle do solvente etanol em meio de cultura, CIAIPc-Et = ativo livre em etanol diluído em meio de cultura na concentração final de 0,75 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de CIAIPc, CIAIPc-G-NLS = nanopartículas lipídicas contendo ftalocianina de cloro alumínio na concentração final de 0,75 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de CIAIPc. Resultados analisados com ANOVA unilateral, seguida do pós-teste de *Tukey* ($p < 0,05$). Média da triplicata $\pm$ desvio padrão. 83

Figura 35. Gráficos do ensaio de fototoxicidade *in vitro*, pelo método colorimétrico MTT, com células B16-F10 tratadas com ftalocianina de cloro alumínio (a) livre em etanol (CIAIPc-Et) e (b) encapsulada nas nanopartículas lipídicas sólidas (CIAIPc-NLS), ambas na concentração de 0,75 $\mu\text{g mL}^{-1}$. CN = controle negativo, CL = controle do laser e D1, D2 e D3 = diferentes doses de luz aplicadas. Resultados analisados com ANOVA unilateral, seguida do pós-teste de *Tukey* ($p < 0,05$). Média da triplicata $\pm$ desvio padrão. (*) $p < 0,05$ com relação ao CN, (\$) $p < 0,01$ com relação ao CN e CL, (#) $p < 0,001$ com relação ao CN e CL, (@) $p < 0,01$ com relação D1 e (&) $p < 0,001$ com relação D1. 84

Figura 36. Gráficos com valores médios do tamanho (*z-average*, em barras), do índice de polidispersão (em linhas) das vesículas cataniônicas (VesCat) vazias para estudo de estabilidade no período de 15 dias, com análise de variância ANOVA unilateral, seguida do pós-teste de *Tukey* ($p < 0,05$). Média da triplicata $\pm$ desvio padrão. 87

Figura 37. Gráficos com valores médios do tamanho (*z-average*, em barras), do índice de polidispersão (em linhas) para estudo de estabilidade no período de 5 dias das vesículas cataniônicas contendo ftalocianina de cloro alumínio (VesCat/ClAlPc) produzidas com remoção da acetona por evaporação à pressão reduzida durante 30 min, à 50 mBar e 40 °C. Resultados com análise de variância ANOVA unilateral, seguida do pós-teste de *Tukey* ($p < 0,05$). Média da triplicata $\pm$ desvio padrão. 88

Figura 38. Gráficos com valores médios do tamanho (*z-average*, em barras), do índice de polidispersão (em linhas) para estudo de estabilidade no período de 5 dias das vesículas cataniônicas contendo ftalocianina de cloro alumínio produzidas com remoção da acetona por evaporação à pressão reduzida durante 5 min, com pressão de 100 mBar e à 40 °C. Resultados analisados com ANOVA unilateral, seguida do pós-teste de *Tukey* ($p < 0,05$). Média da triplicata $\pm$ desvio padrão. 89

Figura 39. Fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura, utilizando a técnica de crio-fratura, das formulações de (**a e b**) vesículas cataniônicas carregadas com ftalocianina de cloro alumínio contendo 5% (m/m) de glicerol, (**c e d**) vesículas cataniônicas com ftalocianina de cloro alumínio sem o crioprotetor e (**e e f**) vesículas cataniônicas vazias sem crioprotetor. 92

Figura 40. Espectros de emissão de fluorescência da ftalocianina de cloro alumínio obtidos na mistura de solventes PBS e etanol, na proporção de 1:1 (em volume), com comprimento de onda de emissão máximo em 679 nm. A equação da reta obtida foi $y = 14401009 x + 9773$, com coeficiente de correlação linear $r = 0,999$ 94

Figura 41. Gráficos das curvas-padrão de calibração, relacionando a concentração de ftalocianina de cloro alumínio (ClAlPc) versus emissão de fluorescência, das linearidades construídas em (a) mistura de solventes PBS e etanol (1:1, em volume), (b) metanol puro e (c) mistura de solventes metanol e água (9:1, em volume). 95

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Nome das formulações de nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) contendo ftalocianina de cloro alumínio (ClAlPc) e concentração teórica correspondente do ativo. 23
- Tabela 2.** Porcentagem, em massa (gramas)*, de cada componente da formulação correspondente aos pontos escolhidos no diagrama de fases ternário para estudo das formulações. 24
- Tabela 3.** Parâmetros utilizados na construção das curvas de calibração para os métodos analíticos desenvolvidos no Brasil para quantificação de ftalocianina de cloro alumínio. 30
- Tabela 4.** Esquema de tratamento dos grupos experimentais definidos para o estudo de toxicidade sobre linhagem de melanoma B16-F10, na ausência de luz, utilizando duas diferentes concentrações de ftalocianina de cloro alumínio (ClAlPc) encapsulada nas nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) e em sua forma livre, além dos controles negativo, positivo e do solvente etanol. 41
- Tabela 5.** Esquema de tratamento dos grupos experimentais definidos para o estudo de fototoxicidade sobre linhagem de melanoma B16-F10 utilizando ftalocianina de cloro alumínio (ClAlPc) encapsulada nas nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) e em sua forma livre, além dos controles negativo, positivo e do laser. 42
- Tabela 6.** Parâmetros utilizados na construção das curvas de calibração para os métodos analíticos desenvolvidos para quantificação de ftalocianina de cloro alumínio por espectroscopia de emissão de fluorescência no trabalho com vesículas cataniônicas. 48
- Tabela 7.** Valores médios do diâmetro (*z-average*), índice de polidispersão e potencial zeta das formulações líquidas obtidas a partir dos diagramas de fases, com análise estatística ANOVA unilateral, seguida do pós-teste de *Tukey* ($p < 0,05$). Média da triplicata $\pm$ desvio padrão. 54
- Tabela 8.** Valores médios do diâmetro médio (*z-average*), índice de polidispersão e potencial zeta das formulações de nanopartículas lipídicas sólidas com diferentes concentrações da ftalocianina de cloro alumínio (ClAlPc), com análise estatística ANOVA unilateral, seguida do pós-teste de *Tukey* ($p < 0,05$). Média da triplicata $\pm$ desvio padrão. 57
- Tabela 9.** Parâmetros extraídos dos termogramas de DSC com grau de cristalinidade (GG) do lipídio sólido puro e nas formulações de nanopartículas lipídicas sólidas vazias (NLS Vazia), com tempo de vida de 1 e 24 meses, e nanopartículas lipídicas sólidas com ftalocianina de cloro alumínio (ClAlPc-NLS), com tempo de vida de 1 e 24 meses. 64
- Tabela 10.** Resultados das análises de variância (ANOVA) unilateral para o modelo linear dos mínimos quadrados e para o teste da falta de ajuste (*Lack of Fit*), com nível de significância $p < 0,05$ dos 3 métodos analíticos desenvolvidos para o trabalho com nanopartículas lipídicas. 69
- Tabela 11.** Valores dos limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) determinados para os diferentes métodos analíticos desenvolvidos no trabalho com nanopartículas lipídicas sólidas. 70
- Tabela 12.** Valores médios do *drug loading* para as formulações de nanopartículas lipídicas sólidas em diferentes concentrações da ftalocianina de cloro alumínio (ClAlPc) com tempo de vida de 1 e 24 meses. 70
- Tabela 13.** Valores médios de ftalocianina de cloro alumínio (ClAlPc) retida nas diferentes camadas da pele avaliadas após 6,5 h da aplicação de nanopartículas lipídicas sólidas com

ftalocianina de cloro alumínio (ClAlPc-A-NLS) nos estudos *in vitro* com células de Franz. Média da quintuplicata $\pm$ desvio padrão..... 78

Tabela 14. Valores médios do diâmetro médio (*z-average*), índice de polidispersão e do potencial zeta das formulações de vesículas cataniônicas (VesCat), carregadas ou não com ftalocianina de cloro alumínio (ClAlPc), após aprimoramento do processo de obtenção das mesmas. Média da triplicata $\pm$ desvio padrão..... 89

Tabela 15. Valores médios do diâmetro médio (*z-average*) e índice de polidispersão das formulações de vesículas cataniônicas com ftalocianina de cloro alumínio (VesCat/ClAlPc) contendo diferentes concentrações de glicerol. Resultados analisados com ANOVA bilateral, seguida do pós-teste de *Bonferroni* ($p < 0,05$). Média da triplicata $\pm$ desvio padrão..... 91

Tabela 16. Resultados das análises de variância (ANOVA) unilateral para o modelo linear dos mínimos quadrados e para o teste da falta de ajuste (*Lack of Fit*), com nível de significância $p < 0,05$ dos 3 métodos analíticos desenvolvidos para o trabalho com vesículas cataniônicas. 96

Tabela 17. Valores dos limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) determinados para os métodos analíticos desenvolvidos para o trabalho com vesículas cataniônicas..... 97

Tabela 18. Valores médios do diâmetro (*z-average*) e índice de polidispersão das formulações de vesículas cataniônicas com ftalocianina de cloro alumínio (VesCat/ClAlPc) armazenadas à 4, 25 e 32 °C, durante 48 h. Resultados analisados com ANOVA bilateral, seguida do pós-teste de *Bonferroni* ($p < 0,05$). Média da triplicata $\pm$ desvio padrão..... 98

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFM	<i>Atomic Force Microscopy</i> / Microscopia de força atômica
ANOVA	<i>Analysis of variance</i> / Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC®	<i>American Type Culture Collection</i>
B16-F10	Linhagem de células melanocíticas pigmentadas
CIAIPc	Ftalocianina de cloro alumínio
CIAIPc-NLS	Nanopartículas lipídicas sólidas contendo ftalocianina de cloro alumínio
Co	Comprimido
DMEM	<i>Dulbecco Eagle's minimum essential medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> / Ácido desoxirribonucleico
DSC	<i>Differential Scanning Calorimetry</i> / Calorimetria diferencial exploratória
EC	Estrato córneo
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
EE	Eficiência de encapsulação
EHL	Equilíbrio Hidrofílico-Lipofílico
EPR	<i>Enhanced Permeability Retention</i>
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FS	Fármaco fotossensibilizante
GR	Grau de cristalinidade
GRAS	<i>Generally Recognized As Safe</i>
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HO*	Radical hidroxila
IMRCP	<i>Laboratoire des Interactions Moléculaires et Réactivité Chimique et Photochimique</i>
INCA	Instituto Nacional do Câncer
INCI	<i>International Nomenclature of Cosmetic Ingredient</i>
ISO	<i>International Organization for Standardization</i>
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
m/m	Massa/massa
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MTT	3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolio
NIH-3T3	Linhagem de células de fibroblastos
NIR	<i>Near infrared</i> / Infravermelho próximo
NLS	Nanopartículas lipídicas sólidas
NLS vazias	Nanopartículas lipídicas sólidas vazias
OE	Óxido de etileno
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i> / Tampão fosfato salino
PCS	<i>Photon Correlation Spectroscopy</i> / Espectroscopia de correlação de fótons
PdI	<i>Polydispersity Index</i> / Índice de polidispersão
RCF	<i>Relative Centrifugal Force</i> / Força centrífuga relativa

RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SA	<i>Stearic Acid</i> / Ácido esteárico
SFB	Soro Fetal Bovino
STEP™	<i>Space and Time Resolved Extinction Profiles</i>
TCa	Tensoativo cataniônico bicatenário
TFD	Terapia fotodinâmica
TriCat	Tensoativo cataniônico tricatenário
UV	Ultravioleta
UV-Vis	Ultravioleta visível
v/v	Volume/volume
VesCat	Vesículas cataniônicas
VesCat/ClAlPc	Vesículas cataniônicas contendo ftalocianina de cloro alumínio

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	ix
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 PELE	1
1.2 O CENÁRIO GERAL DO CÂNCER DE PELE E O MELANOMA	2
1.3 TERAPIA FOTODINÂMICA (TFD)	5
1.4 FÁRMACOS FOTOSSENSIBILIZANTES (FS)	7
1.4.1 Ftalocianinas	9
1.5 NANOTECNOLOGIA E A TERAPIA FOTODINÂMICA	11
1.5.1 Nanopartículas lipídicas sólidas	12
1.5.2 Vesículas cataniônicas (VesCat)	15
2. OBJETIVOS	18
2.1 OBJETIVO GERAL	18
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
3. MATERIAIS E MÉTODOS	19
3.1 MATERIAIS	19
3.2 MÉTODOS UTILIZADOS PARA NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS	22
3.2.1 Preparo das NLS, contendo ou não CIAIPc, por emulsificação direta.	22
3.2.2 Estudo de formulação com base no diagrama ternário	23
3.2.3 Caracterização físico-química das formulações obtidas	26
3.2.4 Avaliação morfológica das formulações de NLS	27
3.2.5 Análise das NLS por difratometria de raios-X	28
3.2.6 Análise das NLS por calorimetria exploratória diferencial	28
3.2.7 Desenvolvimento de métodos analíticos espectrofotométricos e espectrofluorimétricos para quantificação de CIAIPc	29
3.2.8 Doseamento de ftalocianina de cloro alumínio associada às NLS	31
3.2.9 Estudos de estabilidade das formulações de NLS	33
3.2.10 Estudo da permeação e retenção cutânea <i>in vitro</i> de CIAIPc encapsuladas em NLS	35
3.2.11 Ensaios biológicos <i>in vitro</i>	37
3.3 MÉTODOS UTILIZADOS PARA VESÍCULAS CATANIÔNICAS	44
3.3.1 Preparo das formulações vesículas cataniônicas	44

3.3.2	Efeito da adição de glicerol nas formulações de VesCat.	45
3.3.3	Avaliação morfológica das vesículas cataniônicas.	46
3.3.4	Desenvolvimento de métodos analíticos espectrofluorimétricos para quantificação de CIAIPc46	
3.3.5	Doseamento de CIAIPc associado às VesCat.....	48
3.3.6	Avaliação da estabilidade das VesCat/CIAIPc acondicionadas à 32 °C.....	49
3.3.7	Estudo da permeação e retenção cutânea <i>in vitro</i> de CIAIPc veiculada nas VesCat.	49
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
4.1	PARA AS NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS.	51
4.1.1	Estudo de formulação com base no de diagrama de fases.....	51
4.1.2	Caracterização físico-química das NLS.	56
4.1.3	Análise morfológica das NLS.	58
4.1.4	Análise das NLS por difração de raios-X	61
4.1.5	Análise das NLS por calorimetria exploratória diferencial	63
4.1.6	Desenvolvimento de métodos analíticos espectrofotométricos e espectrofluorimétricos para quantificação de CIAIPc.....	65
4.1.7	Doseamento da ftalocianina de cloro alumínio associada às NLS.	70
4.1.8	Avaliação da estabilidade das NLS	72
4.1.9	Estudos <i>in vitro</i> da permeação e retenção cutânea de CIAIPc encapsuladas nas NLS.	77
4.1.10	Ensaio biológicos <i>in vitro</i>	79
4.2	PARA AS VESÍCULAS CATANIÔNICAS.....	86
4.2.1	Preparo, aprimoramento e caracterização das vesículas cataniônicas.	86
4.2.2	Efeito da adição do glicerol nas propriedades das vesículas cataniônicas.....	90
4.2.3	Análise morfológica das vesículas cataniônicas.	91
4.2.4	Desenvolvimento de métodos analíticos espectrofluorimétricos para quantificação de CIAIPc 93	
4.2.5	Doseamento de CIAIPc associado às vesículas cataniônicas.	97
4.2.6	Estabilidade das VesCat/CIAIPc acondicionadas à 32 °C.....	98
4.2.7	Estudos de permeação e retenção cutânea <i>in vitro</i> de CIAIPc veiculada nas Vescat.....	99
5.	CONCLUSÃO	101
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	104
7.	ANEXO(S)	120

1. INTRODUÇÃO

1.1 PELE

A principal função da pele é servir de barreira de defesa entre o meio fisiológico interno e o ambiente externo, intrinsecamente associada à sua camada mais superficial: a epiderme. Representando aproximadamente 16% do total do peso corporal e considerada o maior órgão do mundo, a pele é constituída essencialmente por três camadas histológicas superpostas: epiderme, derme e hipoderme (GORDON, 2013).

A epiderme é formada de quatro camadas compostas por células em diferentes fases de maturação do queratinócito (**Figura 1**). O estrato basal (germinativo) é a camada mais profunda, onde são originados os queratinócitos, que começam o processo de diferenciação, dando origem às camadas espinhosa e granulosa. Essas três camadas constituem a epiderme viável. É no estrato córneo, camada mais externa da pele, que ocorre o passo final de diferenciação celular dos queratinócitos em corneócitos, com perda do núcleo e DNA, circundados por uma densa porção proteica (envelope celular) e regiões lipídicas, composição esta primordial na função de defesa (barreira) da pele humana (FEINGOLD e ELIAS, 2014; GORDON, 2013). Os melanócitos encontram-se na camada germinativa e são responsáveis pela produção da melanina, pigmento responsável pela absorção da radiação UV e protege a pele contra danos da luz solar. O processo de produção da melanina em grânulos, chamados melanossomos, ocorre continuamente, conforme renovação da epiderme e exposição à luz UV (WICKETT e VISSCHER, 2006; SLOMINSKI et al., 2004).

Figura 1. Representação esquemática das diferentes camadas da epiderme (Ferreira, 2015)

A derme localiza-se entre a epiderme e a hipoderme e é responsável pelo aporte de nutrientes para epiderme. É nessa camada da pele que se encontram fibroblastos (produção de colágeno e elastina), células do sistema imune, como leucócitos e macrófagos, e outras células especializadas (folículos pilosos, glândulas sebáceas, apócrinas e sudoríparas) e, principalmente, vasos sanguíneos capilares e nervos, responsáveis pelas sensações de toque, dor e temperatura (GORDON, 2013).

A camada mais profunda é a hipoderme, onde estão o tecido conjuntivo, vasos de maior calibre, nervos e o armazenamento de gordura, fundamental para regular a temperatura corporal e da pele, além de absorver choques mecânicos (GORDON, 2013).

As moléculas do meio externo podem permear a pele por 3 principais vias: (i) intracelular, através dos corneócitos, favorecido por estruturas lipofílicas, (ii) intercelular, no qual as moléculas se movimentam no meio aquoso entre as células e lipídios ou (iii) através dos anexos da pele, como glândulas sebáceas e folículos pilosos, como ilustrado na **Figura 2** (KAKADIA e CONWAY, 2014).

Figura 2. Vias de permeação de fármacos através da pele (adaptado de LIPPOLD, 1984).

1.2 O CENÁRIO GERAL DO CÂNCER DE PELE E O MELANOMA

O câncer de pele é uma neoplasia com aumento crescente em todo o mundo, para ambos os sexos, com milhões de novos casos diagnosticados a cada ano, representando um impacto profundo na saúde pública mundial (GANDHI e KAMPP, 2015; GORDON, 2013).

Várias são as causas que predisõem o surgimento do câncer de pele incluindo fatores endógenos (fenótipo, cor de pele e olhos, densidade de nevos cutâneos, fatores hereditários) e exógenos (exposição crônica à radiação solar e a metais pesados, inflamações e traumas crônicos, grau de proteção solar). Ainda assim, a principal causa do câncer cutâneo está

associada com a exposição crônica à radiação UV, que pode causar danos no DNA, mutações gênicas e estresse oxidativo, fatores que desempenham papel fundamental no envelhecimento da pele e geração do câncer (GORDON, 2013; INCA, 2014; LAZARETH, 2013).

As neoplasias cutâneas podem ser divididas em dois tipos: melanoma e não melanoma. O câncer de pele do tipo não melanoma acomete principalmente dois tipos de células epiteliais: os carcinomas nos queratinócitos basais correspondem a 80% dos casos de câncer de pele e 16% são em células escamosas (DAVIDS e KLEEMANN, 2011; GANDHI e KAMPP, 2015; GORDON, 2013). O Instituto Nacional de Câncer (INCA) estima que, para 2015, o câncer de pele do tipo não melanoma continue sendo o mais incidente na população brasileira, contabilizando, pelo menos, 31,0% dos novos casos de todos os tumores malignos registrados (INCA, 2014). Para os casos dos tumores detectados nos estágios iniciais, as formas de tratamento utilizadas são aplicação tópica de 5-fluorouracil e o Imiquimod, crioterapia, curetagem e eletrodessecção (LAZARETH, 2013). Alguns subtipos deste carcinoma podem ser agressivos e destrutivos, com elevada reincidência após o tratamento, mas, apesar de ser o tipo de neoplasia com maior incidência, o câncer de pele não melanoma possui baixo índice de mortalidade e baixo potencial de metástase. A maior parte dos casos diagnosticados precocemente e tratados de forma adequada apresentam bom prognóstico com alta taxa de cura (KOLK et al., 2014; LAZARETH, 2013; SIMÕES, SOUSA e PAIS, 2015).

O melanoma de pele é originado nos melanócitos e, apesar de menos frequente (4%) que o câncer de pele não melanoma, é altamente metastático e responsável por 85% da letalidade dos tumores malignos de pele. Somente 2-8% dos casos de melanomas são registrados como não pigmentado (amelanomas) (GORDON, 2013; KOLK et al., 2014). Este tipo de neoplasia configura o total de 1% dos casos de câncer estimados no Brasil, em 2015 (INCA, 2014), porém, devido ao aumento crescente de sua incidência aliado à elevada taxa de mortalidade, o tratamento do melanoma maligno tem atraído bastante atenção de médicos e pesquisadores.

O estabelecimento do melanoma cutâneo é um processo que envolve várias fases. O modelo de Clark (CLARK et al., 1969) para a progressão do melanoma, segundo suas características clínicas e histopatológicas, propõe o estabelecimento de cinco estágios principais: (1) nevo comum congênito ou adquirido: melanócitos estruturalmente normais; (2) nevo displásico: melanócitos com atipia estrutural e arquitetural; (3) melanoma primário em fase de progressão radial: confinado à epiderme, crescendo lateralmente; (4) melanoma primário em fase de crescimento vertical: início da invasão da derme e aquisição de competência para a metástase e

(5) melanoma metastático, preferencialmente em linfonodos, fígado, pulmão e cérebro (VERA et al., 2015; VILLANUEVA e HERLYN, 2008).

Com base nas características clínicas e histopatológicas, o melanoma maligno pode ser dividido em quatro tipos principais (**Figura 3**): (i) melanoma extensivo superficial (57,4%) com bordas irregulares, pigmentação variada e crescimento lento para as regiões laterais antes de promover invasões verticais; (ii) nodular (21,4%), tipo mais agressivo que aparece em qualquer região do corpo submetida à altos níveis de exposição solar; (iii) melanoma lentigo maligno (8,8%), tumor invasivo nas regiões do corpo com exposição crônica ao sol, como cabeça, pescoço e antebraços; e (iv) melanoma lentiginoso acral (4%), com crescimento lento e presente especificamente nas palmas das mãos, plantas dos pés e acima do nariz (INGRAFFEA, 2013; KOLK et al., 2014; RIGON et al., 2015)

Figura 3. Imagens dos quatro principais tipos de melanomas cutâneos: (a) melanoma extensivo superficial, (b) melanoma nodular, (c) melanoma lentigo maligno e (d) melanoma lentiginoso acral (GANDHI e KAMPP, 2015; INGRAFFEA, 2013).

Quando o melanoma é diagnosticado precocemente, o único tratamento curativo existente é a remoção cirúrgica do tumor. No entanto, por se localizar em região com alta irrigação sanguínea, as células do melanoma maligno se espalham rapidamente para outros sítios, resultando em metástase. O uso de fármacos quimioterápicos, radioterapia ou da imunoterapia

apresentavam respostas clínicas parciais e não duradouras e, além disso, essa malignidade apresenta resistência aos esquemas quimioterápicos e radioterápicos tradicionais. Assim, tratamentos alternativos para o melanoma maligno têm sido profundamente estudados para aumentar a chance de sobrevivência do paciente e cura da doença (AVCI et al., 2014; GIROTTI et al., 2014; KAWCZYK-KRUPKA et al., 2013; VERA et al., 2015).

Neste cenário, a terapia fotodinâmica surge como uma promissora forma de tratamento para diversas patologias dermatológicas, sobretudo as neoplasias cutâneas (BALDEA e FILIP, 2012; DAVIDS e KLEEMANN, 2011; KAWCZYK-KRUPKA et al., 2013; KOLK et al., 2014; SPARSA et al., 2013).

1.3 TERAPIA FOTODINÂMICA (TFD)

A TFD é uma terapia seletiva e pouco invasiva, considerada atualmente como uma excelente opção de tratamento para diversas doenças cutâneas, como leishmaniose, psoríases, herpes, verrugas virais, acne e vitiligo e vários tipos de câncer, além do câncer de pele (AVCI et al., 2014; BABILAS et al., 2010; BÉDANE, 2013; DAVIDS e KLEEMANN, 2011). A TFD pode ser realizada em ambulatório, sem necessidade de anestesia ou internação, e a técnica pode ser aplicada várias vezes no paciente como terapia única ou em combinação com outras modalidades terapêuticas. Dor aguda e sensação de queimação restritas à etapa de irradiação da lesão e com duração de poucas horas já foram relatados como efeitos colaterais. Em contrapartida, sua aplicação garante ótimos resultados estéticos, com melhoria da aparência da pele na região tratada (AGOSTINIS et al., 2011; BABILAS et al., 2010).

A base da terapia fotodinâmica é a combinação de três componentes fundamentais: (i) administração do fármaco fotossensibilizante (FS) (ou seu precursor), seguida de um intervalo de tempo que permita a distribuição, localização e acúmulo do FS nos tumores; (ii) irradiação com comprimento de onda apropriado, e (iii) oxigênio molecular, presente nos tecidos e que gera espécies reativas de oxigênio como resultado da fotoativação do FS, produzindo os efeitos citotóxicos desejados (AVCI et al., 2014).

A ação fotodinâmica desta terapia está fundamentada em reações fotooxidativas ilustrada no Diagrama de Jablonski (**Figura 4**), nas quais um fármaco fotossensibilizante é irradiado por uma luz visível em determinado comprimento de onda e, ao absorver um fóton de luz, a partir do seu estado fundamental (S_0) é excitado para o estado singlete superior (S_n). O estado singlete excitado do FS é bastante instável, com curto tempo de vida, e pode voltar ao seu estado

fundamental por dois processos: emitir um fóton na forma de energia luminosa (fluorescência) ou através da conversão interna com perda de calor. O estado singlete excitado (S_1) pode também se converter ao estado triplete (T_1) via cruzamento intersistemas, envolvendo a alteração na orientação do spin de um elétron. O FS no estado triplete pode retornar para o seu estado fundamental, ao emitir luz fosforescente ou calor, ou causar a morte das células-alvo através de mecanismos classificados em Tipo I e Tipo II. Comparado ao estado singlete do FS, o estado triplete é uma forma mais estável, com menor energia e maior tempo de vida, favorecendo a transferência de energia desse estado de excitação do FS para outras moléculas (**Figura 4**) (AGOSTINIS et al., 2011; FICHEUX, 2009).

Figura 4. Representação do Diagrama de Jablonski representando alguns processos fotodinâmicos quando o fármaco fotossensibilizante (FS) absorve um fóton de luz (adaptado de DEBELE, PENG e TSAI, 2015). CI = conversão interna; CIS = conversão intersistema; FS_0 = estado fundamental; $1FS_1^*$ = estado singlete excitado; $1FS_n^*$ = estado singlete superior; T_1 = estado triplete excitado; R = substrato biológico; R^* = substrato biológico oxidado; H_2O_2 = peróxido de hidrogênio; O_2^* = superóxido; HO^* = radical hidroxila.

Reações do Tipo I ocorrem quando o estado eletrônico excitado triplete do FS reage com um substrato biológico ou molécula orgânica (R) do meio celular e, por meio da abstração de um átomo de hidrogênio ou reações de transferência de elétrons, resultam na produção de radicais livres e íons-radicais (R^*). Estes radicais são altamente reativos e reagem com o oxigênio molecular, denominado de triplete (3O_2), gerando os ânions superóxidos (O_2^*), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) ou radicais hidroxilas (HO^*), ou podem, ainda, causar danos irreparáveis diretamente ao tecido tumoral. Já o mecanismo do Tipo II resulta da transferência de energia

entre o estado triplete excitados do fármaco fotossensibilizante e o oxigênio molecular ($^3\text{O}_2$) gerando o primeiro estado excitado do oxigênio, conhecido como oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$). Esta molécula reativa causa danos em vários alvos biológicos (membrana celular ou lisossomal, mitocôndrias, proteínas, ácidos nucleicos) o que resulta em excelente efeito citotóxico (AGOSTINIS et al., 2011; DABROWSKI e ARNAUT, 2015; FICHEUX, 2009).

O tipo de morte celular que ocorre após a aplicação de TFD é determinado por alguns fatores, como: tipo de célula, tipo de fármaco fotossensibilizante, a localização intracelular do FS e a dose de luz aplicada na terapia. Portanto, a fotoativação do FS é capaz de promover a destruição irreversível dos tecidos tumorais através de três principais formas (CASTANO, DEMIDOVA e HAMBLIN, 2005; DABROWSKI e ARNAUT, 2015; FICHEUX, 2009; PLAETZER et al., 2008):

- Produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) causando diretamente a morte das células tumorais por apoptose e/ou necrose;
- Efeito antivascular que pode causar trombose e hemorragia dos vasos tumorais levando a morte das células neoplásicas por privação de oxigênio e nutrientes;
- Ativação da resposta imune contra as células tumorais através do processo de inflamação aguda e liberação de citocinas no tumor, resultando assim, num influxo de macrófagos e leucócitos que podem contribuir para a destruição tumoral, bem como, estimular o sistema imune a reconhecer e eliminar as células neoplásicas.

É importante destacar que oxigênio singlete e as EROs são espécies altamente reativas e com curto tempo de meia-vida, portanto, somente substratos e moléculas muito próximas aos locais de formação dessas espécies reativas sofrem o efeito direto da terapia fotodinâmica (JUARRANZ et al., 2008; PLAETZER et al., 2008).

1.4 FÁRMACOS FOTOSSENSIBILIZANTES (FS)

Apesar de ainda não existir um fármaco fotossensibilizante ideal, aplicável a todos os tipos de neoplasias, as propriedades essenciais para um bom FS são: (i) ser quimicamente puro e facilmente sintetizado em grande escala; (ii) ter baixa toxicidade no escuro e *clearance* rápido; (iii) ter alta seletividade pelos tecidos neoplásicos, acumulando-se preferencialmente nos tumores e não em tecidos saudáveis; (iv) causar a menor quantidade possível de reações adversas; (v) ausência de mutagenicidade ou propriedades carcinogênicas; (vi) ter maior absorção de luz na região de 600 a 800 nm, onde a luz penetra mais profundamente nos tecidos;

(vii) ser estável e fácil de se dissolver nos fluidos corporais ou em sistemas biocompatíveis (AGOSTINIS et al., 2011).

A hematoporfirina e seus derivados foram os primeiros fotossensibilizadores utilizados na TFD na década de 70 e são considerados FS de primeira geração. Apesar de apresentarem uma longa história clínica de uso, possuem baixa seletividade ao tecido neoplásico, fraca absorção de luz na região do vermelho e baixa taxa de eliminação do organismo, o que causa um efeito fotossensibilizante cutâneo prolongado (algumas semanas). Por serem moléculas de tamanho elevado, que não penetram através da pele, a aplicação tópica das mesmas torna-se inviável (CASTANO, DEMIDOVA e HAMBLIN, 2004; SCHWEITZER, 2001).

Em 1988, NELSON, MCCULLOUGH e BERNIS avaliaram a ação da TFD com o Photofrin II®, primeiro FS derivado da hematoporfirina e aprovado pelo *Food and Drug Administration* (FDA), no tratamento de melanoma pigmentado e não pigmentado em ratos. Este estudo demonstrou ótimos resultados fototóxicos nos tumores não pigmentados, diferente da resposta do melanoma pigmentado. Os autores concluíram que a resistência do melanoma melanocítico à terapia fotodinâmica era devido à competição pela absorção de fótons entre o pigmento melanina e o Photofrin II. A influência deste pigmento prejudicando o efeito fototóxico de outros tipos de FS foi relatada por DAVIDS e KLEEMANN (2011); HADJUR et al. (1996); MROZ et al. (2010) devido à ação antioxidante da melanina que neutralizou as espécies reativas de oxigênio geradas pelo FS. Em 2012, SHARMA e DAVIDS demonstraram que a redução da quantidade do pigmento na neoplasia cutânea resultou em aumento do fotodano nas células cancerígenas. Com o intuito de contornar os problemas encontrados e com o aumento do uso da TFD, a procura pelo FS ideal tem se intensificado.

Fotossensibilizantes de segunda geração, como ftalocianinas, benzoporfirinas (Visudynes™), clorinas (Foscan™), bacterioclorinas e naftalocianinas foram desenvolvidos para suprir as deficiências dos FS de primeira geração (ALLISON e SIBATA, 2010).

As ftalocianinas são os fotossensibilizantes de interesse neste estudo devido ao seu elevado coeficiente de absorvidade molar na faixa espectral conhecida como “Janela fototerapêutica” que aumentam as chances de tratamento de lesões cutâneas localizadas nas porções mais profundas da pele (DABROWSKI e ARNAUT, 2015; LONGO et al., 2009; NUNES, SGUILLA e TEDESCO, 2004; SHARMA e DAVIDS, 2012). Apesar dos mecanismos da interação da luz com a pele ainda não serem totalmente elucidados, sabe-se que na “Janela Fototerapêutica” (região do vermelho do espectro visível e no infravermelho, 600-800 nm), a luz penetra mais profundamente nos tecidos, com menor interferência de cromóforos endógenos

presentes no nosso organismo (hemoglobina e melanina), com energia adequada para geração de radicais livres de oxigênio (CASTANO, DEMIDOVA e HAMBLIN, 2004; DEBELE, PENG e TSAI, 2015; FICHEUX, 2009; LUCKY, SOO e ZHANG, 2015; PLAETZER et al., 2008).

1.4.1 Ftalocianinas

As ftalocianinas são corantes sintéticos, quimicamente puros e consideradas FS de segunda geração. Em seu macrociclo central apresentam uma estrutura cíclica composta por quatro unidades de benzopirrol, unidas por átomos de oxigênio. A presença do íon metálico diamagnético na estrutura das ftalocianinas determina suas propriedades fotofísicas. Quando complexadas com zinco ou alumínio, como no caso da ftalocianina de cloro alumínio (ClAlPc) (**Figura 5**), apresentam maior fotoestabilidade e excelente atividade fotoquímica e fotodinâmica: formam complexos com alto rendimento quântico de estados singlete excitado e estado triplete com tempo de vida longo, possibilitando maior interação com o substrato celular (ALLISON e SIBATA, 2010; IDOWU e NYOKONG, 2007; NUNES, SGUILLA e TEDESCO, 2004).

Figura 5. Representação esquemática da estrutura da ftalocianina de Cloro Alumínio (Sigma Aldrich, 2014).

As ftalocianinas apresentam duas maiores bandas de absorção no espectro UV-visível, sendo a banda *soret* ou banda-B, na região do violeta ou ultravioleta (300-350 nm), e a banda Q (650-700 nm), de maior intensidade e próximo da faixa espectral na qual ocorre penetração mais profunda da luz na pele, favorecendo a aplicação da TFD no tratamento de lesões tópicas. A aplicação desse tipo de fotossensibilizante na terapia fotodinâmica contra neoplasias pigmentadas representa um grande trunfo, já que essa propriedade das ftalocianinas contorna uma barreira na luta contra essa malignidade: a competição do FS com o pigmento melanina (ALLISON e SIBATA, 2010; IDOWU e NYOKONG, 2007; NUNES, SGUILLA e TEDESCO, 2004; TEDESCO, ROTTA e LUNARDI, 2003).

Devido à sua estrutura central, as ftalocianinas apresentam caráter hidrofóbico e penetram diretamente nas células através da membrana plasmática, sendo essa captação diretamente proporcional ao seu grau de hidrofobicidade. Sabe-se que esse FS se acumula preferencialmente nos tecidos neoplásicos, porém, os mecanismos pelos quais ocorre essa retenção seletiva ainda não foram bem esclarecidos. Características específicas dos tecidos malignos suportam essa peculiaridade, como permeabilidade alterada da membrana celular, diminuição da drenagem linfática, aumento do número e da permeabilidade dos vasos sanguíneos (ISSA e MANELAZULAY, 2010; JUARRANZ et al., 2008). Outro ponto positivo das ftalocianinas é que elas são eliminadas do organismo de forma rápida, com quase nenhuma fluorescência observada no tecido e nas células-alvo após 24 h de sua administração tópica (ALLISON e SIBATA, 2010; LONGO et al., 2009).

Se por um lado a hidrofobicidade das ftalocianinas auxiliam na retenção das mesmas nos órgãos-alvo, por outro, a baixa solubilidade em meio fisiológico torna sua administração direta inviável, pois, em meio aquoso, as moléculas hidrofóbicas tendem a formar agregados por associação intermolecular. A agregação das moléculas de ftalocianina implica diretamente nas suas propriedades fotofísicas e fotoquímicas, diminuindo seu rendimento quântico de fluorescência que interfere em todos os eventos seguintes, reduzindo, por fim, a produção do EROs (OZOEMENA, KUZNETSOVA e NYOKONG, 2001) e afetando, consequentemente, sua eficácia fotossensibilizante (CHATTERJEE, FONG e ZHANG, 2008; OZOEMENA, KUZNETSOVA e NYOKONG, 2001; TEDESCO, ROTTA e LUNARDI, 2003).

Várias estratégias têm sido estudadas para superar a hidrofobicidade dos FS e viabilizar a administração dos mesmos em meio fisiológico, mantendo sua forma monomérica, sem perda ou alteração de sua atividade fotossensibilizante. Métodos como a adição de grupos substituintes nas moléculas do FS, aumentando seu caráter anfifílico e sua seletividade (ÇAKIR et al., 2014; PELEGRINO, A. C., 2009; SIMPLICIO, MAIONCHI e HIOKA, 2002; TEDESCO, ROTTA e LUNARDI, 2003), ou a busca por sistemas de liberação adequados para incorporar ativos lipofílicos, possibilitando também sua vetorização ao tecido-alvo (CHATTERJEE, FONG e ZHANG, 2008; LONGO et al., 2009; LUCKY, SOO e ZHANG, 2015), estão em constante desenvolvimento.

A alteração de fármacos fotossensibilizantes já existentes (por conjugação da molécula ou por associação aos nanocarreadores) geram produtos denominados como FS de terceira geração e são mecanismos que viabilizam o transporte do FS através da corrente sanguínea. Uma gama de FS de segunda geração, hidrofóbicos, já demonstraram excelentes resultados nos estudos *in*

vitro e *in vivo*, porém, sua baixa solubilidade em meio fisiológico é um obstáculo até mesmo para o avanço nos estudos de fase clínica. Esses sistemas de FS de terceira geração representam um *upgrade* nas propriedades fotofísicas do FS em meio aquoso, resultando em excelente atividade fotodinâmica (JOSEFSEN e BOYLE, 2008; LUCKY, SOO e ZHANG, 2015; MUEHLMANN et al., 2015).

1.5 NANOTECNOLOGIA E A TERAPIA FOTODINÂMICA

Diferentes sistemas de liberação de fármacos, conhecidos como “*drug delivery systems*”, têm sido estudados e desenvolvidos visando melhorar a eficácia terapêutica dos fármacos fotossensibilizantes para driblar suas características físico-químicas desfavoráveis e promover sua vetorização para os tecidos-alvos. Na área da terapia fotodinâmica, a nanotecnologia representa uma plataforma emergente que pode superar as limitações dos FS representando a classe dos fotossensibilizantes de terceira geração (LUCKY, SOO e ZHANG, 2015).

A nanotecnologia farmacêutica destina-se à produção de partículas com tamanho entre 1 e 1000 nm. Alguns autores consideram que as verdadeiras nanopartículas possuem tamanho abaixo de 100 nm, utilizando o termo de partículas submicrométricas para as demais (100-1000 nm). De fato, existem diferenças entre essas “classes”: as nanopartículas com tamanho abaixo de 100 nm podem ser captadas por qualquer célula do nosso corpo por endocitose, tornando-se potencialmente tóxicas (MÜLLER, SHEGOKAR e CORNELIA, 2011).

Comparados aos sistemas de liberação convencionais, partículas de tamanho nanométrico representam um ramo diferenciado que vai muito além do que apenas a diferença na escala de tamanho. Basicamente, partículas em dimensões nanométricas apresentam propriedades muito diferentes comparadas com partículas micrométricas ou maiores, como adesividade e ponto de fusão e também na absorção e biodistribuição, e são exatamente essas mudanças em suas propriedades físico-químicas que atraem grande atenção para sistemas em nanoescala (MÜLLER, SHEGOKAR e CORNELIA, 2011).

Os nanocarreadores apresentam inúmeras vantagens, como: (i) prevenir a liberação precoce do FS protegendo-o da inativação em meio fisiológico e, conseqüentemente, aumentar sua estabilidade e quantidade de fármaco que efetivamente chega ao destino; (ii) possibilitar a modificação da superfície das partículas com grupos funcionais melhorando sua biodistribuição e vetorização; (iii) viabilizar administração de menor quantidade do FS; (iv) possibilitar ao FS percorrer o caminho a partir do local de administração, chegando até as células-alvo em sua

forma monomérica; (v) aumento da eficácia e segurança, prevenindo seu acúmulo em células saudáveis e reduzindo efeitos adversos. Por fim, os nanocarreadores são capazes de veicular (encapsular) as moléculas lipofílicas e até mesmo promover a associação de diferentes fármacos, viabilizando sua utilização terapêutica (BECHET et al., 2008; KONAN, GURNY e ALLÉMANN, 2002; LUCKY, SOO e ZHANG, 2015; PASZKO et al., 2011).

Até o momento, as principais nanopartículas aplicadas na terapêutica do câncer são micelas, lipossomas, nanovesículas, nanoesferas, nanopartículas poliméricas, nanoemulsões, dendrímeros, *quantum dots* e nanopartículas de diferente composição, como magnéticas, metálicas, fulerenos, niossomas, nanopartículas lipídicas sólidas e, mais recentemente, nanopartículas de géis, entre outras (LIM et al., 2013; LUCKY, SOO e ZHANG, 2015; PASZKO et al., 2011).

As nanopartículas lipídicas sólidas surgem como uma abordagem tecnológica para melhorar a eficácia dos fármacos fotossensibilizantes, aumentando sua disponibilidade e reduzindo efeitos tóxicos, tornando-as o sistema ideal para carregamento de FS (SIMÕES, SOUSA e PAIS, 2015; WISSING, KAYSER e MÜLLER, 2004).

1.5.1 Nanopartículas lipídicas sólidas (NLS)

Nanopartículas lipídicas sólidas foram primeiramente desenvolvidas no começo da década de 90 e consistem em uma matriz lipídica sólida tanto à temperatura ambiente quanto corporal. O tamanho médio das NLS é de 150 a 300 nm, mas pode variar entre 10 – 1000 nm, como já discutido anteriormente. Comparando as NLS aos tradicionais sistemas coloidais (emulsões, lipossomas, micro e nanopartículas e nanoesferas poliméricas), a alteração do estado físico do lipídio manteve as vantagens dos nanocarreadores clássicos (proteção de fármacos lábeis incorporados contra a degradação química, excelente tolerabilidade dos excipientes, liberação controlada e prolongada), eliminando alguns inconvenientes (baixa estabilidade e biocompatibilidade, dificuldade de produção em larga escala, alto custo de matéria-prima) (SIMÕES, SOUSA e PAIS, 2015; MÜLLER, SHEGOKAR e CORNELIA, 2011; WISSING, KAYSER e MÜLLER, 2004). Além disso, as NLS apresentam maior capacidade de carga, pois, em geral, lipídios sólidos apresentam maior capacidade de incorporar ativos do que lipídios líquidos (MÜLLER, SHEGOKAR e CORNELIA, 2011).

As formulações de NLS possibilitam seu uso por diversas vias de administração (parenteral, oral, dérmica, ocular, pulmonar) já desenvolvidas e caracterizadas *in vivo* e *in vitro* (MÜLLER, MÄDER e GOHLA, 2000; WISSING, KAYSER e MÜLLER, 2004).

As NLS são preparadas utilizando excipientes fisiologicamente tolerados, reconhecidos como seguros, com o status *Generally Recognized As Safe* (GRAS) (FDA, 2016) ou já utilizados em outras preparações no mercado cosmético ou farmacêutico. Por isso são sistemas que apresentam ótima biocompatibilidade e baixa toxicidade (MÜLLER, RADTKE e WISSING, 2002; NEGI, JAGGI e TALEGAONKAR, 2014). A escolha do lipídio sólido (puro ou mistura de diferentes tipos) e dos tensoativos tem influência direta nas características finais das NLS (SOUTO et al., 2011).

Diversos métodos de preparo de NLS estão descritas na literatura, incluindo as técnicas utilizadas na produção das nanoemulsões, já que as NLS podem ser obtidas a partir de nanoemulsões óleo em água empregando o lipídio sólido na produção das nanogotículas. Os métodos podem ser divididos em dois principais grupos: (i) alta energia de emulsificação, que envolvem equipamentos de alto custo, como homogeneizadores de alta pressão e sonificadores, para fornecer energia mecânica e quebrar as gotículas em tamanhos nanométricos ou (ii) baixa energia de emulsificação, com uso de solvente orgânico ou pela técnica de inversão de fases (ANTON et al., 2007; CARBONE et al., 2012)ANTON, BENOIT e SAULNIER, 2008; CARBONE et al., 2012; MÜLLER, SHEGOKAR e CORNELIA, 2011). As NLS podem ser obtidas por homogeneização por alta pressão (à quente ou à frio), por emulsificação-sonicação, por emulsificação com evaporação de solventes, por difusão de solvente orgânico, por injeção de solvente orgânico, por formação de emulsões múltiplas (MÜLLER, SHEGOKAR e CORNELIA, 2011).

O método de obtenção de NLS utilizado neste trabalho foi por emulsificação direta com inversão de fases (GOTO et al., 2012), que faz uso das características físico-químicas intrínsecas dos componentes da formulação para produção das nanopartículas. Não há a necessidade de equipamentos dispendiosos ou do uso de solvente orgânico, que, além de ter alto custo, é tóxico em meio fisiológico e exige etapas adicionais na produção para a eliminação do mesmo da preparação farmacêutica (GOTO et al., 2012).

A técnica de emulsificação direta foi viabilizada pelo emprego de tensoativos não iônicos que apresentam grupos de óxido de etileno em sua estrutura e envolve a combinação de dois tipos de inversão de fases: transicional (por alteração da temperatura) e catastrófica (por alteração do volume). Na inversão de fases transicional ocorre alteração da afinidade do

tensoativo pelas fases aquosa e oleosa, por desidratação dos grupos de óxido de etileno presente em sua estrutura com o aumento da temperatura. À medida que a temperatura diminui as pontes de hidrogênio com a fase aquosa são reestabelecidas. No momento em que ocorre essa inversão de afinidade, o tensoativo inverte sua curvatura, o que predispõe à formação de nanogotículas. Esse resultado é obtido em conjunto com a inversão catastrófica, pela qual inicialmente gotículas de água estão dispersas em uma fase oleosa contínua e, devido à adição lenta e sucessiva da fase aquosa na fase oleosa, o volume da fase aquosa aumenta e promove inversão espontânea na curvatura do tensoativo, resultando em gotículas de óleo em uma fase aquosa contínua (FERNANDEZ et al., 2004; GOTO et al., 2012).

Grande parte das desvantagens relatadas para esse sistema carreador estão relacionadas à sua estrutura cristalina e/ou alterações que nela possam ocorrer durante seu armazenamento, como: (i) capacidade de carga limitada à estrutura cristalina, (ii) expulsão do fármaco durante armazenamento devido à formação da rede cristalina mais organizada, (iii) perfil de liberação do fármaco pode mudar durante o tempo de armazenamento, (iv) alterações nas estruturas polimórficas, (v) aumento do tamanho de partícula durante a estocagem ou (vi) gelificação da dispersão coloidal (DAS et al., 2011).

Portanto, o conhecimento do grau de cristalinidade da matriz lipídica e dos tipos de estruturas polimórficas presentes é de fundamental importância para as dispersões de NLS, pois estão diretamente relacionadas com a incorporação de fármacos e sua liberação (DAS et al., 2011; SOUTO et al., 2011). Em geral, os glicerídeos podem cristalizar em estruturas tridimensionais (empacotamento das moléculas) do tipo α , β' ou β , cada uma correspondendo à diferentes organizações das cadeias hidrocarbônicas. A forma menos estável é a α (hexagonal), com menor ponto de fusão. A forma intermediária é a β' (ortorrômbica), seguida da forma β (tricíclica), mais estável e com maior ponto de fusão. As transformações polimórficas acontecem na ordem $\alpha \rightarrow \beta' \rightarrow \beta$ e são irreversíveis (SOUTO et al., 2011). Uma estrutura polimórfica intermediária tipo β_i (triclínica e ortorrômbica) pode ser encontrada também (JENNING, SCHÄFER-KORTING e GOHLA, 2000; HEURTAULT et al., 2003). As diferentes estruturas polimórficas encontradas na matriz lipídica das NLS após sua recristalização dependem da velocidade do resfriamento, do seu tamanho e composição, mas, geralmente, o lipídio recristaliza em estruturas de alta energia α ou β' e, durante o armazenamento, podem ocorrer transições para estruturas β , mais ordenadas e menos energéticas. Essa elevada organização da matriz lipídica, com baixo número de imperfeições, pode conduzir à expulsão da droga, que se acomoda exatamente nessas lacunas (DAS et al., 2011; PARDEIKE, HOMMOSS e MULLER, 2009).

O uso das NLS em aplicações tópicas, na pele ou em mucosas, tem atraído bastante atenção devido ao seu tamanho reduzido e sua forte aderência ao estrato córneo, formando um filme lipídico flexível sobre a camada de células queratinizadas. Esse efeito oclusivo auxilia na manutenção da hidratação da pele, além de promover aumento da penetração de fármacos (SOUTO, MEHNERT e MÜLLER, 2006), favorecendo sua aplicação no tratamento do melanoma.

Estudos demonstraram que nanopartículas lipídicas sólidas possuem maior captação e retenção no tecido tumoral devido às características específicas das células malignas, como alteração da vascularização, permeabilidade aumentada, extensa angiogênese, além do baixo retorno venoso e depuração linfática deficiente. Os vasos sanguíneos dos tecidos tumorais podem apresentar poros de 100 a 780 nm, ao contrário dos vasos em tecidos normais. A vascularização aumentada e irregular aliada ao *clearance* reduzido permite o aumento da concentração de nanopartículas por um período de tempo maior, fenômeno conhecido como efeito da permeabilidade e retenção aumentados (do inglês: *Enhanced Permeability Retention* – EPR) (DEBELE, PENG e TSAI, 2015; IYER et al., 2006; PASZKO et al., 2011; RIGON et al., 2015).

1.5.2 Vesículas cataniônicas (VesCat)

Esses nanovetores coloidais inovadores tratam-se de vesículas unilamelares que se formam espontaneamente a partir de tensoativos cataniônicos (TCa), constituídos pela associação de tensoativos iônicos de cargas opostas em meio aquoso (BRAMER, DEW e EDSMAN, 2007; KALER et al., 1989). Sua estrutura vesicular permite a veiculação de fármacos hidrofílicos ou hidrofóbicos, assim como permite proteger o ativo encapsulado da degradação, reduzir sua toxicidade ou aumentar sua biodisponibilidade (BOUDIER et al., 2011; SOUSSAN et al., 2008).

A formação das vesículas cataniônicas (VesCat) ocorre por agregação espontânea quando se adiciona o pó de tensoativos cataniônicos, que se encontra em sua forma monomérica, à água (VIVARES et al., 2008; SOUSSAN et al., 2008; CONSOLA et al., 2007). As vesículas são estáveis em meio aquoso por alguns dias, mas os monômeros de tensoativos podem ser armazenados em sua forma liofilizada à temperatura ambiente por anos, sem nenhuma degradação (BOUDIER et al., 2011).

Entre os vários métodos de obtenção de TCa, é importante destacar aqueles que não necessitaram de sais residuais durante sua preparação, pois uma vez adicionado não existe um método para retirá-lo completamente, restando traços do mesmo presente na solução. Tal fato é totalmente indesejável devido à potencial toxicidade do sal residual. Quatro métodos são utilizados para a produção de TCa: (i) por extração com solvente orgânico, (ii) por precipitação, (iii) por troca-iônica ou (iv) por troca de prótons (SOUSSAN et al., 2009).

O método de troca de próton foi originalmente desenvolvido pelo grupo de pesquisa da Dra. Muriel Blanzat no *Laboratoire des Interactions Moléculaires et Réactivité Chimique et Photochimique* – IMRCP (*Université Paul Sabatier* - Toulouse III), dando origem ao primeiro tensoativo cataniônico bicatênario. O método consiste basicamente em uma mistura de um tensoativo derivado de um amino-açúcar com outro que possua uma função ácida, em meio aquoso. Através de uma simples reação ácido-base, os tensoativos cataniônicos são obtidos, sem a presença de sais residuais (SOUSSAN et al., 2009; BLANZAT et al., 1999b; BLANZAT et al., 1999a).

Entretanto, os TCa bicatênarios não permitiram a formação de vesículas estáveis por tempo hábil para sua aplicação como sistema carreador. Com o objetivo principal de obter vesículas cataniônicas mais estáveis foram sintetizados tensoativos cataniônicos com três cadeias hidrocarbônicas laterais, chamados de tensoativos cataniônicos tricatênarios (TriCat) (MARQUES et al., 1993; MARQUES et al., 2003; SOUSSAN et al., 2007). Tais tensoativos foram capazes de formar espontaneamente vesículas mais estáveis e menos permeáveis, ou seja, evitou a liberação rápida e precoce de seu conteúdo encapsulado. Esta melhoria da estabilidade das nanovesículas cataniônicas pode ser explicada principalmente pela introdução da terceira cadeia lateral lipofílica, conferindo ao sistema um reforço na interação intramolecular devido ao aumento das forças hidrofóbicas (SOUSSAN et al., 2008).

É importante ressaltar que tensoativos derivados de açúcares, como no caso do tensoativo cataniônico tricatênario, derivado de lactose – TriCat 12 (**Figura 6**), possuem a vantagem real de mimetizar glicolipídios, estruturas presentes na superfície de células que participam de mecanismos de reconhecimento molecular, o que confere grande biocompatibilidade do mesmo com nosso organismo (SOUSSAN, E., 2007; SOUSSAN et al., 2008).

Figura 6. Representação esquemática da estrutura do tensoativo cataniônico tricatenário derivado de lactose (TriCat 12) (adaptado de SOUSSAN, E., 2007; SOUSSAN et al., 2008).

Estudos com as vesículas derivadas de tensoativos cataniônicos apresentaram resultados comprovados em aplicações anti-HIV (BLANZAT et al., 1999a; RICO-LATTES et al., 2005), anti-inflamatório não esteroide (CONSOLA et al., 2007) e no tratamento do câncer do tipo melanoma com a terapia fotodinâmica (CASTAGNOS et al., 2014). No trabalho de CASTAGNOS et al. (2014) foi demonstrado que as VesCat, obtidas a partir do TriCat 12, encapsularam a ftalocianina de cloro alumínio com eficiência e apresentaram excelente efeito fotodinâmico nos estudos *in vitro* na linhagem de melanoma B16-F10, reduzindo a viabilidade celular para até 1,9% da neoplasia pigmentada.

Esta parte do trabalho de doutorado com VesCat foi realizado em colaboração com o laboratório francês IMRCP, durante o estágio de doutorado do tipo sanduíche, onde o sistema de vesículas cataniônicas foi reproduzido com aprimoramento do método, caracterização das nanoestruturas produzidas pelo método aprimorado e posterior avaliação do perfil de liberação de CIAIPc presente na formulação, com uso de células de difusão vertical do tipo Franz.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver um sistema de nanopartículas lipídicas sólidas, aprimorar o método de obtenção de vesículas cataniônicas, caracterizar os nanocarreadores contendo o fármaco fotossensibilizante ftalocianina de cloro alumínio (ClAlPc) e avaliar, por testes *in vitro*, a biocompatibilidade celular e a atividade fotodinâmica das nanopartículas lipídicas sólidas contra melanoma maligno pigmentado.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolvimento das formulações de nanopartículas lipídicas sólidas e obtenção de vesículas cataniônicas, contendo ou não ClAlPc;
- Caracterização físico-química e morfológica das nanoestruturas;
- Avaliação da cristalinidade e da estabilidade das nanopartículas lipídicas sólidas;
- Avaliação *in vitro* da biocompatibilidade celular das nanopartículas lipídicas sólidas sobre linhagem de fibroblastos NIH-3T3 e da atividade fotodinâmica da ClAlPc encapsulada nas NLS sobre linhagem de melanoma B16-F10;
- Avaliação da permeação e retenção cutânea *in vitro* de ClAlPc encapsulada nos nanocarreadores utilizando células de difusão do tipo Franz.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS

Para o preparo dos sistemas coloidais utilizados neste trabalho, os principais componentes utilizados foram:

- Behenato de glicerila [mistura de mono (12-18%), di (52-54%) e triglicerídeos (28-32%) do ácido behênico, um ácido graxo de cadeia longa (C22:O)] (**Figura 7**), doado pela Brasquim (Brasil).

INCI name: Glyceryl behenate

Nome comercial: Compritol® 888 CG ATO

Intervalo de fusão 69-74 °C

Figura 7. Representação esquemática das estruturas de (a) mono, (b) di e (c) triglicerídeos do ácido behênico (ABURAHMA e BADR-ELDIN, 2014).

- Ácido esteárico [um ácido graxo de cadeia longa (C18:O)] (**Figura 8**) da Sigma-Aldrich CO. (EUA).

INCI name: Stearic acid

Intervalo de fusão 67-72 °C

Figura 8. Representação esquemática da estrutura do ácido esteárico (Sigma Aldrich, 2015).

- Ftalocianina de Cloro Alumínio - ClAlPc (**Figura 5**) da Sigma-Aldrich CO. (EUA).

INCI name: Aluminum phthalocyanine chloride

Grau de pureza 85%

Massa Molar 574,96 g mol

- Isoestearato de sorbitano (**Figura 9**), gentilmente doado pela Croda do Brasil Ltda (Brasil).

INCI name: Sorbitan Isostearate

Nome comercial: Spam™ 120-LQ-(MH)

Equilíbrio hidrofílico-lipofílico = 4,7

Figura 9. Representação esquemática da estrutura do isoestearato de sorbitano (LANIGAN e YAMARIK, 2002).

- Óleo de rícino hidrogenado 40-OE (**Figura 10**), gentilmente doado pela Croda do Brasil Ltda (Brasil).

INCI name: PEG-40 Hydrogenated Castor Oil

Nome comercial: CRODURET™ 50-SS-(RB)

Equilíbrio hidrofílico-lipofílico = 14,1

Figura 10. Representação esquemática da estrutura do óleo de rícino hidrogenado etoxilado $n = 40$ (MARUNO, M., 2009).

- TriCat 12 (lote JVO36), do laboratório francês IMRCP (**Figura 6**).

As linhagens celulares para estudos biológicos *in vitro* foram obtidas da *American Type Culture Collection* – ATCC (EUA), sendo elas: fibroblastos NIH-3T3 – ATCC CRL1658™ e

células melanocíticas pigmentadas B16-F10 – ATCC CRL 6475TM. O cultivo das células foi realizado, respectivamente, com os meios de cultura *Dulbecco Eagle's minimum essential medium* (DMEM) e *Roswell Park Memorial Institute 1640* (RPMI-1640) adquiridos da Gibco (EUA), de onde também foi obtida a tripsina-EDTA 0,25%. Foram utilizados ainda o bicarbonato de sódio (Synth, Brasil), aminoácidos não essenciais, soro fetal bovino inativado, penicilina, estreptomicina e anfotericina adquiridos da Cultilab (Brasil). Azul de tripan, tampão fosfato salino (do inglês: PBS – *phosphate-buffered saline*) (pH 7,2-7,4), glicerol e brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolio (MTT) foram adquiridos da Sigma-Aldrich CO. (EUA). Os meios de cultura e o tampão foram previamente filtrados com membrana de 0,22 µm.

As orelhas de porco usadas como modelo nos estudos de permeação foram obtidas do Matadouro e Frigorífico Olhos d'Água (Brasil) e do abatedouro *Société Exploitation Abattoirs Montauban* (França). Em ambos os casos, o material foi proveniente de animais recentemente sacrificados e sem escaldar. As orelhas foram adequadamente higienizadas com água em abundância. A pele da parte externa das mesmas foi dissecada com bisturi, o tecido subcutâneo remanescente foi removido e os pêlos foram aparados com uma tesoura. As secções de pele foram então armazenadas em freezer -80 °C, por um período não superior a 12 semanas.

Os solventes acetona, metanol, 2-propanol, clorofórmio, etanol absoluto e dimetilsulfóxido (DMSO) foram obtidos da *J.T.Baker (Mallinckrodt Baker, EUA)*. Todos os solventes e reagentes químicos foram obtidos com grau analítico e alta pureza.

A água ultrapura foi obtida através de filtragem sequencial em colunas de troca iônica do equipamento *Direct-Q® Water Purification System* (Millipore, Alemanha) no Brasil e da *Milli-Q Integral Water Purification System* (Millipore, Alemanha) na França.

3.2 MÉTODOS UTILIZADOS PARA NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS

No fluxograma da **Figura 11** estão ilustrados todos os métodos utilizados no estudo com as nanopartículas lipídicas sólidas, descritos detalhadamente a seguir.

Figura 11. Fluxograma dos métodos utilizados para desenvolvimento e caracterização das nanopartículas lipídicas sólidas.

3.2.1 Preparo das NLS, contendo ou não ClAlPc, por emulsificação direta.

As formulações foram preparadas pelo método de emulsificação direta, adaptado de GOTO et al. (2012) e MONTENEGRO et al. (2011). Neste método a fase aquosa, composta apenas por água ultrapura, e a fase oleosa, contendo o lipídio sólido, a mistura de tensoativos e o FS (quando presente), nas porcentagens estudadas, foram separadamente aquecidas à 85 ± 2 °C, em um banho termostatizado *Polyscience* (EUA), sob agitação magnética constante (1000 rpm) em uma placa de agitação magnética com aquecimento PC-420 (*Corning*®, EUA). A fase aquosa foi adicionada gota-a-gota ($\sim 0,7$ mL s⁻¹) na fase oleosa, sob temperatura e agitação magnética constante e, após homogeneização, a formulação foi mantida sob agitação até seu resfriamento à temperatura ambiente (25 ± 3 °C) por um período de tempo de aproximadamente 15 min.

O lipídio sólido utilizado no preparo das NLS foi escolhido a partir do estudo com base no diagrama de fases descrito no item 3.2.2.

Foram preparadas NLS na ausência do FS (NLS vazia) e na presença do mesmo (CIAIPc-NLS). Diferentes concentrações teóricas do CIAIPc foram estudadas (**Tabela 1**) para avaliar a capacidade suportada pela matriz lipídica de encapsular o ativo com estabilidade.

Tabela 1. Nome das formulações de nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) contendo ftalocianina de cloro alumínio (CIAIPc) e concentração teórica correspondente do ativo.

Formulação	Concentração teórica de CIAIPc ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
CIAIPc-A-NLS	50
CIAIPc-B-NLS	100
CIAIPc-C-NLS	200
CIAIPc-D-NLS	250
CIAIPc-E-NLS	300
CIAIPc-F-NLS	350
CIAIPc-G-NLS	400

No processo de pesagem do fármaco foi considerado o seu grau de pureza. Todas as preparações foram feitas nas mesmas condições experimentais descritas acima, utilizando material estéril, com a produção em cabine de segurança com fluxo laminar, para serem utilizadas nos estudos *in vitro*.

3.2.2 Estudo de formulação com base no diagrama ternário.

Com o objetivo de obter sistemas nanométricos para administração do de CIAIPc e considerando que o tipo e a quantidade do tensoativo e do óleo usados na formulação determinam o tamanho, a estrutura e a estabilidade nas dispersões resultantes (ANTON et al., 2007), um estudo experimental baseado em um diagrama ternário ou diagrama de fases (**Figura 12.a**) foi realizado para definir a proporção de cada componente da formulação e o lipídio sólido mais adequado para formação das NLS.

Figura 12. (a) Diagrama ternário, destacando em vermelho a região de interesse neste estudo, e (b) área de interesse ampliada, com os pontos avaliados.

Foram escolhidos oito pontos no diagrama ternário. Cada ponto representou uma combinação de diferentes proporções entre as variáveis (água, mistura de tensoativos e lipídio sólido), como apresentado resumidamente na **Tabela 2** e **Figura 12.b**. Os dois componentes da fase oleosa (lipídio sólido e par de tensoativos) variaram suas proporções entre 5 e 20% (m/m) cada, não excedendo o total de 40% de fase oleosa na formulação final.

Tabela 2. Porcentagem, em massa (gramas)*, de cada componente da formulação correspondente aos pontos escolhidos no diagrama de fases ternário para estudo das formulações.

Pontos	Composição (%)		
	Lipídio sólido	Par de tensoativos	Água
27	20,0	20,0	60,0
28	20,0	10,0	70,0
35	10,0	20,0	70,0
36	10,0	10,0	80,0
37	10,0	5,0	85,0
38	7,5	7,5	85,0
39	5,0	10,0	85,0
40	5,0	5,0	90,0

*Massa total de cada formulação: 10 gramas.

Dois diferentes lipídios sólidos foram testados: ácido esteárico (SA) e compritol (Co), afim de observar a influência deste componente na formulação final.

A produção das nanopartículas lipídicas sólidas foi obtida pelo método de inversão de fases. Sabe-se que a obtenção de um sistema nanométrico por esse método depende diretamente das características físico-químicas do(s) tensoativo(s) utilizado(s), sem necessidade do uso de

equipamentos de alto custo de produção e escalonamento ou do emprego de alta energia de cisalhamento (TADROS et al., 2004; ANTON e VANDAMME, 2009; ANTON, BENOIT e SAULNIER, 2008). Portanto, o mesmo sistema de tensoativos empregado no trabalho de GOTO et al. (2012) foi utilizado para a produção das NLS, já que a nanoemulsão estudada pelos autores apresentou características nanométricas e estáveis.

O par de tensoativos foi composto por um tensoativo lipofílico (isoestearato de sorbitano) e outro hidrofílico (óleo de rícino hidrogenado 40-OE), usado em uma mistura de proporção fixa entre eles. O estudo foi conduzido com o objetivo de proporcionar um Equilíbrio Hidrofílico Lipofílico (EHL) final igual a 11, baseado no trabalho já desenvolvido por GOTO, P. L. (2011) empregando o mesmo par de tensoativos. Segundo a escala de EHL desenvolvida por GRIFFIN (1949) (**Figura 13**) esse valor EHL = 11 favorece a formação de dispersões óleo em água, de interesse neste trabalho.

Figura 13. Escala Equilíbrio Hidrofílico-Lipofílico (adaptado de Jadhav, 2004).

Para obter o EHL final requerido, a proporção de cada tensoativo na mistura foi determinada utilizando as **Equações 1 e 2** (GRIFFIN, 1954):

$$\%L + \%H = 100\% \quad \text{Equação 1}$$

$$EHL_F = \frac{(\%H \times EHL_H) + (\%L \times EHL_L)}{100} \quad \text{Equação 2}$$

Onde %L é a porcentagem do tensoativo lipofílico na mistura de tensoativos, %H é a porcentagem do tensoativo hidrofílico na mistura de tensoativos, EHL_L é o valor de EHL do tensoativo lipofílico, EHL_H é o valor de EHL do tensoativo hidrofílico e EHL_F é a valor do EHL final da formulação.

Portanto, para $EHL_F = 11$, a porcentagem do tensoativo hidrofílico (óleo de rícino hidrogenado 40 – OE) foi de 67,0% e 33,0% de tensoativo lipofílico (isoestearato de sorbitano).

Essa proporção foi mantida constante em todo o estudo, para todas as formulações. Nesta etapa, foram produzidas formulações na ausência da molécula fotoativa.

As dispersões produzidas com as proporções previamente mencionadas foram avaliadas macroscopicamente, observando as características físicas (viscosidade, uniformidade, sinais de instabilidade) e/ou organolépticas (cor, brilho, textura, opacidade). As formulações consideradas estáveis macroscopicamente foram avaliadas em uma escala mais profunda por análises de tamanho médio de partículas, índice de polidispersão e potencial zeta, conforme item 3.2.3.2. Todas as formulações foram preparadas em triplicata ($n = 24$) permitindo estimar o erro experimental entre as preparações.

3.2.3 Caracterização físico-química das formulações obtidas.

Após definir os pontos do diagrama de fases cujas composições apresentaram formulações estáveis, foi escolhida uma composição fixa para o sistema nanoparticulado e esta foi utilizada para produção de NLS variando, a partir deste momento, a concentração teórica de CIAIPc (**Tabela 1** do item 3.2.1). A partir deste estudo, todos os testes subsequentes foram realizados com as NLS vazias e com as CIAIPc-NLS obtidas conforme descrito acima.

Os resultados dos itens a seguir foram apresentados como média das triplicatas dos lotes avaliados $\pm$ desvio padrão, com análise estatística ANOVA unilateral, seguida do pós-teste de Tukey ($p < 0,05$), utilizando o software *Prism*® (Versão 5.0).

3.2.3.1 Determinação do pH.

O pH das formulações de NLS contendo ou não CIAIPc foi medido utilizando o pHmetro de bancada QX 1500Plus (Qualxtron, Brasil), em meio aquoso, a 25 °C. Em virtude da baixa viscosidade do sistema não foram realizadas diluições para a determinação do pH.

3.2.3.2 Determinação de tamanho médio, polidispersidade e potencial zeta.

O tamanho médio, expressado como *Z-average* em nanômetros (nm), e a distribuição de tamanho de partículas, expressado como índice de polidispersão (do inglês: *Polydispersity Index* PDI), das dispersões foram determinados por espectroscopia de correlação de fótons (do inglês, *Photon Correlation Spectroscopy* – PCS) com o aparelho do tipo Zetasizer Nano ZS ZEN3600 (*Malvern Instruments*, Reino Unido) com laser He-Ne e ângulo de varredura fixo a 173°. A carga elétrica superficial, representada pelo potencial zeta em milivolts (mV), foi

determinado no mesmo equipamento, pela mobilidade eletroforética das dispersões baseado na equação de *Smoluchowski* (DAL PIZZOL, C., 2014; Malvern Instruments Ltd, 2004; NEGI et al., 2013). Todas as determinações foram feitas em triplicata, a 25 °C, com diluição de 1:100 de cada amostra em água ultrapura. Para análise do potencial zeta foi adicionado 1% de PBS (LOBOVKINA et al., 2011).

3.2.4 Avaliação morfológica das formulações de NLS.

A análise morfológica das NLS vazia e ClAlPc-C-NLS foi realizada por microscopia eletrônica de transmissão e por microscopia de força atômica.

3.2.4.1 Por microscopia eletrônica de transmissão (MET).

Imagens das NLS foram obtidas com microscópio de transmissão eletrônica JEOL 100CXII (JEOL, Japão), equipado com câmera digital *Hamamatsu* ORCA-HR. Este equipamento pertence ao Laboratório Multiusuário de Microscopia Eletrônica do Departamento Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto – SP, sob responsabilidade do técnico José Augusto Maulin.

Para o preparo das amostras, 10,0 µL de cada formulação foram diluídos e homogeneizados em microtubo contendo 1,0 mL de água ultrapura. Uma alíquota dessa diluição foi depositada sobre uma grade de cobre, secada à temperatura ambiente. As imagens foram adquiridas em 50kx de tamanho no microscópio operando a 70 kV.

3.2.4.2 Por microscopia de força atômica.

A microscopia de força atômica (do inglês: *Atomic Force Microscopy* – AFM) possui habilidade em fornecer imagens tridimensionais da superfície topográfica com resolução nanométrica, independente da condutividade da amostra (SOUSA, E. C., 2007).

Foram adquiridas imagens das NLS por microscopia de força atômica utilizando *Scanning Probe Microscope* SPM-9600 (*Shimadzu*, Japão), controlado pelo software SPM Online, do Laboratório de Microscopia de Força Atômica da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto – SP, sob supervisão da técnica Ivana Aparecida Borim.

As imagens por AFM foram obtidas à temperatura ambiente, sem necessidade de cobertura da amostra, segundo GOTO et al. (2012). Uma gota (5,0 μL) da dispersão coloidal foi depositada sobre mica, espalhada e secada com um jato de argônio. As imagens foram obtidas em modo de contato intermitente, utilizando sondas de silício com *cantilever* de 124 μm de comprimento, com frequência de ressonância no intervalo de 324-369 kHz e constante de mola de 34-51 N m^{-1} . Foi utilizada a taxa de varredura de 0,3-1,0 Hz.

3.2.5 Análise das NLS por difratometria de raios-X.

Para investigação de alterações polimórficas foram feitas análises por difração de raios-X do lipídio sólido puro, do FS puro, das formulações de NLS na presença ou não de CIAIPc, no difratômetro D5005 (*Siemens/Bruker-AXS*, Alemanha) com radiação $\text{CuK}\alpha = 1,5406 \text{ \AA}$, do Laboratório de Análises Térmicas do Departamento de Química da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto - SP, sob responsabilidade do técnico Lourivaldo dos Santos Pereira.

As medidas foram realizadas sob as seguintes condições: ângulo 2Θ variando entre $2-50^\circ$, com velocidade do goniômetro de $0,02^\circ$ por passo e passo de 1 segundo, tensão de 40 kV e corrente de 30 mA. As amostras de NLS vazias e CIAIPc-C-NLS foram avaliadas 1 mês após sua produção e após 24 meses de estocagem a $\sim 4^\circ\text{C}$. As mesmas foram liofilizadas em um liofilizador *LyphLock 4.5* (*Labconco*, EUA) por 48 h, à -45°C . Os materiais puros foram submetidos à análise direta. Filmes finos das amostras de NLS foram produzidos para a análise.

As interpretações qualitativas dos difratogramas foram efetuadas por comparação com dados da literatura.

3.2.6 Análise das NLS por calorimetria exploratória diferencial.

Para determinar o grau de cristalinidade das matrizes lipídicas foi feito o estudo por calorimetria exploratória diferencial (do inglês: *Differential Scanning Calorimetry – DSC*) do lipídio sólido puro e das formulações de NLS na presença ou não de CIAIPc, no equipamento *Jade DSC* (*Perkin-Elmer*, Holanda), através do software integrado *Pyris*, no Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto – SP, sob supervisão do técnico Henrique Diniz.

Foram obtidos termogramas do comprimido puro e de NLS liofilizadas vazias e contendo CIAIPc, ambas com tempo de vida de 1 e 24 meses. Aproximadamente 5 mg de cada amostra foram pesados em cadinhos de alumínio, sendo um cadinho semelhante utilizado como referência, porém, vazio. As análises foram realizadas em atmosfera de nitrogênio com fluxo a 30 mL min⁻¹, taxa de aquecimento de 5 °C min⁻¹ de 10-90 °C, com posterior resfriamento a 15 °C nas mesmas condições.

Os resultados foram plotados e analisados para identificação da temperatura e calor envolvidos nas transições térmicas. O grau de cristalinidade (GR) foi calculado a partir dos valores de entalpia de fusão, segundo **Equação 3** (DE CARVALHO et al., 2013; FREITAS e MULLER, 1999; SOUTO, MEHNERT e MÜLLER, 2006):

$$GR (\%) = \left(\frac{\Delta H_{fus}}{\Delta H_{lipidio} \times [lipidio]} \right) \times 100 \quad \text{Equação 3}$$

Onde, ΔH_{fus} é a entalpia de fusão da formulação de NLS, $\Delta H_{lipidio}$ é a entalpia de fusão do comprimido 100% cristalino e $[lipidio]$ é a concentração do comprimido na formulação.

Interpretações qualitativas e quantitativas dos termogramas foram efetuadas por comparação com dados da literatura

3.2.7 Desenvolvimento de métodos analíticos espectrofotométricos e espectrofluorimétricos para quantificação de CIAIPc.

No desenvolvimento dos métodos analíticos foi considerado, primeiramente, o tipo de solvente orgânico necessário para extrair a ftalocianina nos diferentes estudos. Portanto, métodos analíticos adequados foram desenvolvidos para quantificar o fármaco, cada qual com seu solvente extrator específico, com a construção de curvas de calibração para avaliação da linearidade, bem como determinação dos limites de detecção e quantificação do ativo nas diferentes faixas de concentração estudadas. Essas curvas foram obtidas utilizando as técnicas de espectroscopia de UV-visível ou por espectroscopia de emissão de fluorescência, definida de acordo com a quantidade de ftalocianina a ser quantificada.

Para o estudo de quantificação do conteúdo total de CIAIPc nas NLS (item 3.2.8.1) o método foi desenvolvido com base em medidas de absorbância realizada em espectrofotômetro de duplo feixe UV-visível *Ultrospec 7000* (GE Healthcare, Suíça), na faixa de comprimento de onda de

300 a 800 nm, utilizando a mistura de solventes orgânicos clorofórmio e etanol (proporção 1:1, em volume).

Os outros 2 métodos foram desenvolvidos por espectroscopia de emissão de fluorescência com o espectrofluorímetro *Fluorolog®-3* (*Horiba Jobin Yvon*, Japão) para quantificação da ftalocianina em duas etapas no estudo *in vitro* com células de difusão do tipo Franz (item 3.2.10). Primeiro, com o intuito de avaliar a permeação do FS através da pele, o mesmo foi doseado no meio receptor das células de Franz, composto por PBS e etanol (na proporção 4:1, em volume). Em seguida, fez-se a análise da ftalocianina retida na pele, após o término do experimento, utilizando o metanol puro como solvente extrator. Este último método foi também utilizado para quantificar a CIAIPc livre não encapsulada (item 3.2.8.2).

3.2.7.1 Linearidade.

A linearidade de um método expressa a faixa na qual o sinal analítico (absorbância ou intensidade de fluorescência) é linearmente proporcional à concentração do analito (ANVISA, 2003; SIQUEIRA-MOURA et al., 2010).

Para estabelecer as linearidades para os diferentes protocolos utilizados foram construídas no mínimo 4 curvas de calibração contendo pelo menos 5 diferentes níveis de concentrações de CIAIPc (ANVISA, 2003).

Os parâmetros utilizados para a obtenção das linearidades para os 3 diferentes métodos desenvolvidos estão sumarizados na **Tabela 3**. As amostras utilizadas para obtenção das curvas de calibração foram preparadas diretamente em cubeta de quartzo de 10 mm de caminho óptico, partindo-se de uma solução estoque inicial da CIAIPc 200 µg mL⁻¹ em DMSO, calculada considerando-se o grau de pureza do ativo (85%) como descrito no catálogo comercial do produto (Sigma Aldrich, 2014). Todos os espectros foram adquiridos à 25 °C.

Tabela 3. Parâmetros utilizados na construção das curvas de calibração para os métodos analíticos desenvolvidos no Brasil para quantificação de ftalocianina de cloro alumínio.

Solvente	Clorofórmio/etanol (1:1)	PBS/etanol (4:1)	Metanol puro
Variável resposta	Absorbância	Emissão de fluorescência	Emissão de fluorescência
Intervalo de concentração	0,47 – 2,34 µg mL ⁻¹	0,009 – 0,150 µg mL ⁻¹	0,50 – 4,50 ng mL ⁻¹
Abertura de fenda (nm)	N/A*	8	4

*N/A = não aplicável.

Todos os espectros de emissão de fluorescência foram adquiridos com comprimento de onda de excitação fixo igual a 610 nm, na faixa espectral de 630 a 730 nm, com uma velocidade de varredura de 1200 nm min⁻¹ e tempo de integração igual a 0,3 segundos.

A análise estatística de regressão ou ajuste por mínimos quadrados foi feita com todos os dados obtidos para calcular a equação da reta e o coeficiente de correlação (r). A adequação dos modelos foi avaliada por ANOVA unilateral e o teste de falta de ajuste (*Lack of Fit*), apresentando os valores de F e p, para nível de confiança de 95% e graus de liberdade n-1. Os cálculos estatísticos foram realizados empregando o programa *MINITAB Release* versão 14.1. Estes estudos foram empregados para determinar se o modelo linear explica adequadamente os resultados obtidos pela análise de regressão (GONZALEZ et al., 2006; A.M.C., 1994).

3.2.7.2 Limite de Detecção e Limite de Quantificação.

Os limites de detecção (LD) e limites de quantificação (LQ) da ClAlPc para os métodos desenvolvidos foram estimados a partir das curvas analíticas resultante do parâmetro da linearidade ou através da análise de um número apropriado de amostras do branco. Os LD e LQ foram calculados de acordo com as **Equações 4 e 5**, respectivamente (ANVISA, 2003; SIQUEIRA-MOURA et al., 2010):

$$LD = \frac{DP}{IC} \times 3,0 \quad \text{Equação 4}$$

$$LQ = \frac{DP}{IC} \times 10,0 \quad \text{Equação 5}$$

Onde, DP pode ser o desvio padrão do intercepto com relação ao eixo dos Y ou o desvio padrão obtido a partir da curva de calibração proveniente da análise de 10 amostras do branco, e IC é o valor da inclinação da curva analítica.

3.2.8 Doseamento de ftalocianina de cloro alumínio associada às NLS.

O conteúdo da ftalocianina, associada às NLS e livre na fase aquosa, foram determinados para cálculos da capacidade de carga e da eficiência de encapsulação dos sistemas em estudo. As curvas padrão de calibração foram construídas para a quantificação de ClAlPc conforme descrito no item 3.2.7.

3.2.8.1 Conteúdo total de CIAIPc em NLS.

Para determinação do conteúdo total do FS na amostra promoveu-se a solubilização das nanopartículas lipídicas sólidas em uma mistura de solventes composta por etanol e clorofórmio (na proporção 1:1, em volume), para extração de todo o conteúdo de CIAIPc presente na formulação, conforme método adaptado de BHALEKAR et al. (2015).

Uma alíquota de cada uma das formulações de NLS com diferentes concentrações teóricas de CIAIPc foi apropriadamente dissolvida em 3,0 mL da mistura de solventes de modo a obter-se uma concentração teórica final de 0,8 ug mL⁻¹. A seguir as amostras foram colocadas em banho de ultrassom modelo 1510 (*Branson*, EUA) de 40 kHz, por 15 min, para garantir a solubilização completa dos componentes das NLS e liberação do FS encapsulado para o meio orgânico. Em seguida, a solução foi analisada em um espectrofotômetro para quantificação total do ativo presente na formulação.

3.2.8.2 Eficiência de encapsulação (EE) de CIAIPc em NLS.

A fração livre da ftalocianina foi determinada pelo doseamento do ativo na fase aquosa separada da formulação, utilizando dispositivo de centrifugação do tipo *Microcon* YM-100 (*Millipore*, Irlanda), centrifugado a 12.857 x g por 1 hora, a 4 °C em uma centrífuga *Centrifuge* 5810 R com rotor FA-45-6-30 (*Eppendorf*, EUA) (SIQUEIRA-MOURA et al., 2013).

A **Equação 6** abaixo foi usada para calcular a eficiência de encapsulação.

$$EE (\%) = \frac{TPc - LPc}{TPct} \times 100 \quad \text{Equação 6}$$

Onde: TPc representa a concentração total de ftalocianina na formulação, LPc a concentração de ftalocianina não incorporada à NLS e TPct a concentração teórica de ftalocianina.

3.2.8.3 Capacidade de carga de CIAIPc nas NLS.

A capacidade de carga (do inglês: *drug loading*) de ftalocianina incorporada ao sistema coloidal foi determinada pela diferença entre o valor teórico (pesado) de CIAIPc adicionado na produção da formulação e o conteúdo total do FS quantificado na formulação, após sua obtenção conforme discutido por (SIQUEIRA-MOURA et al., 2013; DE CARVALHO et al., 2013). A **Equação 7** foi utilizada para o cálculo do *drug loading*, expresso em porcentagem.

$$drug\ loading (\%) = \frac{TPc}{TPct} \times 100 \quad \text{Equação 7}$$

Onde: T_{Pc} representa a concentração total de ftalocianina na formulação e T_{Pct} a concentração teórica de ftalocianina.

3.2.9 Estudos de estabilidade das formulações de NLS.

A avaliação da estabilidade de produtos farmacêuticos visa investigar quaisquer mudanças que possam influenciar sua qualidade, segurança e eficácia. Para todos os sistemas coloidais desenvolvidos foram realizados estudos de estabilidade de longa duração e acelerada por centrifugação com o equipamento *LUMiSizer*. A estabilidade das nanopartículas à 32 °C também foi avaliada, pois esta temperatura foi uma condição necessária para realização do estudo de permeação e retenção *in vitro* (item 3.2.10).

3.2.9.1 Estabilidade das NLS ao longo do tempo.

Por se tratar do desenvolvimento de sistemas coloidais lipídicos e com o intuito de prolongar ao máximo a vida-útil da formulação, todos os lotes foram acondicionados em frascos de vidros selados, armazenados em refrigerador com temperatura controlada a 4 ± 2 °C e protegidos da luz. Foi acompanhada a estabilidade física das NLS na presença e na ausência de CIAIPc durante 24 meses.

A estabilidade das NLS foi avaliada quanto às alterações macroscópicas: presença ou não de precipitado, mudança de coloração e/ou sinais de instabilidade por sedimentação, cremeação ou separação de fases. O tamanho médio de partículas, índice de polidispersão e potencial zeta foram também investigados, segundo o item 3.2.3.2.

3.2.9.2 Estabilidade acelerada das formulações de NLS.

A estabilidade acelerada das dispersões de NLS foi analisada com o equipamento *Dispersion Analyser LUMiSizer* 611 e os resultados foram obtidos através do software *SEPView* v.5.1, ambos da LUMGmbH (Alemanha). Este analisador de dispersões empregou a tecnologia *STEP*TM (do inglês: *Space and Time Resolved Extinction Profiles*) (**Figura 14**) e consistiu em um sistema óptico que trabalhou com um transmissor e um receptor de infravermelho próximo (do inglês: *near infrared* – NIR) capaz de registrar espectros de transmissão de NIR ao longo de um recipiente adequado, acoplado a um sistema de centrifugação que possibilitou o aumento da força gravitacional durante o registro de espectros de transmissão de NIR em função do tempo. Foi possível investigar fenômenos de migração de partículas e sinais de instabilidade,

com significativa redução no tempo de análise comparada à estabilidade ao longo do tempo, obtendo-se resultados precisos (CHIU et al., 2012; DETLOFF, SOBISCH e LERCHE, 2007).

Figura 14. Representação esquemática dos princípios da tecnologia STEP™ (*Space and Time Resolved Extinction Profiles*). (Adaptado de L.U.M.GmbH, 2010)

As amostras foram analisadas em sua concentração original. Medições foram feitas a 25 ± 2 °C e a cada 65 segundos, obtendo-se um perfil de transmissão de cada amostra no comprimento de onda de 880 nm, por um período de 4,6 h (rotação fixa de 3618 rpm). Foi utilizada uma cubeta adequada para o tipo de amostra com posição radial máxima de 129,5 mm.

Este estudo possibilita obter a previsão do tempo de vida de prateleira (do inglês: *shelf life*) das NLS, que corresponde ao período de tempo no qual é esperado que o produto farmacêutico mantenha suas especificações, se estocado corretamente. Para calcular o tempo de *shelf life*, utilizou-se a **Equação 8** (L.U.M.GmbH, 2010):

$$shelf\ life\ (segundos) = tm_{requerido} \times RCF \quad \text{Equação 8}$$

Onde, $tm_{requerido}$ é o tempo de duração do experimento, em segundos, e RCF (do inglês: *Relative Centrifugal Force*) é a força centrífuga relativa. Para converter o *shelf life* de segundos para meses, dividiu-se o tempo encontrado em segundos por 3.600 (1 h) x 24 (1 dia) x 30 (1 mês) (L.U.M.GmbH, 2010).

3.2.9.3 Estabilidade de ClAIPc-A-NLS acondicionada à 32 °C.

No estudo *in vitro* com células de difusão vertical do tipo Franz, o sistema foi mantido à 37 °C durante todo o período do experimento para simular a temperatura corporal, considerando

que a temperatura atingida na pele é de aproximadamente 32 °C (O.E.C.D., 2004a; O.E.C.D., 2004b; S.C.C.S, 2010). Neste estudo, a formulação de nanopartículas contendo a ftalocianina é depositada diretamente sobre a pele aquecida.

Com o intuito de avaliar a estabilidade física das nanopartículas, considerando que o sistema nanoparticulado possui propriedade intrínsecas (SEVERINO et al., 2013) de maior interesse nesse tipo de sistema, 3 lotes da formulação de CIAIPc-A-NLS, formulação utilizada no estudo com células de Franz, foram mantidos à 32 ± 1 °C com auxílio de um banho termostatizado e o tamanho médio e o índice de polidispersão dessas formulações foram monitorados durante 24 h, conforme descrito no item 3.2.3.2.

3.2.10 Estudo da permeação e retenção cutânea *in vitro* de CIAIPc encapsuladas em NLS.

Para determinação do perfil de permeação e retenção cutânea para a ftalocianina de cloro alumínio encapsulada nas NLS foi utilizado o modelo *in vitro* de células de difusão vertical do tipo Franz (**Figura 15**) com área difusional de 1,77 cm² e compartimento receptor com volume de 7,0 mL.

A solução receptora que preencheu a parte inferior de todas as células de Franz foi composta por tampão PBS (pH 7,40) contendo 20% (em volume) de etanol anidro, previamente degaseificado por sonicação em banho de ultrassom. A adição do etanol foi necessária, visto que CIAIPc tem caráter altamente hidrofóbico e não se mantém em sua forma monomérica em meio aquoso, resultando na aglomeração das moléculas que altera drasticamente as propriedades espectroscópicas e fotofísicas do fármaco fotossensibilizante (ÇAKIR et al., 2014; O.E.C.D., 2004a; PRIMO et al., 2008).

Figura 15. Representação esquemática da célula de difusão vertical do tipo Franz (adaptado de KARPANEN et al., 2008 e Centralx Atlas, 2015).

As células foram mantidas aquecidas através da recirculação de água, oriunda do banho termostatzado, pela jaqueta que envolve o meio receptor. O banho termostatzado foi mantido a $37 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$ para que a temperatura na superfície da pele corresponda à temperatura superficial da pele humana *in vivo* ($32 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$) (O.E.C.D., 2004a; O.E.C.D., 2004b; S.C.C.S, 2010)

O meio receptor foi mantido em agitação constante (300 rpm) em uma placa de agitação multiponto RO10 (Ika®, Alemanha) para manter a homogeneidade do meio (O.E.C.D., 2004a; O.E.C.D., 2004b; S.C.C.S, 2010).

O compartimento doador (superior) de cada célula de difusão recebeu uma alíquota de 300 μL da formulação CIAIPc-A-NLS, ou seja, aplicou-se uma quantidade em massa de 6,83 μg de CIAIPc para cada cm^2 da área de permeação da célula difusional.

Os compartimentos doador e receptor foram separados pela pele da orelha de porco, evitando a formação de bolhas, e presos por uma presilha. A pele utilizada no experimento teve o tecido subcutâneo cuidadosamente extraído com o auxílio de uma tesoura. O lado do estrato córneo (EC) ficou voltado para o compartimento doador e a derme ficou em contato com o meio receptor.

Para avaliação do perfil de permeação cutânea, foi montado um protocolo experimental no qual foram coletadas, manualmente, alíquotas de 1,0 mL da solução receptora com reposição imediata do mesmo volume de solução receptora nova, mantendo o volume do meio sempre constante, evitando assim a formação de bolhas entre a solução receptora e a pele. A primeira alíquota foi coletada imediatamente após a adição da formulação no meio doador, sendo considerado o tempo de 0 h. As amostras seguintes foram coletadas a cada 1 h, sendo a última

coleta realizada ao completar 6,5 h de teste. Essas alíquotas foram acondicionadas em microtubos e analisadas até no máximo 30 min após sua coleta.

Ao fim do experimento, a retenção cutânea de ClAlPc foi avaliada segundo método adaptado de CONSOLA et al. (2007) e TIOSSI et al. (2014), utilizando as técnicas de *tape stripping* e de homogeneização de tecidos, descritas a seguir.

As peles foram retiradas das células de Franz, a formulação remanescente foi removida com algodão embebido em água ultrapura e as superfícies das peles foram secas delicadamente com papel e fixadas em uma superfície lisa com o estrato córneo voltado para cima deixando apenas a área de permeação exposta.

Para avaliação da quantidade de ftalocianina retida no estrato córneo, essa camada da epiderme foi removida pela técnica de *tape stripping*, com aplicação de 18 fitas adesivas do tipo durex de 20 mm (Adere, Brasil). Cada fita foi aderida na região de permeação delimitada e retirada com camadas consecutivas do EC, sendo depositadas diretamente em um frasco com 5,0 mL de metanol puro. Ao fim, o frasco contendo as fitas e o solvente extrator foi agitado e deixado por 30 min em banho ultrassom.

Para avaliação da retenção do FS no restante da pele, compreendida pela derme e epiderme sem o estrato córneo, a mesma foi cortada em pequenos pedaços colocados em um frasco com 5,0 mL de metanol puro. Na sequência, o solvente extrator contendo a pele cortada foi homogeneizado com um homogeneizador ultra-turrax T8 (Ika®, Alemanha) por 5 min, a 10000 rpm, e colocados por 30 min em banho ultrassom.

Nos dois procedimentos para avaliação da retenção de ClAlPc na pele, os materiais tratados foram mantidos no solvente extrator por 12 h. Antes da análise de quantificação, o solvente extrator foi filtrado em membrana de 0,45 µm.

A quantificação do ativo permeado ou retido foi realizado por espectroscopia de emissão de fluorescência, conforme os métodos desenvolvidos no item 3.2.7. Os resultados foram expressos em quantidade de fármaco permeado ou retido levando-se em consideração a área do tecido exposta para aplicação.

3.2.11 Ensaios biológicos *in vitro*.

Com o intuito de avaliar a biocompatibilidade das nanopartículas lipídicas sólidas desenvolvidas neste trabalho, assim como a ação da ftalocianina encapsulada neste sistema

nanométrico e aplicada na terapia fotodinâmica, foram realizados os ensaios *in vitro* com células.

Duas linhagens celulares foram utilizadas nestes ensaios. Para avaliação da biocompatibilidade celular das formulações de NLS vazias foi utilizada a linhagem de fibroblastos NIH-3T3 – ATCC® CRL1658™ (EUA), derivados de células embrionárias de camundongos, com morfologia fusiforme e crescimento aderente em monocamadas, com o cultivo realizado em meio DMEM (KAMBA et al., 2014; RAMANATHAN et al., 2015; SINGARAVELU et al., 2015). Os ensaios de toxicidade e fototoxicidade (aplicação da TFD) com CIAIPc-NLS foram realizados empregando células de câncer de pele do tipo melanoma pigmentado B16-F10 – ATCC® CRL-6475™ (EUA), derivadas de tecido muscular de camundongo. Essas células apresentam crescimento aderente com morfologia fusiforme misturada com o formato de células epiteliais. Foi utilizado o meio de cultura RPMI-1640 para cultivo dessa linhagem (CASTAGNOS et al., 2014; DAVIDS e KLEEMANN, 2011; BOLFARINI et al., 2012; MONGE-FUENTES, MUEHLMANN e DE AZEVEDO, 2014).

A manipulação celular foi realizada em cabine de fluxo laminar vertical PA 400 (Pachane, Brasil) com radiação germicida ultravioleta. Todo o material utilizado foi previamente esterilizado, sendo a vidraria autoclavada em uma autoclave *Clear* 2001 (*Termotron*, Brasil) com ciclo à 120 °C, por 30 min, e o material plástico foi esterilizado com formaldeído, realizado junto ao setor de esterilização do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto – SP.

3.2.11.1 Cultivo e contagem das células.

Os procedimentos de cultivo e contagem, assim como o tempo utilizado na etapa de tratamento, foram os mesmos para ambas as linhagens celulares em estudo.

Para trabalhar com as células, os meios de cultura (DMEM ou RPMI-1640) tamponados com bicarbonato de sódio, com pH final de 7,2, foram suplementados com 10% de soro fetal bovino (SFB), além de penicilina (100 UI mL⁻¹), estreptomicina (100 µg mL⁻¹), anfotericina B (2,5 µg mL⁻¹) e aminoácidos não essenciais, sendo este último ausente no meio RPMI-1640.

As culturas celulares foram mantidas em incubadora *Forma Series II* 3130 (*Thermo Scientific*, EUA) monitorada por uma controladora digital a 37 °C, em atmosfera úmida com 5% de CO₂.

O cultivo das células foi feito em garrafas de cultura de 75 cm² contendo o respectivo meio de cultura para cada célula, suplementado com 10% de SFB, até atingirem confluência. Para a retirada da monocamada de células dos frascos, o meio presente na garrafa foi descartado, as células foram lavadas uma vez com PBS. Uma solução de tripsina-EDTA 0,25% foi adicionada às garrafas, que foram, em seguida, incubadas por 3 min na estufa para ação da tripsina. A ação da enzima foi interrompida por inativação com a adição de 4,0 mL do meio de cultura suplementado com 10% de SFB e a suspensão foi centrifugada a 200 x g, por 5 min.

Na etapa de contagem das células, o sobrenadante foi descartado, o *pellet* de células foi ressuspenso em meio de cultura e uma alíquota de 100 µL desta suspensão foi adicionada à 100 µL de azul de tripan 0,4% para contagem em câmara de Neubauer, sendo contadas apenas as células viáveis (não coradas em azul). A concentração de células presentes na suspensão foi calculada de acordo com a **Equação 9** (LEE, ROBINSON e WANG, 1981):

$$n^{\circ} \text{ de células/mL} = \frac{n^{\circ} \text{ total de células contadas}}{n^{\circ} \text{ de quadrantes}} \times \text{fator de diluição} \times 10^4 \quad \text{Equação 9}$$

O microscópio de alta resolução utilizado para contagem de células, assim como para avaliar crescimento/morte celular, foi o *Axiovert 40 CFL* (Carl Zeiss, Alemanha).

Após contagem e plaqueamento das células, as placas foram incubadas por 12 h em condição padrão de cultivo para permitir adesão e recobrimento celular da área dos poços de cultura. Em seguida, de acordo com cada experimento, as células foram tratadas com nanopartículas lipídicas sólidas ou com CIAIPc, livre e encapsulada na NLS, para avaliação da viabilidade celular, pelo ensaio com MTT, de cada linhagem como resposta aos tratamentos.

3.2.11.2 Etapa de tratamento das células NIH-3T3 no estudo de biocompatibilidade celular de NLS sem o fármaco.

O estudo de toxicidade *in vitro* é o primeiro teste a ser feito para avaliar a biocompatibilidade de qualquer material a ser utilizado como biomaterial, segundo a *International Organization for Standardization* (ISO 10993-5) (ISO, 2009). Comprovada sua biocompatibilidade, pode-se prosseguir para realização de experimentos com animais.

Este estudo teve como objetivo avaliar a biocompatibilidade por contato direto das NLS vazias com os fibroblastos NIH-3T3 (DAL PIZZOL, C., 2014), semeadas em placas de cultura de 96 poços em uma concentração de 3,5 x 10⁴ células/poço.

Na etapa de tratamento dos fibroblastos a formulação de NLS vazia foi diluída em meio DMEM (contendo 3% de SFB) nas concentrações de 0,1 a 50,0% (v/v). Como controle negativo

utilizou-se um conjunto de poços contendo células tratadas apenas com DMEM contendo 3% de SFB, sem adição das nanopartículas.

Após a adição dos meios de cultura, com ou sem formulação, para o tratamento das células, as placas foram re-incubadas por 3 h, correspondente ao tempo de tratamento utilizado na Terapia Fotodinâmica. Ao fim do período de incubação, todo o meio foi descartado, os poços foram lavados com tampão PBS e completados com DMEM com 10% de SFB. Após 24 h foi realizado o ensaio padrão de viabilidade celular com MTT, descrito no item 3.2.11.5.

De acordo com a ISO 10993-5 (ISO, 2009), resultados de viabilidade celular igual ou inferior a 70% configuram quadro de toxicidade celular. Além disso, para análise do resultado de biocompatibilidade celular foi considerada a análise estatística realizada conforme descrito no item 3.2.11.5.

3.2.11.3 Etapa de tratamento das células B16-F10 nos estudos de toxicidade de CIAIPc-NLS na ausência de luz.

A toxicidade da CIAIPc encapsulada nas nanopartículas foi avaliada na ausência de luz, antes da aplicação da TFD, utilizando as células neoplásicas melanocíticas B16-F10, semeadas na concentração de 5×10^4 células/poço em placas de cultura de 24 poços. Nesta etapa foi utilizado RPMI-1640 suplementado com 3% de SFB.

Este estudo foi realizado em duas etapas. Primeiro foram testadas duas concentrações diferentes do ativo encapsulado nas nanopartículas lipídicas sólidas. A análise da toxicidade de CIAIPc encapsulada foi realizada a partir do tratamento das células com as formulações CIAIPc-C-NLS e CIAIPc-G-NLS (**Tabela 1**). A diluição da dispersão coloidal em meio de cultura foi a mesma para ambas as formulações e foi pré-definida de acordo com os resultados do ensaio anterior (item 3.2.11.2). Cada diluição das duas formulações resultou em diferentes concentrações finais de CIAIPc ($0,31 \mu\text{g mL}^{-1}$ ou $0,54 \mu\text{M}$ de CIAIPc e $0,75 \mu\text{g mL}^{-1}$ ou $1,30 \mu\text{M}$ de CIAIPc). Todos os grupos experimentais utilizados nas duas etapas do tratamento das células estão descritos na **Tabela 4**.

Tabela 4. Esquema de tratamento dos grupos experimentais definidos para o estudo de toxicidade sobre linhagem de melanoma B16-F10, na ausência de luz, utilizando duas diferentes concentrações de ftalocianina de cloro alumínio (CIAIPc) encapsulada nas nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) e em sua forma livre, além dos controles negativo, positivo e do solvente etanol.

Grupos experimentais	Tratamento	Concentração final real de CIAIPc
Controle negativo	Meio de cultura	N/A*
Controle positivo	Meio de cultura + NLS vazia	N/A
CIAIPc encapsulada	Meio de cultura + CIAIPc-C-NLS**	0,31 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (0,54 μM)
	Meio de cultura + CIAIPc-G-NLS**	0,75 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (1,30 μM)
CIAIPc livre	Meio de cultura + CIAIPc em etanol puro	0,75 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (1,30 μM)
Controle do Etanol	Meio de cultura + etanol puro	N/A

*N/A = não aplicável.

Formulações de NLS com diferentes concentrações de CIAIPc, conforme indicado na **Tabela 1.

Na segunda etapa deste ensaio, a toxicidade do FS livre, em solução etanólica, foi avaliada na mesma concentração determinada, a partir dos resultados da primeira etapa, para o FS encapsulado. Da mesma forma, a toxicidade do solvente etanol foi testada em outro grupo de células. O controle positivo (tratamento com NLS vazia) foi avaliado nas duas etapas deste ensaio.

O intervalo de tempo de tratamento das células foi de 3 h (CASTAGNOS et al., 2014; BOLFARINI et al., 2012), considerando que este é o tempo de tratamento usual na Terapia Fotodinâmica. Ao fim desse período de incubação, todo o meio foi descartado, os poços foram lavados 1 vez com tampão PBS e completados com meio contendo 10% de SFB. O ensaio padrão de viabilidade celular com MTT (item 3.2.11.5) foi realizado após 24 h.

3.2.11.4 Etapa de tratamento das células B16-F10 nos estudos de fototoxicidade de CIAIPc-NLS: aplicação da TFD.

Foi utilizada a mesma linhagem de células neoplásicas descrita no item anterior, portanto, plaqueadas também da mesma forma. Após o tratamento dos grupos experimentais deste ensaio, algumas células foram irradiadas com diferentes doses de luz monocromática empregando um laser-diodo *Eagle* (Quantum Tech., Brasil) com feixe de excitação em 670 nm. Nesta etapa foi utilizado RPMI-1640 suplementado com 3% de SFB.

Na **Tabela 5** estão descritos os tratamentos utilizado para cada grupo experimental.

Tabela 5. Esquema de tratamento dos grupos experimentais definidos para o estudo de fototoxicidade sobre linhagem de melanoma B16-F10 utilizando ftalocianina de cloro alumínio (ClAlPc) encapsulada nas nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) e em sua forma livre, além dos controles negativo, positivo e do laser.

Grupos experimentais	Tratamento	Concentração final de ClAlPc
Controle negativo	Meio de cultura	N/A*
Controle laser	Meio de cultura	N/A
ClAlPc encapsulada	Meio de cultura + ClAlPc-G-NLS	0,75 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (~ 1,3 μM)
ClAlPc livre	Meio de cultura + ClAlPc em etanol puro	0,75 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (~ 1,3 μM)

*N/A = não aplicável.

O grupo experimental de maior interesse consistiu no tratamento da B16-F10 com diluição da formulação ClAlPc-G-NLS, correspondente à maior concentração de ClAlPc não tóxica, definida com base nos ensaios de toxicidade na ausência do estímulo luminoso (item anterior). As células do grupo tratado com o FS livre foram expostas à mesma concentração de ClAlPc utilizada para o FS encapsulado. Neste estudo foi introduzido um grupo chamado de controle do laser, cujas células foram tratadas da mesma forma que as do controle negativo, para avaliar a influência da exposição das células à maior dose de luz utilizada.

Ao fim das 3 h de tratamento, o meio foi descartado e as células cuidadosamente lavadas uma vez com PBS para retirada de quaisquer traços do FS. Adicionou-se então 0,5 mL do meio de cultura RPMI-1640 sem o corante vermelho de fenol para a aplicação da TFD.

Os grupos tratados com ClAlPc livre ou encapsulada tiveram efetiva aplicação da terapia fotodinâmica. As células foram irradiadas operando em uma potência de 0,30 mW (irradiância de 17 mW cm⁻²) com tempos de irradiação ajustados de maneira a obter densidades de energias de 0,5, 1,0 e 2,0 J cm⁻². O grupo controle do laser foi irradiado com a maior dose de luz (2,0 J cm⁻²) e o controle negativo não foi irradiado.

Todos os grupos tiveram então o meio substituído por RPMI-1640 com 10% de SFB. Após 24 h foi realizado o ensaio de viabilidade celular com MTT (item 3.2.11.5).

3.2.11.5 Estudo de viabilidade celular por MTT.

Os ensaios de viabilidade celular pelo método de redução do corante brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolio (MTT) foram realizados conforme protocolos já bem consolidados e utilizados em outros estudos (DENIZOT e LANG, 1986; TWENTYMAN e LUSCOMBE, 1987; MUEHLMANN et al., 2015; DOKTOROVOVA, SOUTO e SILVA, 2014).

Este ensaio baseia-se na capacidade que as mitocôndrias possuem de captar e reduzir o sal tetrazólio MTT, com uso da enzima succinato-desidrogenase, em um produto de coloração roxa (formazam), o qual é insolúvel em meio aquoso. Esta conversão é realizada pelas células que ainda possuem atividade mitocondrial e, portanto, estão viáveis.

Após 24 h da etapa de tratamento das células adicionou-se uma alíquota da solução de MTT 16% diluída ($5,0 \text{ mg mL}^{-1}$) em meio de cultura adequado, sem o corante vermelho de fenol, e as células foram re-incubadas por 4 h. Em seguida, o meio contendo MTT foi substituído por uma alíquota de 2-propanol (0,10 mL nas placas de 96 poços e 0,5 mL nas placas de 24 poços) para solubilizar o produto formazam obtido. Os poços foram analisados com leituras espectrofotométricas realizadas em 570 e 690 nm, sendo o último utilizado como referência, em um leitor de placas *Safire 2* (TECAN Group, Áustria) (SIQUEIRA-MOURA et al., 2013).

Os resultados foram apresentados como média dos experimentos em triplicata $\pm$ desvio padrão, com análise estatística ANOVA unilateral, seguida do pós-teste de *Dunnnett* ($p < 0,05$) para o estudo de biocompatibilidade e o pós-teste de *Tukey* ($p < 0,05$) para os demais ensaios, utilizando o software *Prism®* (Versão 5.0). Foi obtido um gráfico da porcentagem de viabilidade celular, calculada segundo a **Equação 10** (ISO, 2009) e o controle negativo foi considerado como 100% de células viáveis.

$$\text{Células viáveis (\%)} = \left(\frac{\text{Absorbância amostra}}{\text{Absorbância controle negativo}} \right) \times 100 \quad \text{Equação 10}$$

3.3 MÉTODOS UTILIZADOS PARA VESÍCULAS CATANIÔNICAS

No fluxograma da **Figura 16** estão ilustrados todos os métodos utilizados no estudo com as vesículas cataniônicas, descritos detalhadamente a seguir.

Figura 16. Fluxograma dos métodos utilizados para desenvolvimento e caracterização das vesículas cataniônicas.

3.3.1 Preparo das formulações vesículas cataniônicas.

As formulações de vesículas cataniônicas foram preparadas pela adição do pó liofilizado do tensoativo cataniônico tricatenário (TriCat) 12 em água ultrapura, de modo a se obter uma solução de concentração final de 1×10^{-4} M de TriCat 12. As vesículas se formam espontaneamente em água (BOUDIER et al., 2011; CASTAGNOS et al., 2014; CONSOLA et al., 2007; SOUSSAN et al., 2008), mas, para auxiliar o processo de associação do tensoativo em agregados supramoleculares, a amostra foi sonicada com um sonicador *Vibra Cell* 72441 (*Bioblock Scientific*, EUA) com uma sonda de titânio de 1 cm de diâmetro por 15 min (amplitude de 30%, *pulse on* 0,3 e *pulse off* 0,7) (CASTAGNOS, P., 2011).

No caso do preparo das vesículas cataniônicas contendo o FS de interesse (VesCat/CIAIPc) em uma concentração teórica final de $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ de CIAIPc, uma solução-estoque do ativo foi previamente preparada em acetona, com concentração de $80 \mu\text{g mL}^{-1}$. Essa solução-estoque foi

diluída a 6,25% (v/v) em água ultrapura. As VesCat/ClAlPc foram, então, obtidas pela adição do pó liofilizado de TriCat 12 à essa solução de ClAlPc em acetona e água (6,25:93,65, v/v), com posterior sonicação nas mesmas condições utilizadas para a produção das VesCat sem o FS. A encapsulação do ativo ocorre nas lamelas das vesículas, simultaneamente à sua formação (CASTAGNOS, P., 2011).

A etapa seguinte de remoção da acetona da formulação, utilizando o evaporador à pressão reduzida R-200 (*Buchi*, Alemanha), foi aprimorada a partir do procedimento descrito por CASTAGNOS et al. (2014), no qual a amostra deve ser evaporada por 30 min, sob pressão de 50 mBar e à 40 °C. Os parâmetros como o período de tempo e a pressão, utilizados no processo originalmente desenvolvido, foram redefinidos experimentalmente no intervalo de tempo de 5 a 30 min e com aumento da pressão de 50 para 100 mBar.

3.3.1.1 Caracterização das vesículas cataniônicas.

O tamanho médio, representado por *Z-Average*, o índice de polidispersão (PdI) e o potencial zeta, representado pela mobilidade eletroforética, das dispersões foram determinados por espectroscopia de correlação de fótons (PCS), conforme descrito no item 3.2.3.2, utilizando um Zetasizer Nano ZS ZEN3600 (*Malvern Instruments*, Reino Unido) com laser He-Ne e ângulo de varredura fixo a 173°.

Todas as amostras de vesículas cataniônicas foram feitas em triplicata, a 25 °C e analisadas sem necessidade de diluição prévia das formulações.

Os resultados foram apresentados como valor médio da triplicata $\pm$ desvio padrão, com análise estatística ANOVA unilateral e pós-teste de *Tukey* ($p < 0,5$).

3.3.2 Efeito da adição de glicerol nas formulações de VesCat.

Na avaliação morfológica proposta para esse sistema por microscopia eletrônica de varredura utilizando a técnica de crio-fratura, as nanovesículas são submetidas à queda brusca de temperatura com uso de nitrogênio líquido para congelamento das amostras e este congelamento súbito pode acarretar na agregação ou rompimento das nanoestruturas (HEURTAULT et al., 2003; MEHNERT e MADER, 2001).

Para manter a integridade e preservar as VesCat, o glicerol foi usado como crioprotetor e testado em diferentes concentrações (2, 5, 7, 10%, m/m) para avaliar a interferência deste no

tamanho médio e polidispersão da formulação (LEE e NAM, 2015; NIGHSWANDER-REMPEL et al., 2005).

Os parâmetros do tamanho médio e índice de polidispersão foram avaliados segundo os parâmetros descritos no item 3.3.1.1, imediatamente após a produção das vesículas com o crioprotetor em diferentes porcentagens na formulação e após 24 h. Os resultados obtidos foram avaliados estatisticamente por ANOVA bilateral, seguida do pós-teste de *Bonferroni* ($p < 0,05$), para a escolha da melhor concentração de glicerol a ser adicionado na formulação sem alterações significativas dos parâmetros avaliados.

3.3.3 Avaliação morfológica das vesículas cataniônicas.

A análise da morfologia das VesCat, contendo ou não o FS, foi feita por microscopia eletrônica de varredura (MEV) no microscópio *Quanta 250 FEG* (FEI Company, Holanda), utilizando a técnica de crio-fratura, na *Plateforme Imagerie* da *Toulouse Réseau Imagerie* (TRI) do *L'Institut National de la Recherche Agronomique (INRA)*, Toulouse (França).

Esta técnica apresenta alta resolução e permite obtenção de imagens com aparência tridimensional, além de permitir o exame em pequenos aumentos com excelente profundidade de foco (Dedavid; Gomes; Machado, 2007).

Foram analisadas amostras de vesículas cataniônicas com e sem o crioprotetor glicerol, na proporção definida a partir do estudo no item anterior. No preparo das amostras para execução da análise, 20,0 μ L de cada formulação foram diluídos em 1,0 mL de água ultrapura, seguida de homogeneização. À temperatura ambiente, uma alíquota dessa diluição foi depositada sobre uma grade de cobre e o excesso secado com um papel para deixar um filme fino da amostra no suporte. As amostras foram então congeladas por imersão em nitrogênio líquido e recobertas com uma fina camada de ouro. Fraturadas foram realizadas na superfície para observação por MEV, usando uma voltagem de 5 kV.

3.3.4 Desenvolvimento de métodos analíticos espectrofluorimétricos para quantificação de ClAlPc.

Da mesma forma que a ftalocianina de cloro alumínio teve que ser quantificada em alguns estudos com as nanopartículas lipídicas sólidas, também houve a necessidade da quantificação da molécula fotoativa em ensaios com as vesículas cataniônicas. Portanto, métodos analíticos

adequados também foram desenvolvidos no laboratório IMRCP, em Toulouse (França), para possibilitar as quantificações necessárias de CIAIPc.

O desenvolvimento dos métodos foi feito com construção de curvas de calibração baseadas nos espectros de emissão de fluorescência obtidos com o espectrofluorímetro *Spectrofluorimeter PTI®* (Photon Technology International, EUA), para determinar a linearidade, bem como os limites de detecção e quantificação do FS, em diferentes solventes.

O método para quantificação de CIAIPc nas formulações de VesCat (item 3.3.5.1) utilizou a mistura de solventes metanol e água (proporção 9:1, v/v), uma vez que foi utilizada essa proporção da formulação de VesCat/CIAIPc (meio aquoso) em metanol puro, utilizado para solubilizar as vesículas e o FS.

Para o estudo *in vitro* de difusão com células de Franz (item 3.3.7) a permeação da ftalocianina através da pele foi investigada no meio receptor composto pela mistura PBS e etanol (proporção 1:1, v/v) e a retenção do ativo na pele foi avaliada utilizando o metanol puro para sua extração. O método analítico obtido utilizando metanol puro como solvente também foi utilizado para quantificar a ftalocianina livre na fase aquosa para cálculo da eficiência de encapsulação (item 3.3.5.2).

3.3.4.1 Linearidade

As linearidades de cada método foram estabelecidas, como descrito no item 3.2.7.1, com a construção de pelo menos 5 curvas analíticas contendo o mínimo de 5 diferentes níveis de concentração de CIAIPc (ANVISA, 2003; SIQUEIRA-MOURA et al., 2010).

Os parâmetros utilizados para a construção das curvas de calibração estão descritos na **Tabela 6**. Os espectros de emissão de fluorescência foram obtidos à 25 °C, adquiridos com comprimento de onda de emissão fixo a 610 nm, no intervalo de 630 a 730 nm, com velocidade de varredura de 1200 nm min⁻¹ e integração em 0,3 segundos. As amostras foram preparadas diretamente em cubeta de quartzo de 10 mm de caminho óptico, a partir de uma solução estoque de CIAIPc em DMSO.

Tabela 6. Parâmetros utilizados na construção das curvas de calibração para os métodos analíticos desenvolvidos para quantificação de ftalocianina de cloro alumínio por espectroscopia de emissão de fluorescência no trabalho com vesículas cataniônicas.

Solvente	Intervalo de concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Abertura de fenda (nm)	Pico máximo de emissão de fluorescência
Metanol/água (1:1)	0,05-0,55	2	678 nm
PBS/etanol (1:1)	0,009-0,115	4 e 2	679 nm
Metanol puro	0,05-0,45	2	674 nm

Os resultados obtidos foram submetidos à análise estatística de regressão linear para se obter a equação da reta e o coeficiente de correlação (r). Em seguida, foi realizada a análise de variância unilateral e o teste da falta de ajuste com intervalo de confiança de 95% e graus de liberdade $n-1$, utilizando como parâmetros de avaliação os valores de F e p para análise da adequação do modelo linear. O programa *MINITAB Release 14.1* foi utilizado para os cálculos estatísticos (A.M.C., 1994; GONZALEZ et al., 2006; SIQUEIRA-MOURA et al., 2010).

3.3.4.2 Cálculo dos limites de Detecção e de Quantificação de ClAlPc.

Os limites de detecção e de quantificação da ClAlPc foram calculados para cada método desenvolvido, a partir das linearidades obtidas no item anterior, utilizando as **Equações 4 e 5**, descritas no item 3.2.7.2.

3.3.5 Doseamento de ClAlPc associado às VesCat.

Todas as quantificações de ClAlPc realizadas nesse item utilizaram os resultados das curvas-padrão obtidas nos métodos analíticos desenvolvidos no item 3.3.4.

3.3.5.1 Conteúdo total de ClAlPc presente nas VesCat.

A quantificação da incorporação do FS ao sistema de VesCat foi calculado a partir da curva analítica na mistura de metanol e água (9:1, v/v). Isto porque no preparo da amostra a ser analisada, uma alíquota de 200 μL da formulação de VesCat/ClAlPc foi completamente dissolvida em metanol para um volume final de 2,0 mL (CASTAGNOS et al., 2014).

Este parâmetro fornece a quantidade real do ativo que foi incorporado às nanovesículas, considerando qualquer perda ocorrida durante o procedimento de preparo. Quando este valor é comparado à quantidade inicial de ftalocianina adicionada no preparo das VesCat, obtém-se o

valor do *drug loading* (**Equação 7**, item 3.2.8.3), que corresponde à capacidade de carga de ftalocianina no sistema de veiculação.

3.3.5.2 Eficiência de encapsulação (EE) de CIAIPc nas VesCat.

A determinação da eficiência de encapsulação do ativo nas vesículas cataniônicas foi feito por quantificação do FS não encapsulado presente na fração aquosa da formulação, obtida pela centrifugação de uma alíquota de VesCat/CIAIPc a 12.857 x g, por 1 hora, à 4 °C (SIQUEIRA-MOURA et al., 2013). Foram utilizados filtros de centrifugação do tipo *Microcon* YM-100 (*Millipore*, Irlanda) e uma centrífuga para microtubos *MiniSpin*® (*Eppendorf*, EUA), com rotor para 12 microtubos de 1,5-2,0 mL. Os cálculos da eficiência de encapsulação do FS nas VesCat foram feitos utilizando a **Equação 7** (item 3.2.8.3).

3.3.6 Avaliação da estabilidade das VesCat/CIAIPc acondicionadas à 32 °C.

A estabilidade das suspensões de VesCat/CIAIPc acondicionadas à 32 °C foi monitorada visando investigar a ocorrência de alterações significativas em seus parâmetros, visto que durante os estudos *in vitro* com células de Franz essa é a temperatura alcançada na pele que fica diretamente em contato com as nanovesículas.

As formulações foram monitoradas à 4 °C (mantida em refrigerador), à 25°C (simulando acondicionamento à temperatura ambiente) e à 37 °C (para simular a temperatura corporal). Nos dois últimos casos, as amostras mantidas em banho termostatzado *Thermomix* BM 18 BU (*Braun. Biotech Internacional*, Alemanha), com temperatura controlada.

Durante 48 h foram avaliados o tamanho médio e a polidispersão das partículas, conforme item 3.3.1.1. Os resultados foram tratados com ANOVA bilateral, seguida do pós-teste de *Bonferroni* ($p < 0,05$), comparando com as amostras acondicionadas à 4 °C, temperatura de estocagem das VesCat.

3.3.7 Estudo da permeação e retenção cutânea *in vitro* de CIAIPc veiculada nas VesCat.

O estudo de permeação e retenção da ftalocianina encapsulada nas vesículas cataniônicas foi realizado utilizando o mesmo sistema de células de difusão vertical do tipo Franz do estudo realizado com as NLS, descrito no item 3.2.10.

Pelo fato de que as vesículas cataniônicas apresentarem baixa concentração de ClAlPc ($2,36 \mu\text{g mL}^{-1}$) quando comparadas com as NLS desenvolvidas neste estudo, foi adicionada uma alíquota de 1,0 mL de VesCat/ClAlPc no meio doador, resultando na aplicação de $1,33 \mu\text{g cm}^{-2}$ de ClAlPc.

A solução receptora utilizada nas células de Franz deste estudo foi composta pela mistura de PBS e etanol (1:1, v/v), conforme descrito por CONSOLA et al. (2007).

O tempo total do experimento foi de 8 h e as coletas da solução receptora foram feitas nos tempos 0, 4 e 8 h, com reposição do mesmo volume amostrado com meio receptor novo.

Ao fim do experimento, a pele foi tratada com a retirada do estrato córneo por *tape stripping* e homogeneização da derme e epiderme viável, utilizando o homogeneizador ultra-turrax T25 Basic (Ika®, Alemanha), como em item 3.2.10. Nos dois casos, foram utilizados 3 mL de metanol puro como solvente extrator, deixados em ultrassom e *overnight* (12 h).

A quantificação de ClAlPc, tanto no meio receptor para avaliar a permeação, quanto no solvente extrator para análise da retenção do FS na pele, utilizaram os métodos espectrofluorimétricos desenvolvidos no item 3.3.4.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 PARA AS NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS.

4.1.1 Estudo de formulação com base no de diagrama de fases

Para se obter sistemas nanoestruturados na forma de dispersões com tamanho de partículas reduzido, a composição da formulação, o tipo e a concentração dos lipídios e tensoativos, são fundamentais para determinar o tamanho, a polidispersão e estabilidade das partículas (ANTON, BENOIT e SAULNIER, 2008; HOU et al., 2003; KUMAR e RANDHAWA, 2013).

A escolha dos lipídios sólidos para compor as nanopartículas lipídicas sólidas foi feita entre os lipídios mais citados na literatura para produção dessas partículas (DOKTOROVOVA, SOUTO e SILVA, 2014; LI et al., 2011; MEHNERT e MADER, 2001; SWATHI et al., 2012) a serem utilizadas em estudos *in vitro* administrados por diferente vias, como oral (DAS e CHAUDHURY, 2010; TRAN et al., 2014; SILVA et al., 2012a; SEVERINO et al., 2012), tópica (MÜLLER, RADTKE e WISSING, 2002; PARDEIKE, HOMMOSS e MULLER, 2009; KAKADIA e CONWAY, 2014), parenteral (WISSING, KAYSER e MÜLLER, 2004) ou por inalação (SCALIA et al., 2012). Por isso foram escolhidos o compritol e o ácido esteárico para desenvolver os estudos que permitiram a construção dos diagramas ternários.

O principal papel dos tensoativos é estabilizar as nanopartículas durante a produção e estocagem, prevenindo o aumento do tamanho por agregação (KUMAR e RANDHAWA, 2013). Segundo (MEHNERT e MADER, 2001), formulações de NLS que utilizam uma combinação de tensoativos resultam em partículas de tamanho menores, com redução do processo de aglomeração de partículas altamente eficiente, proporcionando assim maior estabilidade, quando comparadas às formulações que utilizam apenas um tensoativo.

A escolha dos tensoativos também foi influenciada pelo método utilizado para produção das NLS. Conforme descrito por ANTON et al. (2007) a inversão de fases não ocorre com qualquer tensoativo, é necessário que os mesmos possuam grupos de óxido de etileno em sua estrutura que viabilizem a indução da inversão de fases devido à inversão da curvatura dos mesmos. Os tensoativos à base de óleo de rícino hidrogenado 40-OE e o isoestearato de sorbitano foram escolhidos a partir dos resultados dos trabalhos de GOTO, P. L. (2011), considerando-se as características físico-químicas intrínsecas dos mesmos para viabilizar a inversão de fases,

visando a estabilidade da dispersão coloidal final. A proporção de cada um na mistura (67% e 33%, respectivamente) foi definida a partir dos cálculos de EHL para obtenção de $EHL_{final} = 11$.

Todos esses excipientes escolhidos para a produção das NLS são reconhecidos como seguro, com status GRAS (U.S. Food and Drug Administration, 2016) ou já são utilizados em produtos farmacêuticos/cosméticos, diminuindo os riscos de toxicidade aguda ou crônica associada.

Definidos todos os componentes a serem utilizados para se obter as NLS, o emprego do diagrama ternário desempenhou um papel fundamental para análise dos sistemas dispersos formados com os mesmos componentes lipídio/tensoativo/água, porém, em diferentes proporções. Na **Figura 16** apenas a região dos diagramas de fases que abrange os pontos de interesse nesse estudo está representada. A avaliação macroscópica das dispersões obtidas para cada lipídio sólido foi realizada 24 h após a obtenção das mesmas e está representada por símbolos na **Figura 17**.

Figura 17. Representação esquemática do diagrama de fases utilizando como lipídio sólido (a) compritol ou (b) ácido esteárico, com as características macroscópicas das dispersões obtidas identificadas por símbolos, sendo: (▲) creme (✕) líquido translúcido azulado, (⊗) líquido opaco (◇) sólido perolizado e (○) separação de fases.

Na avaliação macroscópica das dispersões com compritol, observou-se que as formulações com maior quantidade de lipídio (20%, m/m) e/ou com proporção de lipídio superior à de tensoativos apresentaram alta viscosidade e aspecto cremoso, característica de macropartículas, impossibilitando a caracterização por extrapolar os limites pré-definidos pelo Zetasizer. As demais dispersões (Co35, Co36, Co38, Co39, Co40) com até 10% (m/m) de compritol e/ou porcentagem de lipídio igual ou inferior à de tensoativos apresentaram alta fluidez,

característica de estruturas nanométricas (LIPPACHER, MÜLLER e MÄDER, 2001; NEGI, JAGGI e TALEGAONKAR, 2014).

Ao avaliar os oito pontos do diagrama ternário obtidos com SA, cinco dispersões foram excluídas dos estudos futuros pois apresentaram-se no estado sólido (SA27, SA28, SA35), com aspecto de creme (SA39) ou ocorreu separação de fases (SA37). Apenas as formulações com mesma proporção de lipídio e tensoativos resultaram em preparações líquidas, opacas e com brilho perolado peculiar.

Os estudos com os diagramas ternários confirmaram o papel que os componentes da formulação desempenham nas características dos sistemas obtidos. As formulações produzidas pelo mesmo método e com os mesmos componentes, segundo dados do diagrama ternário com compritol, indicaram que algumas dispersões com alta fluidez e outras com elevada viscosidade quando a proporção entre tensoativo/lipídio/água foi alterada. Por outro lado, quando foi mantida a mesma proporção entre os três componentes, alterando o tipo de lipídio utilizado (por exemplo, um mesmo ponto do diagrama de fases correspondente para Co e SA) foi observado que o estado físico dos sistemas dispersos foi completamente diferente (Co35 e SA35).

Após análise das características macroscópicas de todas as dispersões produzidas nos estudos com diagramas de fases, uma investigação criteriosa das características físico-químicas das formulações foi realizada. As amostras com Co ou SA no estado líquido foram avaliadas por espectroscopia de correlação de fótons (PCS) e as médias dos resultados de diâmetro, índice de polidispersão e potencial zeta encontram-se na **Tabela 7**.

O tamanho médio de partícula fornecido pela técnica de PCS corresponde ao diâmetro hidrodinâmico obtido pela flutuação da intensidade do espalhamento de luz causado pelo movimento browniano das partículas em suspensão e permite a caracterização precisa das principais populações de partículas com tamanhos situados entre 0,3 nm e 10 µm (JENNING, LIPPACHER e GOHLA, 2002; DAS e CHAUDHURY, 2010; Malvern Instruments Ltd, 2004; MÜLLER, MÄDER e GOHLA, 2000).

Tabela 7. Valores médios do diâmetro (*z-average*), índice de polidispersão e potencial zeta das formulações líquidas obtidas a partir dos diagramas de fases, com análise estatística ANOVA unilateral, seguida do pós-teste de *Tukey* ($p < 0,05$). Média da triplicata $\pm$ desvio padrão.

Lipídio Sólido	Formulação ^a	% lipídio	% tensoativo	Diâmetro médio (nm)	Índice de polidispersão	Potencial zeta (mV)
Compritol	Co35	10,0	20,0	124,6 ($\pm$ 33,0)	0,399 ($\pm$ 0,045)	-30,2 ($\pm$ 2,8)
	Co36	10,0	10,0	136,7 ($\pm$ 14,4)	0,192 ($\pm$ 0,012)**	-31,4 ($\pm$ 2,4)
	Co38	7,5	7,5	166,4 ($\pm$ 15,8)	0,244 ($\pm$ 0,039)	-31,5 ($\pm$ 0,5)
	Co39	5,0	10,0	84,9 ($\pm$ 13,5)*	0,367 ($\pm$ 0,049)	-30,9 ($\pm$ 1,6)
	Co40	5,0	5,0	178,8 ($\pm$ 35,7)	0,292 ($\pm$ 0,049)	-33,0 ($\pm$ 2,8)
Ácido esteárico	SA36	10,0	10,0	1002,0 ($\pm$ 45,0)	0,376 ($\pm$ 0,014)	-37,5 ($\pm$ 1,8)
	SA38	7,5	7,5	2572,0 ($\pm$ 500,7)	0,790 ($\pm$ 0,175)	-46,7 ($\pm$ 6,5)
	SA40	5,0	5,0	1602,1 ($\pm$ 500,9)	0,506 ($\pm$ 0,119)	-42,1 ($\pm$ 2,7)

^a “Co” é compritol, “SA” é ácido esteárico e o número corresponde ao ponto do diagrama de fases

* Indica que houve diferença significativa com Co40 e Co38 ($p < 0,05$)

** Indica que houve diferença significativa com Co35 e Co398 ($p < 0,05$)

As dispersões líquidas obtidas com o ácido esteárico apresentaram tamanho entre 1002,0 e 2572,0 nm, ou seja, acima do requerido para o sistema nanoestruturado em desenvolvimento, considerando que NLS possuem tamanho entre 50 e 1000 nm (VITORINO et al., 2011; MÜLLER, MÄDER e GOHLA, 2000). A partir das análises macroscópicas e por PCS, pode-se constatar que o ácido esteárico aliado à mistura de tensoativos pré-definida utilizados nas proporções testadas do diagrama não possibilitou a obtenção de nanoestruturas e foi descartado dos estudos futuros para produção das NLS. Os outros dados obtidos (PdI e potencial zeta) não foram discutidos.

As formulações no estado líquido obtidas com compritol apresentaram diâmetro médio entre 84,9 e 178,8 nm, confirmando, assim, a capacidade do método de produzir sistemas nanométricos. Vale a pena destacar que as dispersões com menor tamanho de partículas (Co35 e Co39) são as que possuem proporção de tensoativos superior à de lipídio, confirmando o papel dos tensoativos na redução do tamanho das partículas (DAS e CHAUDHURY, 2010; KUMAR e RANDHAWA, 2013). Apenas a formulação Co39 (com o menor tamanho) teve diferença significativa quando comparada com as duas dispersões de maior tamanho Co38 ($p < 0,05$) e Co40 ($p < 0,01$). Sabe-se que as vantagens das nanopartículas estão relacionadas, principalmente, com as alterações das propriedades físico-químicas resultantes desses sistemas em nanoescala (menores que 1 μ m), lembrando que o tamanho médio desejável para as NLS é de 150 a 300 nm e que partículas com tamanho abaixo de 100 nm podem ser internalizadas por todas as células do nosso organismo, aumentando a chance de efeitos colaterais e seu potencial

tóxico (KECK e MÜLLER, 2013; MÜLLER, SHEGOKAR e CORNELIA, 2011). Portanto, essas informações devem ser consideradas na escolha da composição final das NLS.

O índice de polidispersão (PdI) é um parâmetro importante para avaliar o aspecto de homogeneidade da formulação baseada na distribuição de tamanho das nanopartículas. A obtenção de NLS possuem muitas variáveis, já citadas, que podem alterar o tamanho das partículas, por exemplo: tipo e concentração de lipídio sólido e tensoativos utilizados, proporção de fase aquosa e oleosa e método utilizado na preparação. Por esse motivo, valores de PdI abaixo de 0,3 são considerados ótimos (DAS et al., 2011).

Os valores médios de PdI estão na faixa de 0,192-0,399, confirmando que o método produz formulações com baixa polidispersidade. É importante ressaltar que somente as formulações com lipídio e tensoativos na proporção de 1:1 apresentaram valores de $PdI \leq 0,3$, sugerindo que essa razão tensoativo/lipídio é mais eficiente para estabilização das gotículas de óleo durante a produção das NLS. A formulação com menor PdI (Co36) é significativamente menor quando comparada às duas formulações com maior polidispersão (Co35 e Co39, $p < 0,05$).

O potencial zeta é o potencial do plano de cisalhamento da partícula e sua análise pode prever a estabilidade física de sistemas coloidais durante estocagem. É influenciado pela adsorção de espécies iônicas presentes no meio aquoso ou por alteração na ionização dos grupos funcionais presentes na superfície da partícula (ATTWOOD e FLORENCE, 2003). Valores elevados de potencial zeta (negativo ou positivo) possuem menor chance de se agregarem devido à repulsão elétrica. Em casos de valores baixos de potencial zeta, as interações de London sobrepõem as forças repulsivas e as partículas não se repelem, facilitando a formação de agregados e resultando em sinais de instabilidade, como coagulação ou floculação (ROLAND et al., 2003; MÜLLER, MÄDER e GOHLA, 2000). Acredita-se que partículas com potencial zeta com valor, em módulo, superior a 30 mV apresentam estabilidade garantida (FREITAS e MULLER, 1999; SCHWARZ et al., 1994; DAS e CHAUDHURY, 2010). Porém, nem todas as dispersões coloidais seguem essa regra, pois a presença de estabilizantes estéricos podem causar redução do potencial zeta devido ao deslocamento do plano hidrodinâmico de cisalhamento da partícula e, por isso, valores um pouco mais baixos que $|30|$ mV podem ser suficientes para estabilizar as NLS (HEURTAULT et al., 2003; DAS et al., 2011; MÜLLER, MÄDER e GOHLA, 2000). Os valores de potencial zeta das dispersões com compritol ficaram entre $-30,2$ e $-33,0$ mV, sem diferenças significativas ($p = 0,6166$). Somada ao potencial elétrico negativo, existe também a estabilização por impedimento estérico dos grupos de óxido de etileno do tensoativo hidrofílico,

aumentando a estabilidade da formulação (KUMAR e RANDHAWA, 2013; SWATHI et al., 2012).

O estudo com diagramas ternário lipídio/tensoativos/água revelou a influência do tipo de lipídio sólido utilizado para um mesmo par de tensoativos e possibilitou a obtenção de dispersões com diferentes características utilizando os mesmos componentes em proporções diferentes.

Para dar continuidade aos demais estudos, após avaliação das formulações viáveis e dos parâmetros analisados, a formulação de trabalho escolhida foi a Co36, com características físico-químicas adequadas de dispersões coloidais, como tamanho reduzido (~ 136,7 nm), baixo índice de polidispersão (~ 0,192) e elevado valor de potencial zeta (~ -31,4 mV) capaz de estabilizar o sistema nanoparticulado. Além desses ótimos parâmetros, a formulação é composta por 10% (m/m) de lipídio, que favorece uma maior incorporação do ativo hidrofóbico. Essa formulação passou a ser chamada simplesmente de NLS vazia.

4.1.2 Caracterização físico-química das NLS.

A partir do estudo com diagrama de fases, que propiciou a escolha do lipídio sólido e a proporção entre lipídio/tensoativos/água, a composição das NLS padrão que foram utilizadas nos demais estudos foi definida como % (m/m):

Compritol	10,0%
Isoestearato de sorbitano	3,3%
Óleo de rícino hidrogenado 40-OE	6,7%
Água ultrapura	80,0%

Essa formulação também foi avaliada quanto ao processo de incorporação de ClAlPc em diferentes concentrações teóricas (**Tabela 1** do item 3.2.1), visando, como proposto no trabalho, empregar formulações de nanopartículas lipídicas sólidas contendo a ftalocianina de cloro alumínio para aplicação da TFD. Os valores médios do diâmetro hidrodinâmico, o PDI e o potencial zeta das suspensões de NLS contendo o FS estão ilustrados na **Tabela 8**.

Tabela 8. Valores médios do diâmetro médio (*z-average*), índice de polidispersão e potencial zeta das formulações de nanopartículas lipídicas sólidas com diferentes concentrações da ftalocianina de cloro alumínio (CIAIPc), com análise estatística ANOVA unilateral, seguida do pós-teste de *Tukey* ($p < 0,05$). Média da triplicata $\pm$ desvio padrão.

Formulação	Concentração teórica CIAIPc (mg mL ⁻¹)	Diâmetro médio (nm)	Índice de polidispersão	Potencial zeta (mV)
NLS	0	119,4 ($\pm$ 12,3)	0,179 ($\pm$ 0,011)	-34,1 ($\pm$ 4,3)
CIAIPc-A-NLS	0,05	136,9 ($\pm$ 22,8)	0,221 ($\pm$ 0,015)	-30,2 ($\pm$ 3,3)
CIAIPc-B-NLS	0,10	135,7 ($\pm$ 3,3)	0,176 ($\pm$ 0,017)	-29,8 ($\pm$ 2,6)
CIAIPc-C-NLS	0,20	139,5 ($\pm$ 1,0)	0,177 ($\pm$ 0,016)	-30,9 ($\pm$ 2,9)
CIAIPc-D-NLS	0,25	141,9 ($\pm$ 12,5)	0,176 ($\pm$ 0,071)	-26,6 ($\pm$ 7,6)
CIAIPc-E-NLS	0,30	139,5 ($\pm$ 1,7)	0,187 ($\pm$ 0,013)	-26,2 ($\pm$ 2,8)
CIAIPc-F-NLS	0,35	154,1 ($\pm$ 28,2)	0,188 ($\pm$ 0,020)	-25,7 ($\pm$ 4,9)
CIAIPc-G-NLS	0,40	160,9 ($\pm$ 47,6)	0,209 ($\pm$ 0,063)	-25,4 ($\pm$ 0,7)

De acordo com os resultados observados na **Tabela 8**, as NLS produzidas com adição crescente do fármaco apresentaram tamanho médio de 119,4 a 160,9 nm ($p = 0,5228$), confirmando que as partículas se encontram na faixa nanométrica. Nota-se que as nanopartículas com maior concentração de CIAIPc são ligeiramente maiores do que as de menor concentração e que a NLS vazia é a menor de todas.

Os valores médios de PDI (0,176 e 0,221) correspondem a formulações de NLS homogêneas, com polidispersidade abaixo de 0,3 e sem diferença estatística ($p = 0,3288$).

O valor de potencial zeta das formulações variou entre -34,1 e -25,4 mV, sem diferença estatística ($p = 0,1688$). Sabendo que tensoativos não iônicos não fornecem íons em solução aquosa e, portanto, não influenciam os valores do potencial zeta, assume-se que a matriz lipídica do compritol confere a carga negativa às partículas (RAHMAN, ZIDAN e KHAN, 2010). Como discutido anteriormente, valores de potencial zeta um pouco abaixo de $|30|$ mV são suficientes para garantir estabilidade às nanopartículas lipídicas sólidas que possuem estabilizantes físicos, pois estes contribuem na estabilização do sistema por impedimento estérico (SCHWARZ, 1999; SCHAFFAZICK et al., 2003; DAS et al., 2011; MÜLLER, MÄDER e GOHLA, 2000). Portanto, apesar da pequena redução no valor do potencial zeta com o aumento da carga da ftalocianina, as formulações demonstraram estabilidade eletrostática e estérica.

Considerando que não houve diferenças significativas nos parâmetros avaliados, pode-se sugerir que o aumento da carga de CIAIPc não afetou as propriedades físico-químicas das NLS. Apesar disso, é importante destacar algumas pequenas diferenças observadas. Por exemplo, o tamanho médio das nanopartículas contendo o ativo foi ligeiramente maior do que o tamanho

da NLS vazia, indicando que as moléculas do ativo estão inseridas na matriz lipídica (KUMAR e RANDHAWA, 2013). Também foi notado um aumento do valor do potencial zeta com o aumento da carga do FS. Tal observação se justifica, já que o lipídio sólido e os tensoativos exercem grande efeito no potencial zeta e o aumento da quantidade de CIAIPc interagindo com o lipídio poderia reduzir a carga negativa do potencial zeta, advinda do compritol.

4.1.2.1 Determinação do pH

Os valores de pH das formulações de nanopartículas lipídicas sólidas, contendo ou não ftalocianina de cloro alumínio (CIAIPc) em diferentes concentrações teóricas (**Tabela 1**) estão ilustrados na **Figura 18**.

A partir da análise dos resultados observou-se que as formulações de NLS, com e sem ftalocianina, possuem valores de pH próximos ao pH neutro (7,0), sem diferenças significativas entre si ($p = 0,4146$). Este resultado elimina uma barreira para o uso das formulações em estudos *in vitro* e *in vivo* para administração parenteral.

Figura 18. Valores de pH das formulações de nanopartículas lipídicas sólidas (NLS), contendo ou não ftalocianina de cloro alumínio (CIAIPc) em diferentes concentrações teóricas, com análise estatística ANOVA unilateral, seguida do pós-teste de *Tukey* ($p < 0,05$). As concentrações teóricas de CIAIPc de A a G estão indicadas na **Tabela 1**. Média da triplicata $\pm$ desvio padrão

4.1.3 Análise morfológica das NLS.

As imagens de sistemas coloidais obtidas por microscopia eletrônica de alta resolução têm se tornado uma importante ferramenta de análise em nanotecnologia farmacêutica, pois permitem avaliar a morfologia dos sistemas formados e confirmar os resultados obtidos por

espectroscopia de correlação de fótons (PCS), as quais são realizadas partindo do pressuposto de que as partículas são sistemas esféricos (HEURTAULT et al., 2003). Foram feitas análises por MET e AFM de amostras das NLS vazia e contendo o ativo, sendo essa última representada por CIAIPc-C-NLS.

A análise por MET é uma técnica na qual um feixe de elétrons atravessa a amostra e interage com ela. Um detector de elétrons fornece imagens, de campo claro ou escuro, de acordo com os elétrons desviados ou refratados pela amostra. As imagens obtidas por MET encontram-se na **Figura 19**.

Figura 19. Fotomicrografias das formulações de (a e c) NLS vazia e (b e d) CIAIPc-C-NLS obtidas por microscopia eletrônica de transmissão, em 50kx de tamanho. Escala de 200 nm.

A técnica de AFM fornece imagens topográficas e tridimensionais, em escala nanométrica. As imagens são obtidas por uma sonda que varre a superfície da amostra (SCHAFFAZICK et al., 2003). As imagens obtidas por AFM encontram-se na **Figura 20**.

Figura 20. Fotomicrografias obtidas por microscopia de força atômica com imagens (a) topográfica e (b) tridimensional de nanopartículas lipídicas sólidas vazias e imagens (c) topográfica e (d) tridimensional de nanopartículas lipídicas sólidas com ftalocianina de cloro-alumínio.

Na análise das fotomicrografias da **Figura 19** e **20** observou-se o formato característico de nanopartículas lipídicas com morfologia predominantemente esférica e arredondada, como descrito na literatura (RAHMAN, ZIDAN e KHAN, 2010; SILVA et al., 2011). Foi possível encontrar populações de diferentes tamanhos de partículas, já que não se tratam de amostras monodispersas, entretanto, observou-se homogeneidade do tamanho médio das nanopartículas. Não houve formação de agregados de partículas, o que confirmou a estabilidade advinda da repulsão eletrostática e do impedimento estérico (ALMEIDA, E. D. P., 2015).

Destaca-se o aumento do tamanho das NLS com a incorporação da ftalocianina na formulação (**Figuras 19.b e d, 20.c e d**) comparando-as às nanopartículas vazias (**Figuras 19.a e c, 20.a e b**), mas a incorporação do ativo ao sistema não interferiu na morfologia das partículas.

Pequenas variações no tamanho das partículas encontradas por PCS e observadas por MET e AFM já eram esperadas, visto que as técnicas se baseiam em princípios diferentes. O valor do tamanho médio dado por PCS mede o diâmetro hidrodinâmico da partícula em suspensão aquosa, baseado em seu movimento browniano, enquanto que por microscopia a medida é advinda do diâmetro da partícula seca, no caso da MET ocorre ainda a análise da amostra à vácuo. Portanto, o tamanho médio de partícula fornecido por PCS pode ser ligeiramente diferente comparado aos tamanhos obtidos por MET e AFM (KUMAR e RANDHAWA, 2013; NEGI et al., 2013; VITORINO et al., 2011).

Portanto, estas análises foram fundamentais para complementar os estudos de caracterização e desenvolvimento do sistema coloidal, fornecendo imagens que comprovam a formação das nanoestruturas com morfologia esférica e tamanho entre 100 – 200 nm.

4.1.4 Análise das NLS por difração de raios-X

Diferentemente de líquidos e gases, os sólidos cristalinos possuem unidades com arranjo de forma ordenada. Considerando que as NLS são constituídas de lipídios que estão no estado sólido à temperatura ambiente e que a incorporação e a taxa de liberação do fármaco nessa matriz lipídica estão intimamente ligadas ao estado polimórfico desse material, considera-se que tais parâmetros devem ser bem investigados, pois o reduzido tamanho da partícula e a presença de tensoativos podem modificar o *status* dos lipídios (MÜLLER, MÄDER e GOHLA, 2000; HEURTAULT et al., 2003).

A natureza química dos lipídios também é importante quanto à rede cristalina formada. Lipídios com estruturas mais simples formam redes cristalinas altamente organizadas e levam à expulsão do fármaco. Por outro lado, lipídios mais complexos, como misturas de glicerídeos ou ácidos graxos com diferentes comprimentos de cadeia carbônica, possuem rearranjo cristalino imperfeito, oferecendo espaços diferenciados para acomodação do fármaco (WESTESEN, BUNJES e KOCH, 1997; FREITAS e MULLER, 1999; BRUBACH et al., 2007).

Os difratogramas de todas as amostras avaliadas encontram-se na **Figura 21**.

Figura 21. Difratomogramas obtidos por difração de raios-X das amostras: lipídio sólido compritol 100%, formulações de nanopartículas lipídicas sólidas vazias (NLS Vazia), com tempo de vida de 1 e 24 meses, e nanopartículas lipídicas sólidas com ftalocianina de cloro alumínio (CIAIPc-NLS), com tempo de vida de 1 e 24 meses.

Avaliando o difratograma do compritol 100% puro observaram-se duas maiores reflexões em $2\theta = 21,34^\circ$ e $23,53^\circ$, correspondentes aos espaçamentos curtos 0,42 nm e 0,38 nm, respectivamente, característicos de formas polimórficas β' de triglicerídeos (empacotamento ortorrômbico). A formação dessa estrutura polimórfica para o compritol puro já foi descrita por outros autores (DE CARVALHO et al., 2013; MALKIN, 1954; SOUTO, MEHNERT e MÜLLER, 2006).

Ao analisar o difratograma das NLS, com ou sem o ativo, foi observada a presença dos espaçamentos curtos em 0,38 e 0,42 nm, o que confirmou a formação da estrutura polimórfica β' , porém, em menor intensidade, o que depende de fatores como tamanho das partículas e quantidade de amostra utilizada na análise (DE CARVALHO et al., 2013; SOUTO, MEHNERT e MÜLLER, 2006). Além disso, nos termogramas de todas as NLS detectou-se também uma reflexão adicional, de intensidade média, na região de $2\theta = \sim 19,3^\circ$ ($\sim 0,46$ nm). Considerando a presença dos 3 espaçamentos curtos nos difratogramas das NLS, concluiu-se que essas reflexões são características da forma polimórfica β_i . Portanto, pode-se concluir que houve rearranjo da estrutura cristalina lipídica na NLS, com empacotamento dos cristais em formas ortorrômbicas e triclinicas, tornando-se mais desorganizada (JENNING, SCHÄFER-KORTING e GOHLA, 2000). CIAIPc-NLS apresentam espaçamentos semelhantes aos da NLS vazia, confirmando que houve o mesmo arranjo da matriz lipídica

No difratograma da ftalocianina ClAlPc pura observou-se uma série de reflexões que não foram detectadas nos difratogramas das nanopartículas contendo o ativo. Isso indicou que a ftalocianina foi totalmente solubilizada na matriz lipídica das NLS e provavelmente estabilizada na forma amorfa. Considerando o grau de hidrofobicidade de ClAlPc, se a mesma não estivesse solubilizada na matriz lipídica das NLS, a ftalocianina estaria em sua forma cristalina e a presença de seus cristais seria detectada por difração de raios-X. Isto sugere que o fármaco fotossensibilizante foi incorporado com sucesso no desenvolvimento das NLS (DAS et al., 2011; HOU et al., 2003; KUMAR e RANDHAWA, 2013; RAHMAN, ZIDAN e KHAN, 2010).

Constatou-se também que não houve diferença marcante entre os difratogramas das formulações após 1 ou 24 meses de estocagem, pois, apesar da intensidade das reflexões sofrerem alterações, as mesmas estruturas polimórficas foram identificadas, sugerindo que a matriz lipídica manteve o caráter cristalino durante a estocagem. Esse resultado preveniu a expulsão da ftalocianina solubilizada na rede cristalina.

4.1.5 Análise das NLS por calorimetria exploratória diferencial

Análises por DSC foram usadas para detectar alterações termodinâmicas relacionadas com modificações na cristalinidade do lipídio sólido presente nas nanopartículas lipídicas sólidas e encontram-se ilustradas na **Figura 22**.

Figura 22. Termogramas, obtidos por DSC, do aquecimento das amostras: lipídio sólido compritol 100%, formulações de nanopartículas lipídicas sólidas vazias (NLS Vazia), com tempo de vida de 1 e 24 meses, e nanopartículas lipídicas sólidas com ftalocianina de cloro alumínio (ClAlPc-NLS), com tempo de vida de 1 e 24 meses.

No termograma do compritol puro (**Figura 22**) observou-se um pico estreito correspondente a sua fusão, com valor máximo de 70,9 °C (**Tabela 9**), o qual se encontra dentro do seu intervalo de temperatura de fusão (63-77 °C). Este pico sugere a presença de estruturas polimórficas do tipo β' , considerada a forma polimórfica mais encontrada para este lipídio (FREITAS e MULLER, 1999; MALKIN, 1954; SIEKMANN e WESTESEN, 1994).

Ao avaliar os termogramas das formulações de nanopartículas, comparando-os com o termograma do compritol puro, observou-se a redução da temperatura de fusão do lipídio, além do alargamento do pico correspondente à fusão. Duas possíveis explicações podem ser consideradas para a redução da temperatura de fusão: o tamanho reduzido das nanopartículas, explicado pelo efeito Kevin, e a interação dos tensoativos com o lipídio que resulta na presença de diferentes polimorfos, colaborando para a formação de uma rede cristalina menos ordenada (confirmada pelo alargamento da base do pico), a qual requer menor energia para a fusão do que as redes cristalinas mais organizadas formadas pelo lipídio puro, cuja energia precisa ser maior do que a força de interação da rede cristalina. Esses eventos já foram mencionados por outros autores (FREITAS e MULLER, 1999; HOU et al., 2003; KUMAR e RANDHAWA, 2013; SOUTO, MEHNERT e MÜLLER, 2006).

Na **Tabela 9** encontram-se os valores do grau de cristalinidade do lipídio sólido puro e nas formulações de NLS vazias e com ftalocianina de cloro alumínio.

Tabela 9. Parâmetros extraídos dos termogramas de DSC com grau de cristalinidade (GG) do lipídio sólido puro e nas formulações de nanopartículas lipídicas sólidas vazias (NLS Vazia), com tempo de vida de 1 e 24 meses, e nanopartículas lipídicas sólidas com ftalocianina de cloro alumínio (CIAIPc-NLS), com tempo de vida de 1 e 24 meses.

	Temperatura de Fusão (°C)*	Onset (°C)*	ΔH_{fus} (J g ⁻¹)*	GC (%)
Compritol puro	70,9	68,7	120,36	100
NLS vazia 1 mês	66,9	62,5	50,68	84,21
NLS vazia 24 meses	66,7	62,1	52,55	87,32
CIAIPc-NLS 1 mês	67,0	62,7	49,18	81,72
CIAIPc-NLS 24 meses	66,6	62,1	46,12	76,62

*Dados retirados dos termogramas que se encontram no **Anexo 2**.

Observou-se que o compritol puro apresenta uma entalpia de fusão bastante superior às das NLS, por ter a rede cristalina bem organizada. O grau de cristalinidade das formulações de NLS, com ou sem a ftalocianina, encontram-se entre 76,62 e 87,32%. Essa diminuição do GC do lipídio nas NLS pode ser explicada pela presença dos tensoativos nas nanopartículas, cuja interação com o lipídio pode ocasionar o aumento das imperfeições na matriz cristalina das

nanopartículas. Esses resultados estão de acordo com os estudos desenvolvidos por DE CARVALHO et al. (2013); FREITAS e MULLER (1999). Para as formulações contendo ClAlPc, o grau de cristalinidade foi um pouco menor do que para NLS vazias. Esse aumento da desordem da rede cristalina pode ser explicado pela presença do FS solubilizado no lipídio sólido na forma amorfa, o que possibilitou maior acomodação do FS na rede cristalina (DE CARVALHO et al., 2013). O compritol, por ser uma mistura de mono-, di- e triglicerídeos do ácido behênico, propiciou a formação de estruturas polimórficas que fornecem maior acomodação para a ftalocianina e também a liberação mais controlada desta, quando comparadas às matrizes lipídicas puras, com arranjos mais ordenados de moléculas.

As análises das NLS vazias ou contendo ClAlPc, recém preparadas ou após dois anos de armazenamento, não apresentaram diferenças significativas com relação ao polimorfismo e grau de cristalinidade, evitando ou minimizando a expulsão do FS durante a estocagem, também observado por PARDEIKE, HOMMOSS e MULLER (2009).

A avaliação dos termogramas obtidos por DSC estão em total acordo com as análises realizadas por difração de raios-X.

4.1.6 Desenvolvimento de métodos analíticos espectrofotométricos e espectrofluorimétricos para quantificação de ClAlPc.

Esse primeiro método foi desenvolvido por espectroscopia de UV-visível. Fez-se uso da mistura de solventes clorofórmio e etanol (1:1, v/v), capaz de solubilizar todos os componentes do sistema de nanopartículas lipídicas sólidas, especialmente o lipídio sólido compritol, possibilitando a quantificação de ClAlPc na formulação de nanopartículas lipídicas sólidas (item 4.1.7). Os espectros de absorção da ftalocianina de cloro alumínio obtidos na mistura de solventes clorofórmio e etanol (1:1, v/v) encontram-se ilustrados na **Figura 23**.

Figura 23. Espectros de absorção UV-visível das curvas de calibração da ftalocianina de cloro alumínio (ClAlPc) na mistura de solvente clorofórmio e etanol (1:1, em volume), com comprimento de onda máximo em 679 nm, e gráfico da curva padrão relacionando concentração de ClAlPc ($0,47$ - $2,34 \text{ ug mL}^{-1}$) versus absorbância; $y = 0,424x + 0,0206$; $r = 0,999$.

Nos espectros de absorção da ftalocianina de cloro alumínio (**Figura 23**) é possível identificar as duas principais bandas características das metaloporfirinas: a banda-B (banda Soret) na região do violeta ou ultravioleta do espectro (entre 300 e 370 nm) e banda-Q na região da luz visível (600-700 nm) (SIQUEIRA-MOURA et al., 2010; TEDESCO, ROTTA e LUNARDI, 2003). O macrociclo apresenta forte absorção na região da luz visível, correspondente à banda-Q e, neste caso, apresentou máxima absorção no comprimento de onda de 679 nm, escolhido nas análises espectrofotométricas para obtenção da linearidade.

Para este método analítico desenvolvido em clorofórmio e etanol (1:1, v/v), com máxima absorbância de ClAlPc em 679 nm, a linearidade foi obtida na faixa de concentração de $0,47 - 2,34 \text{ ug mL}^{-1}$ e apresentou coeficiente de correlação ($r = 0,999$) dentro do limite exigido pela RE nº 899 (ANVISA, 2003) ($r > 0,99$). Portanto, este método foi considerado satisfatório para ser utilizado nos estudos de quantificação de ClAlPc presente nas nanopartículas, com equação linear $y = 0,424 x + 0,0206$.

Sabe-se que a escolha do metal central das metaloporfirinas leva à excelentes propriedades fotofísicas como uma boa emissão de fluorescência, como no caso da ftalocianina de cloro

alumínio (SIQUEIRA-MOURA et al., 2010; TEDESCO, ROTTA e LUNARDI, 2003). Essa característica da ClAlPc foi fundamental para obtenção dos 2 outros métodos descritos a seguir, utilizando espectroscopia de emissão de fluorescência, por ser uma técnica mais sensível, visto que houve a necessidade da quantificação de pequenas quantidades do ativo.

Para o segundo e terceiro métodos, desenvolvidos no espectrofluorímetro, foram obtidos espectros de emissão de fluorescência com o mesmo perfil característico da ClAlPc, também demonstrado por SIQUEIRA-MOURA et al. (2010). Os espectros de emissão de fluorescência de ClAlPc obtidos para o segundo método para a quantificação de ClAlPc em metanol puro estão representados na **Figura 24**.

Figura 24. Espectros de emissão de fluorescência da ftalocianina de cloro alumínio (ClAlPc) utilizando como solvente o metanol puro (comprimento de onda de emissão máximo em 675 nm).

Os espectros de emissão de fluorescência da ClAlPc em metanol puro (**Figura 24**) foram registrados entre 0,50 e 4,50 ng mL^{-1} , com máximo de emissão de fluorescência em 675 nm, utilizando uma fenda espectral de 4 nm.

As curvas-padrão de calibração para a linearidade do FS dos métodos em metanol puro e na mistura PBS-etanol (4:1, v/v) são mostradas na **Figura 25**.

Figura 25. Gráficos das curvas-padrão de calibração, relacionando concentração de ftalocianina de cloro alumínio (CIAIPc) versus emissão de fluorescência, das linearidades construídas para o ativo em (a) metanol puro ($y = 1E+08 x + 2808,3$, $r = 0,999$) e em (b) PBS-etanol (4:1, em volume) ($y = 1003933x + 23268$, $r = 0,997$).

A partir da curva padrão de calibração para a linearidade do FS em metanol puro (**Figura 25.a**) foi obtida a equação linear $y = 1E+08 x + 2808,3$, com coeficiente de correlação ($r = 0,999$) satisfatório para o método (ANVISA, 2003). Este método também foi utilizado para quantificar os FS livre na formulação de nanopartículas, ou seja, que não foi encapsulado (item 4.1.7).

Para desenvolvimento do terceiro método foi utilizado como solvente a mistura PBS-etanol (4:1, v/v). Os espectros de fluorescência foram obtidos entre 0,009 e 0,150 $\mu\text{g mL}^{-1}$, com abertura espectral de 8 nm e comprimento de onda máximo de emissão de fluorescência em 682 nm. A curva padrão resultante da linearidade encontra-se na **Figura 25.b** ($y = 1003933x + 23268$ e $r = 0,997$). O método apresentou correlação linear adequada (ANVISA, 2003).

Mesmo que os métodos desenvolvidos tenham apresentado coeficientes de correlação de acordo com as exigências da RE nº 899 (ANVISA, 2003), demonstrando que os métodos são capazes de fornecerem resultados diretamente proporcionais à concentração do ativo na amostra, apenas o valor de r não é suficiente para garantir que o ajuste linear às curvas de calibração está adequado (RIBANI et al., 2004; RIBEIRO et al., 2008). Os resultados das análises de ANOVA unilateral e do teste de F da falta de ajuste realizados com os 3 métodos estão ilustrados na **Tabela 10**.

Tabela 10. Resultados das análises de variância (ANOVA) unilateral para o modelo linear dos mínimos quadrados e para o teste da falta de ajuste (*Lack of Fit*), com nível de significância $p < 0,05$ dos 3 métodos analíticos desenvolvidos para o trabalho com nanopartículas lipídicas.

Solventes	Parâmetros	Graus de liberdade	F calculado	F tabelado	p valor
Clorofórmio e etanol (1:1, em volume)	Modelo linear	1	158996,2	4,1	0,0001 ^a
	Resíduos	33			
	Falta de ajuste	5	1,88	2,56	0,1300 ^b
	Erro Puro	28			
Metanol puro	Modelo linear	1	60599,8	4,1	0,0001
	Resíduos	43			
	Falta de ajuste	7	1,88	2,28	0,9810
	Erro Puro	36			
PBS e etanol (4:1, em volume)	Modelo linear	1	2057,9	4,4	0,0001
	Resíduos	18			
	Falta de ajuste	3	2,20	3,28	0,1300
	Erro Puro	15			

^a valor de $p < 0,05$ rejeita a hipótese nula (aceita o modelo linear)

^b valor de $p > 0,05$ aceita a hipótese nula (rejeita a falta de ajuste)

A mesma conclusão pode ser feita após a análise estatística dos 3 métodos analíticos desenvolvidos: com relação ao modelo dos mínimos quadrados os valores de F calculado foram maiores do que os valores de F tabelado (ou F crítico), o que indica que as equações das regressões lineares são estatisticamente significativas dentro do intervalo de confiança de 95%. O adequado ajuste da equação linear foi apoiado pelos valores dos F calculado do teste da falta de ajuste que foi menor que os valores de F tabelados. Isso significa que não houve falta de ajuste para o modelo linear ($p > 0,05$).

Pode-se concluir que a resposta dos equipamentos gera resultados linearmente relacionados à concentração do FS, enquadrados nas faixas analíticas avaliadas. Portanto, os modelos de calibração foram significativamente lineares e descreveram adequadamente os dados experimentais.

A análise dos limites de detecção e quantificação foi feita para garantir uma quantificação real da ftalocianina de cloro alumínio nos diferentes estudos, considerando a perspectiva de que os níveis de concentração do FS nos estudos de retenção e permeação cutânea seriam significativamente baixos. Os valores de LD e LQ de cada método estão na **Tabela 11**.

Tabela 11. Valores dos limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) determinados para os diferentes métodos analíticos desenvolvidos no trabalho com nanopartículas lipídicas sólidas.

	LD ($\eta\text{g mL}^{-1}$)	LQ ($\eta\text{g mL}^{-1}$)
Clorofórmio e etanol (1:1, em volume)	21,67	72,22
Metanol puro	0,06	0,20
PBS-etanol (4:1, em volume)	2,76	9,18

Observou-se que os limites de detecção e de quantificação determinados nos 3 métodos desenvolvidos foram bem próximos ao nível de menor concentração de cada método. Pode-se dizer então que os métodos desenvolvidos são sensíveis para avaliar pequenas concentrações de CIAIPc.

4.1.7 Doseamento da ftalocianina de cloro alumínio associada às NLS.

O método de quantificação desenvolvido no item 4.1.6 por espectroscopia de absorvância para análise da quantidade total de CIAIPc na formulação utilizou uma mistura de solventes composta por 50% de clorofórmio para solubilização da fase orgânica e consequente desintegração das nanoestruturas com auxílio de ultrassom, e 50% de etanol para solubilização da ftalocianina. Utilizando este método foi estimado o *drug loading* das NLS com diferentes concentrações de CIAIPc, após 1 e 24 meses de sua obtenção, cujos resultados estão ilustrados na **Tabela 12**.

Tabela 12. Valores médios do *drug loading* para as formulações de nanopartículas lipídicas sólidas em diferentes concentrações da ftalocianina de cloro alumínio (CIAIPc) com tempo de vida de 1 e 24 meses.

Formulações	Concentração teórica de CIAIPc ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	<i>Drug loading</i> (%)	
		NLS com 1 mês	NLS com 24 meses
CIAIPc-A-NLS	50	80,63	77,39
CIAIPc-B-NLS	100	83,73	81,52
CIAIPc-C-NLS	200	77,24	71,20
CIAIPc-D-NLS	250	76,02	71,18
CIAIPc-E-NLS	300	77,54	69,43
CIAIPc-F-NLS	350	77,40	75,52
CIAIPc-G-NLS	400	93,75	76,65

Os valores de *drug loading* encontrados para as formulações com tempo de vida de 1 mês estão na faixa de 76 – 93% estão em acordo com a capacidade de carga de nanopartículas lipídicas sólidas utilizando o compritol para incorporação de ativo lipofílico, também descrito por (DE CARVALHO et al., 2013).

Um dos problemas relacionados às nanopartículas lipídicas sólidas é quanto à capacidade de carga e encapsulação de fármacos, sobretudo quando se utiliza na formulação lipídios puros, com alta organização cristalina. Como mencionado anteriormente, quanto maior a organização da matriz lipídica, menor o espaço para acomodação do fármaco (MÜLLER, MÄDER e GOHLA, 2000). Apesar de o compritol ser formado por uma mistura de glicerídeos, observou-se uma leve redução dos valores de *drug loading* para as formulações com 24 meses, mas que ainda assim mantiveram-se altos (**Tabela 12**). Isso pode ter ocorrido devido à pequena alteração na organização da matriz lipídica ao longo do tempo de armazenamento, como explicado nos itens 4.1.5 e 4.1.6.

A encapsulação de fármacos lipofílicos está diretamente relacionada com a solubilidade do fármaco na fase oleosa da formulação. Supõe-se que a ftalocianina incorporada na formulação está completamente encapsulada ou adsorvida nas nanopartículas, visto que, utilizando o método analítico desenvolvido no item 4.1.6, não foi possível quantificar o fármaco livre na formulação (fração não encapsulada), já que os valores obtidos na análise da intensidade de fluorescência estavam abaixo do limite de detecção.

No trabalho de ALMEIDA et al. (2012) foram desenvolvidas nanopartículas utilizando como lipídio sólido o ácido esteárico para encapsular o mesmo fármaco, cuja EE máxima foi de 85%. A EE das NLS neste trabalho encontra-se acima dos valores já descritos na literatura para nanopartículas lipídicas sólidas utilizando compritol como lipídio para encapsular outros fármacos lipofílicos, como alendronato (DOLATABADI et al., 2014), edelfosine (ESTELLA-HERMOSO DE MENDOZA et al., 2012), coenzima Q10 (GOKCE et al., 2012) e se assemelham aos valores encontrados para eficiência de encapsulação da risperidona (SILVA et al., 2012b). Comparando ainda este resultado com o de outros sistemas coloidais desenvolvidos com a CIAIPc, observou-se que a eficiência de encapsulação do FS nesse sistema de NLS foi maior do que quando encapsulado em nanocápsulas poliméricas com EE máxima de 71% (SIQUEIRA-MOURA et al., 2013).

Portanto, pode-se considerar que as nanopartículas lipídicas sólidas apresentaram um valor ótimo de *drug loading* acima de 75% e, considerando os resultados da EE, conclui-se que toda a ftalocianina que se encontra na formulação está incorporada nas nanopartículas.

4.1.8 Avaliação da estabilidade das NLS

4.1.8.1 Monitoramento da estabilidade de longa duração das NLS.

Para o desenvolvimento de produtos farmacêuticos, o estudo de estabilidade em função do tempo é fundamental, pois nele são avaliadas as características físicas e biológicas do sistema, utilizando os resultados para determinar o prazo de validade nas condições de estocagem especificadas. Por meio deste estudo, verifica-se quanto tempo os produtos farmacêuticos mantêm as mesmas características dos estudos realizados inicialmente (ANVISA, 2005).

Não foram observados sinais de instabilidade ou alterações quanto à viscosidade, cor e odor para as formulações estocadas em refrigerador, segundo as análises macroscópicas. Os valores médios de tamanho, PDI e potencial zeta encontram-se na **Figura 26** (NLS vazia e para as CIAIPc-NLS nas concentrações A, B e C) e na **Figura 27** (NLS contendo ftalocianina nas concentrações D, E, F e G).

Figura 26. Gráficos com valores médios do tamanho (*z-average*, em barras), do índice de polidispersão (em linhas) e do potencial zeta (gráfico em linhas inserido) das formulações de (a) nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) vazias e nanopartículas contendo ftalocianina de cloro alumínio (CIAIPc) em diferentes concentrações: (b) CIAIPc-A-NLS, (c) CIAIPc-B-NLS e (d) CIAIPc-C-NLS, para estudo de estabilidade no período de 0 a 24 meses, com análise estatística ANOVA unilateral, seguida do pós-teste de Tukey ($p < 0,05$). Média da triplicata $\pm$ desvio padrão.

Figura 27. Gráficos com valores médios do tamanho (*z-average*, em barras), do índice de polidispersão (em linhas) e do potencial zeta (gráfico em linhas inserido) das formulações de nanopartículas contendo ftalocianina de cloro alumínio (CIAIPc) em diferentes concentrações: (a) CIAIPc-D-NLS, (b) CIAIPc-E-NLS, (c) CIAIPc-F-NLS, (d) CIAIPc-G-NLS para estudo de estabilidade no período de 0 a 24 meses, com análise estatística ANOVA unilateral, seguida do pós-teste de *Tukey* ($p < 0,05$). Média da triplicata $\pm$ desvio padrão.

Ao avaliar o tamanho e PDI de todas as formulações nas **Figura 26 e 27**, percebe-se que, com o passar do tempo, houve uma suave redução do diâmetro médio e um pequeno aumento do PDI para todas as amostras, porém, foram variações sem nenhuma diferença significativa ($p > 0,05$).

Um fenômeno de instabilidade observado para as nanopartículas lipídicas sólidas é a gelificação, que pode ocorrer após a produção das mesmas ou durante sua estocagem. Esse fenômeno é precedido do aumento do tamanho de partícula e envolve a perda da estrutura da partícula coloidal (FREITAS e MULLER, 1999; HEURTAULT et al., 2003). Pode-se confirmar, então, que não houve gelificação, já que esse aumento de diâmetro não foi observado para nenhuma formulação.

Com relação ao potencial zeta, observou-se que para NLS vazia houve redução do valor, em módulo, enquanto que para as formulações contendo CIAIPc, o potencial zeta, em módulo, aumentou ao longo do tempo. A única alteração significativa foi na amostra CIAIPc-A-NLS, entre o potencial zeta medido nos tempos 6 e 24 meses ($p < 0,05$).

As amostras permaneceram com o tamanho entre 100 e 200 nm e baixa polidispersão. As alterações observadas no potencial zeta não influenciaram negativamente a estabilidade das amostras que mantiveram a homogeneidade durante o tempo avaliado. A partir desses resultados, conclui-se que as formulações desenvolvidas, acondicionadas em refrigerador e protegidas da luz mantiveram a estabilidade física por 24 meses, confirmando a excelente estabilidade das NLS descrita na literatura (FREITAS e MULLER, 1999; MEHNERT e MADER, 2001; WISSING, KAYSER e MÜLLER, 2004).

4.1.8.2 Estudo da estabilidade acelerada das NLS.

A técnica empregada pelo analisador de dispersões *LUMiSizer* possibilitou medir a intensidade da luz NIR transmitida ao longo de todo o comprimento da amostra, em função do tempo e posição (CHIU et al., 2012). A análise da formulação de NLS vazia resultou no perfil de transmitância representado na **Figura 28**.

Figura 28. Gráfico da transmissão normalizada de NIR versus posição da cubeta, representando o perfil de transmitância da formulação de nanopartículas lipídicas sólidas vazias na análise de estabilidade por centrifugação com o *LUMiSizer*, com inserto do desenho esquemático da posição da cubeta. Os perfis iniciais estão em vermelho e a coloração verde sinaliza perfis registrados próximo ao fim do experimento.

A luz NIR que atravessou a amostra foi captada por um receptor de NIR e convertida em perfis de transmitância, em tempos pré-determinados, enquanto as formulações foram submetidas à força centrífuga do equipamento (DETLOFF, SOBISCH e LERCHE, 2007; CHIU et al., 2012). Comparando-se os perfis finais (em verde) e iniciais (em vermelho) ao longo do

experimento na **Figura 27**, observou-se uma redução menor que 10% da transmitância, que representa a acomodação das partículas ao longo do experimento. Não houve sinais de instabilidade e percebeu-se que as partículas em suspensão mantiveram distribuição homogênea ao longo de todo o comprimento da amostra, sem alterações da transmitância ao longo dos perfis

As formulações de NLS com ftalocianina também foram analisadas, representadas pela amostra CIAIPc-C-NLS (**Figura 29**). Observa-se uma pequena diferença nos perfis iniciais e finais que, assim como para a amostra NLS vazia, pode ser considerado uma normalização das partículas na cubeta, já que a transmitância ao longo do comprimento da amostra manteve aproximadamente o mesmo valor, indicando uniformidade de partículas em suspensão ao longo do tempo de análise.

Figura 29. Gráfico da transmissão normalizada de NIR versus posição da cubeta, representando o perfil de transmitância da formulação de nanopartículas lipídicas sólidas com ftalocianina de cloro alumínio CIAIPc-C-NLS, na análise de estabilidade por centrifugação com o *LUMiSizer*. Os perfis iniciais estão em vermelho e a coloração verde sinaliza perfis registrados próximo ao fim do experimento.

Os perfis de transmitância das demais amostras encontram-se no **ANEXO 1**.

Assim como mostrado nas **Figuras 28 e 29**, os perfis obtidos para as NLS nas demais concentrações de ftalocianina tiveram pequena diferença entre os perfis de análise final e inicial, demonstrando a ocorrência da normalização das partículas na cubeta. Não foi observado nenhum sinal de instabilidade nas amostras testadas com o *LUMiSizer*.

Os perfis de transmitância das NLS vazias e das CIAIPc-NLS nas sete diferentes concentrações foram integrados no software do próprio equipamento (**Figura 30**) para uma análise comparativa.

Figura 30. Gráfico da integral da transmitância das formulações de NLS com diferentes concentrações de ftalocianina de cloro alumínio (CIAIPc), no estudo de estabilidade por centrifugação, com uso do *LUMiSizer*. (■) NLS vazia, (■) CIAIPc-A-NLS, (■) CIAIPc-B-NLS, (■) CIAIPc-C-NLS, (■) CIAIPc-D-NLS, (■) CIAIPc-E-NLS, (■) CIAIPc-F-NLS, (■) CIAIPc-G-NLS.

É importante destacar a influência que a porcentagem de CIAIPc exerce sobre os valores da transmitância. Observou-se que a análise da formulação de NLS vazia apresentou maior transmitância dentre todas as formulações produzidas. Comparando-se as NLS nas diferentes concentrações de CIAIPc estudadas, percebe-se que há uma clara relação com a porcentagem de fármaco presente na formulação e a porcentagem de transmitância. As formulações menos concentradas apresentam maior transmitância, próximas à da NLS vazia e esse valor decresce com o aumento da porcentagem de fármaco inserida nas nanopartículas.

Outra informação importante observada na **Figura 29** é que todos os perfis integrados resultaram em retas praticamente paralelas ao eixo X. Sabe-se que a migração de partículas devido à força gravitacional ou mudança na distribuição do tamanho resulta em variação da concentração local das partículas, correspondendo a uma alteração na transmissão de luz (CHIUI et al., 2012; DETLOFF, SOBISCH e LERCHE, 2007). Portanto, a partir da análise dos resultados integrados, observou-se que não houve migração considerável das partículas, visto que ao longo do tempo a transmissão de luz ao longo da cubeta não se alterou.

Essas análises de estabilidade acelerada corroboram com a estabilidade ao longo do tempo obtida no item anterior, visto que as nanopartículas lipídicas sólidas são sistemas altamente estáveis.

Segundo os parâmetros utilizados no teste de estabilidade foi possível obter uma previsão de *shelf life* de 12 meses (L.U.M.GmbH, 2010). Conclui-se que as formulações de NLS e CIAIPc-NLS nas diferentes concentrações estudadas mantiveram a estabilidade por 12 meses à 25 °C.

4.1.8.3 Estudo da estabilidade de CIAIPc-A-NLS acondicionada à 32 °C.

Os valores dos parâmetros avaliados na análise de estabilidade da formulação acondicionada à 32 °C estão ilustradas na **Figura 31**.

Pode-se observar que a formulação CIAIPc-A-NLS utilizada no estudo de liberação com as células de Franz não apresentou alterações significativas ($p = 0,4146$) dos parâmetros tamanho médio e índice de polidispersão avaliados quando mantida à 32 °C. Portanto, pode-se dizer que durante 24 h a formulação pode ser mantida a essa temperatura, sem alteração de suas propriedades intrínsecas advindas de sistemas em nano escala.

Figura 31. Gráficos com valores médios do tamanho (*z-average*, em barras), do índice de polidispersão (em linhas) da formulação de nanopartículas contendo ftalocianina de cloro alumínio (CIAIPc-A-NLS) para avaliação da estabilidade à 32 °C, com análise estatística ANOVA unilateral, seguida do pós-teste de Tukey ($p < 0,05$). Média da triplicata $\pm$ desvio padrão.

4.1.9 Estudos *in vitro* da permeação e retenção cutânea de CIAIPc encapsuladas nas NLS.

No estudo de permeação cutânea *in vitro* da ftalocianina de cloro alumínio, todas as coletas do meio receptor realizadas durante as 6,5 h do experimento foram analisadas, segundo método desenvolvido por espectroscopia de emissão de fluorescência no item 4.1.6, e apresentaram concentrações de CIAIPc abaixo do limite de detecção de CIAIPc ($0,00276 \mu\text{g mL}^{-1}$) na mistura de PBS com 20% (v/v) de etanol. Desta forma, podemos concluir que a CIAIPc não foi detectada no meio receptor e, portanto, não houve permeação do FS através da pele.

Esse resultado pode ser considerado bastante favorável já que a eficácia da Terapia Fotodinâmica no tratamento de doenças cutâneas está diretamente ligada à aplicação tópica e acúmulo do FS no tecido alvo. O sistema no qual está inserido o fotossensibilizante deve ser capaz de aumentar a penetração do fármaco, em sua forma monomérica, pelo estrato córneo

para que ele possa atingir camadas da derme e epiderme agindo sobre as células alvo (ROSSETTI, F. C., 2010).

Outro ponto positivo decorrente da ausência de permeação do FS através da pele é poder eliminar o risco de efeitos sistêmicos tóxicos provocados pela ftalocianina de cloro alumínio (KYRIAZI et al., 2008; ROSSETTI, F. C., 2010).

O fato de CIAIPc não ter sido detectado no meio receptor pode ser explicado por alguns motivos, como: a ausência da circulação sanguínea na epiderme, quando no experimento *in vitro*; ou por dificuldades com a difusão da ftalocianina para camadas mais profundas da pele, inviabilizando sua chegada no meio receptor (GODIN e TOUITOU, 2007); ou ainda pode-se admitir que o tempo de duração do estudo não foi suficiente para que a ftalocianina liberada das CIAIPc-NLS chegasse até o meio receptor, visto que a matriz lipídica sólida promove uma liberação bastante controlada (MÜLLER, RADTKE e WISSING, 2002).

Foi possível avaliar a quantidade do FS que penetrou e ficou retido no estrato córneo utilizando a técnica de *tape stripping*, e, em camadas mais profundas da pele (epiderme e derme), por homogeneização dos tecidos remanescentes. Os resultados encontram-se na **Tabela 13**.

Tabela 13. Valores médios de ftalocianina de cloro alumínio (CIAIPc) retida nas diferentes camadas da pele avaliadas após 6,5 h da aplicação de nanopartículas lipídicas sólidas com ftalocianina de cloro alumínio (CIAIPc-A-NLS) nos estudos *in vitro* com células de Franz. Média da quintuplicata $\pm$ desvio padrão.

	Estrato córneo	Derme e epiderme
CIAIPc retida ($\mu\text{g cm}^{-2}$)	0,0010($\pm$ 0,0003)	0,0128 ($\pm$ 0,0095)

Os resultados obtidos (**Tabela 13**) foram bastante favoráveis para uso tópico (local) de CIAIPc-NLS na terapia fotodinâmica, pois observou-se um acúmulo 12 vezes maior da ftalocianina retida na derme e epiderme viável do que no estrato córneo. Isso indica que, apesar do caráter altamente lipofílico do ativo, que apresenta maior partição pelo estrato córneo (EC), a veiculação de CIAIPc nas NLS possibilitou a penetração do FS na pele e seu acúmulo nas camadas mais profundas da pele, local de interesse da TFD.

Sabe-se que antes da aplicação da luz na terapia fotodinâmica é necessário que uma quantidade suficiente do FS atravessasse o EC e se acumule nas células malignas para que, com a aplicação do laser, seja promovida uma resposta biológica adequada. Portanto, o acúmulo de CIAIPc no tecido alvo está diretamente relacionado com uma melhor eficiência na aplicação da TFD em neoplasias cutâneas. Sendo assim, o sistema coloidal desenvolvido neste trabalho

atende essa necessidade, apresentando-se como um ótimo veículo para a ftalocianina de cloro alumínio.

4.1.10 Ensaios biológicos *in vitro*.

4.1.10.1 Estudo de biocompatibilidade da NLS vazia

No desenvolvimento de sistemas carreadores para veiculação seja de um fármaco (no caso um fotossensibilizante para aplicação na TFD) ou para tratamento cosméticos, deve-se realizar o estudo de biocompatibilidade celular, ou seja, avaliar possíveis efeitos citotóxicos dos componentes deste sistema por si só, garantindo que o mesmo seja biocompatível, não tóxico e seguro (DOKTOROVOVA, SOUTO e SILVA, 2014; ZANATTA et al., 2008)

A linhagem celular de fibroblastos NIH-3T3 já foi utilizada em diversos trabalhos (ELAKKIYA et al., 2013; LIU et al., 2012; ZANATTA et al., 2008) para testes de biocompatibilidade celular, pois, de acordo com a literatura (MAIER, SCHMITT-LANDGRAF e SIEGEMUND, 1991) essa linhagem é considerada bastante sensível à substâncias irritantes.

Sabe-se que a característica dos excipientes (lipídio e emulsionantes) que compõem a formulação influenciam diretamente na toxicidade sobre as células. Até mesmo as características físicas das NLS, como o estado físico da matriz lipídica ou o tamanho e forma das nanopartículas influenciam no resultado final. Portanto, apesar de os componentes da formulação separadamente serem bem tolerados, a combinação destes na formulação final deve ser considerada para o ensaio de biocompatibilidade celular (DAL PIZZOL, C., 2014). Assim, foi realizado um *screening* com a formulação de NLS vazia em diferentes concentrações no meio de cultura para avaliar a toxicidade da formulação sem o ativo, cujos resultados da viabilidade celular estão ilustrados na **Figura 32**.

Figura 32. Gráfico do ensaio de biocompatibilidade *in vitro* pelo método colorimétrico MTT, com células NIH-3T3. O (□) controle negativo, tratado apenas com meio de cultura, foi parâmetro de comparação para (▨) nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) vazias em diferentes concentrações no meio de cultura. Resultados analisados com ANOVA unilateral, seguida do pós-teste de *Dunnett* ($p < 0,05$). Média da triplicata $\pm$ desvio padrão.

Como pode ser visto na **Figura 30**, as culturas de fibroblastos que foram expostas às diluições com 0,10, 0,20 e 0,39% (v/v) de formulação NLS vazia apresentaram viabilidade celular acima de 70% que, de acordo com a ISO 10993-5:2009 (ISO, 2009), não configura o quadro de toxicidade para as células tratadas. Porém, após análise estatística, pode-se dizer que apenas os grupos de NIH-3T3 tratadas com as concentrações 0,10 e 0,20% (v/v) não apresentaram redução significativa da viabilidade celular em relação ao controle que foi incubado somente com meio de cultura. Isso mostra que a formulação de NLS vazia em concentrações igual ou inferior a 0,20% não são tóxicas sobre a linhagem estudada, o que confirma o caráter biocompatível da dispersão coloidal de NLS vazia. Assim, as respostas obtidas estão em concordância com a literatura científica sobre nanopartículas lipídicas sólidas que devem ser biocompatíveis com tecidos e células, sem apresentar efeito tóxico, quando produzidas utilizando excipientes biodegradáveis/biocompatíveis (DOKTOROVOVA, SOUTO e SILVA, 2014; MÜLLER, MÄDER e GOHLA, 2000; JOSHI e MÜLLER, 2009; GASTALDI et al., 2014).

Diante destes resultados, a concentração de 0,20% (v/v) de NLS foi estabelecida como a “concentração de trabalho” para a realização dos ensaios de toxicidade celular no escuro e de fototoxicidade da NLS com CIAIPc, uma vez que até essa concentração, seguramente, o sistema carreador das nanopartículas lipídicas sólidas por si só não é tóxico ($p > 0,05$).

4.1.10.2 Estudos de toxicidade da CIAIPc- NLS, na ausência de luz.

A linhagem de células do tipo melanoma pigmentado B16-F10 foi utilizada neste ensaio de toxicidade, assim como no ensaio de fototoxicidade.

Baseado nos resultados obtidos no estudo de biocompatibilidade do item anterior, para qualquer suspensão de nanopartículas lipídicas sólidas utilizada nos estudos *in vitro* com B16-F10 foi definida a diluição de 0,20% (v/v) da formulação de NLS, com ou sem o FS, em meio de cultura RPMI-1640 suplementado com 3% de SFB.

Uma característica fundamental para os FS utilizados na TFD é que os mesmos devem possuir baixo nível de toxicidade na ausência de luz (BECHET et al., 2008; CASTANO, DEMIDOVA e HAMBLIN, 2004). Assim, visando avaliar a toxicidade de CIAIPc livre e encapsulado na ausência do estímulo luminoso, em uma primeira etapa, as células neoplásicas foram tratadas com as suspensões de nanopartículas com duas diferentes concentrações (CIAIPc-C-NLS e CIAIPc-G-NLS) que, diluídas a 0,20% (v/v) no meio de cultura resultaram nas concentrações finais do FS: $0,31 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($\sim 0,54 \mu\text{M}$) e $0,75 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($\sim 1,30 \mu\text{M}$) de CIAIPc.

Em ambas as etapas desse estudo, um grupo de células denominado controle positivo foi tratado com as NLS vazias, também na diluição de 0,20% (v/v), assim como todas as formulações de nanopartículas lipídicas sólidas. Os resultados obtidos após o tratamento das células neoplásicas nesta primeira etapa, na ausência de luz, estão ilustrados na **Figura 33**.

Figura 33. Gráfico do ensaio de toxicidade *in vitro* na ausência de luz, pelo método colorimétrico MTT, com células B16-F10. Sendo CN = controle negativo (tratado apenas com meio de cultura), utilizado como parâmetro de comparação, CP = controle positivo (tratado com nanopartículas lipídicas vazias em meio de cultura), CIAIPc-C-NLS e CIAIPc-G-NLS são formulações de nanopartículas lipídicas contendo ftalocianina de cloro alumínio nas concentrações finais de $0,31$ e $0,75 \mu\text{g mL}^{-1}$ de CIAIPc, respectivamente. Resultados analisados com ANOVA unilateral, seguida do pós-teste de Tukey ($p < 0,05$). Média da triplicata $\pm$ desvio padrão.

A viabilidade celular encontrada para cada grupo foi de 87,83% ($\pm 8,85$) para o controle positivo, 83,04% ($\pm 5,69$) para o grupo tratado com CIAIPc-C-NLS e 85,57% ($\pm 8,24$) para as células encubadas com CIAIPc-G-NLS.

De forma geral, considerando que valores de viabilidade celular acima de 70% não configura o quadro de toxicidade, segundo (ISO, 2009), pode-se dizer que as formulações de NLS, vazias e com CIAIPc nas duas diferentes concentrações, não apresentaram efeito tóxico para a linhagem melanocítica B16-F10.

Considerando a análise estatística realizada, a ausência de efeito tóxico é confirmada, visto que não houve diferença significativa entre os valores de viabilidade encontrados para os grupos tratados com as dispersões de nanopartículas comparados com os controles positivo e negativo ($p > 0,05$). Esses resultados permitem excluir qualquer toxicidade apenas da formulação (sem o FS) para a linhagem de células B16F10 e confirmando a caráter biocompatível das nanopartículas.

Como não foi observado efeito tóxico da ftalocianina de cloro alumínio encapsulada em diferentes concentrações, confirmando que o FS não possui atividade citotóxica na ausência de luz, a formulação de concentração mais elevada (CIAIPc-G-NLS, cuja diluição resulta em $0,75 \mu\text{g mL}^{-1}$ de CIAIPc) foi escolhida para ser utilizada no estudo de fototoxicidade.

Em uma segunda etapa ainda neste estudo na ausência de estímulo luminoso, a toxicidade de CIAIPc livre (não encapsulada) foi avaliada na concentração de $0,75 \mu\text{g mL}^{-1}$ de CIAIPc a partir de uma solução estoque em etanol diluída no meio de cultura. Para observar uma possível influência do solvente orgânico sobre a viabilidade das células B16-F10, um grupo denominado controle etanol foi tratado somente com o solvente etanol em uma quantidade equivalente ao volume utilizado para a diluição da solução estoque do FS. Os resultados deste segundo teste estão ilustrados na **Figura 34**.

Figura 34. Gráfico do ensaio de toxicidade *in vitro* na ausência de luz, pelo método colorimétrico MTT, com células B16-F10. Sendo CN = controle negativo (tratado apenas com meio de cultura), utilizado como parâmetro de comparação, CP = controle positivo (tratado com nanopartículas lipídicas vazias em meio de cultura), CEt = controle do solvente etanol em meio de cultura, CIAIPc-Et = ativo livre em etanol diluído em meio de cultura na concentração final de $0,75 \mu\text{g mL}^{-1}$ de CIAIPc, CIAIPc-G-NLS = nanopartículas lipídicas contendo ftalocianina de cloro alumínio na concentração final de $0,75 \mu\text{g mL}^{-1}$ de CIAIPc. Resultados analisados com ANOVA unilateral, seguida do pós-teste de Tukey ($p < 0,05$). Média da triplicata $\pm$ desvio padrão.

A viabilidade celular encontrada para cada grupo em relação ao controle negativo foi de 90,87% ($\pm 7,63$) para o controle positivo, 99,77% ($\pm 19,49$) para o controle do etanol, 84,59% ($\pm 10,04$) para o grupo tratado com CIAIPc livre e 84,94% ($\pm 6,48$) para as células tratadas com CIAIPc encapsulada, ambas na mesma concentração do FS.

Para todos os grupos testados não foi observado efeito tóxico tanto da ftalocianina livre ou encapsulada na concentração de $0,75 \mu\text{g mL}^{-1}$. A quantidade de etanol utilizada também não afetou a viabilidade celular das células neoplásicas ($p > 0,05$).

Diante desses resultados, concentração de $0,75 \mu\text{g mL}^{-1}$ de CIAIPc livre ou encapsulada foi estabelecida para seguir com a realização dos ensaios de fototoxicidade (aplicação do laser), uma vez que esta concentração não apresentou toxicidade para a linhagem de células B16-F10 na ausência de luz. Assim fica comprovado que CIAIPc apresenta uma das características imprescindíveis do fármaco fotossensibilizante ideal para ser aplicado na TFD: não apresentar toxicidade na ausência de luz (BECHET et al., 2008; CASTANO, DEMIDOVA e HAMBLIN, 2004)

4.1.10.3 Estudos de fototoxicidade da NLS-CIAIPc (aplicação da TFD).

A linhagem celular melanocítica B16-F10 também foi utilizada para os experimentos com a terapia fotodinâmica, cujo princípio é gerar o efeito tóxico combinando a concentração do FS e a dose de luz aplicada com o oxigênio do meio tecidual (PLAETZER et al., 2008).

Para avaliar o dano celular causado por ação da ftalocianina em função da irradiação do laser, foram aplicadas três diferentes doses de luz, sendo elas: D1 = 0,5 J cm⁻², D2 = 1,0 J cm⁻² e D3 = 2,0 J cm⁻².

Neste estudo foi avaliada a viabilidade das células tratadas com diluições da ftalocianina livre em etanol (CIAIPc-Et) e encapsulada nas nanopartículas (CIAIPc-NLS), na concentração de 0,75 µg mL⁻¹, uma vez que essa concentração não demonstrou efeito tóxico sobre células melanocíticas na ausência de luz. Para comparação foram utilizados dois controles tratados somente com o meio de cultura, sendo o controle negativo (não irradiado) e o controle do laser (irradiado com a maior dose de luz utilizada no experimento). Os resultados estão representados na **Figura 34**.

Figura 35. Gráficos do ensaio de fototoxicidade *in vitro*, pelo método colorimétrico MTT, com células B16-F10 tratadas com ftalocianina de cloro alumínio (a) livre em etanol (CIAIPc-Et) e (b) encapsulada nas nanopartículas lipídicas sólidas (CIAIPc-NLS), ambas na concentração de 0,75 µg mL⁻¹. CN = controle negativo, CL = controle do laser e D1, D2 e D3 = diferentes doses de luz aplicadas. Resultados analisados com ANOVA unilateral, seguida do pós-teste de Tukey ($p < 0,05$). Média da triplicata $\pm$ desvio padrão. (*) $p < 0,05$ com relação ao CN, (\$) $p < 0,01$ com relação ao CN e CL, (#) $p < 0,001$ com relação ao CN e CL, (@) $p < 0,01$ com relação D1 e (&) $p < 0,001$ com relação D1.

Ao avaliar a **Figura 35 a e b** ficou claro que o fotodano está diretamente relacionado com a dose de energia aplicada sobre as células B16-F10, principalmente quando tratadas com CIAIPc-NLS. Na menor dose de luz utilizada (0,50 J cm⁻²), a viabilidade das células foi reduzida

para 64,4% ($\pm 7,0$) e 54,1% ($\pm 5,0$) quando tratadas com CIAIPc livre e encapsulada, respectivamente. Esses resultados demonstraram maior sensibilidade das células B16-F10 ao tratamento com o FS encapsulado ($p < 0,001$), que apresentou maior efeito tóxico comparado com o FS livre ($p < 0,05$), na menor dose de luz aplicada. Aumentando a dose de luz para $1,0 \text{ J cm}^{-2}$, o grupo tratado com a ftalocianina encapsulada teve uma forte redução de células viáveis, caindo para 26,2% ($\pm 0,5$), enquanto não se observou queda da viabilidade das células tratadas com a ftalocianina livre. Na maior dose de energia irradiada ($2,0 \text{ J cm}^{-2}$) a fração de células viáveis tratadas com CIAIPc-NLS foi de 15,1% ($\pm 2,0$) contra 48,9% ($\pm 19,1$) do grupo tratado com CIAIPc-Et. As células tratadas somente com o meio de cultura e irradiadas com $2,0 \text{ J cm}^{-2}$ tiveram redução de menos de 10% da viabilidade celular, sem alteração significativa ($p > 0,05$) em relação ao controle negativo, ou seja, a maior dose de luz não apresentou toxicidade para as células na ausência de CIAIPc.

Diante destes resultados torna-se evidente que a resposta fotodinâmica com a ftalocianina encapsulada nas NLS foi mais eficiente, pois com a irradiação da maior dose de luz a viabilidade celular foi 3,2 vezes menor comprando-as com as células tratadas com o FS livre.

A baixa solubilidade da CIAIPc em água, assim como ocorre com a maior parte dos fármacos fotossensibilizantes, representa um grande desafio para sua aplicação na TFD, pois as moléculas de FS hidrofóbicos tendem a se agregar no meio fisiológico, dificultando sua administração in vivo, e causando redução drástica de sua atividade fotodinâmica pela perda das propriedades fotofísicas presentes apenas na forma monomérica da ftalocianina. Essa pode ser considerada a maior limitação para aplicação clínica da TFD. Nesse contexto, a associação da nanotecnologia com os fármacos fotossensibilizantes representa uma ótima solução para aumentar a biodisponibilidade de FS hidrofóbicos, além de proteger o ativo contra degradação. Portanto, sugere-se que a maior fototoxicidade da ftalocianina encapsulada comparada com a livre é decorrente do papel que as nanopartículas lipídicas sólidas desempenharam veiculando o FS em sua forma monomérica para dentro das células, sem perder sua capacidade de absorver a luz e produzir espécies reativas de oxigênio capazes de causar a morte das células B16-F10 (BECHET et al., 2008; CHATTERJEE, FONG e ZHANG, 2008; PASZKO et al., 2011; ZHAO et al., 2013).

O tratamento do câncer de pele do tipo melanoma pigmentado com a Terapia Fotodinâmica utilizando FS de primeira geração enfrenta um obstáculo que é a presença do pigmento melanina nas células neoplásicas. A melanina funciona como um fotoprotetor, que possui forte absorção de luz na região entre 400 e 750 nm (absorção máxima em 530 nm), competindo com

o FS pela luz utilizada na aplicação da TFD. Para driblar esse obstáculo, estudos com FS de segunda geração, que absorvem em outras bandas de luz, como as ftalocianinas (670 – 680 nm), tem apresentado excelentes resultados, sugerindo que a presença da melanina nas células neoplásicas não é mais um problema para o tratamento de tumores pigmentados com TFD (DAVIDS e KLEEMANN, 2011; NIGHSWANDER-REMPEL et al., 2005; SHARMA e DAVIDS, 2012; ZHAO et al., 2013). Isso pode ser comprovado com os resultados obtidos, visto que o tratamento do melanoma pigmentado com ClAlPc, livre ou encapsulada, na TFD com aplicação da menor dose de luz ($0,5 \text{ J cm}^{-2}$) já foi suficiente para apresentar efeito tóxico em relação ao controle ($p < 0,05$ para ClAlPc-Et e $p < 0,001$ para ClAlPc-NLS). Com base nesses resultados, pode-se concluir que a presença da melanina na célula neoplásica não impediu a ação fotodinâmica desse FS.

4.2 PARA AS VESÍCULAS CATANIÔNICAS

4.2.1 Preparo, aprimoramento e caracterização das vesículas cataniônicas.

De forma geral, moléculas de tensoativos em solução aquosa tendem a se orientar nas interfaces óleo – água ou água – ar, de forma a reduzir a tensão interfacial. As moléculas do tensoativo TriCat 12, produzido no laboratório IMRCP (França), possuem a característica de se associarem espontaneamente, quando adicionados em meio aquoso, denominadas de vesículas cataniônicas (BOUDIER et al., 2011; CONSOLA et al., 2007; SOUSSAN et al., 2008).

Tanto a produção do tensoativo TriCat 12 como a caracterização das VesCat foram avaliados por CASTAGNOS, P. (2011). Porém, o fato de um novo lote do tensoativo (lote JVO36) ter sido sintetizado para a obtenção das VesCat no presente trabalho acarretou em alterações nas características físicas das mesmas, como será discutido a seguir. Para avaliar a reprodutibilidade das vesículas cataniônicas com o TriCat 12 (lote JVO36), a estabilidade das mesmas foi monitorada por meio da avaliação dos parâmetros do diâmetro hidrodinâmico e do índice de polidispersão.

As VesCat vazias produzidas por CASTAGNOS, P. (2011) em água ultrapura apresentaram tamanho médio de 201 nm e $PdI = 0,18$. A estabilidade das VesCat obtidas, seguindo o mesmo protocolo e utilizando o novo lote de TriCat 12, foi avaliada por 15 dias e os dados encontram-se na **Figura 36**.

Figura 36. Gráficos com valores médios do tamanho (*z-average*, em barras), do índice de polidispersão (em linhas) das vesículas cataniônicas (VesCat) vazias para estudo de estabilidade no período de 15 dias, com análise de variância ANOVA unilateral, seguida do pós-teste de *Tukey* ($p < 0,05$). Média da triplicata $\pm$ desvio padrão.

Pode-se observar que o valor do diâmetro médio se manteve estável (~ 197 nm), sem alterações significativas durante o período monitorado. Já o valor do índice de polidispersão ($PdI = 0,352$) aumentou consideravelmente, quando comparado ao PdI das VesCat anteriormente produzidas, sem alteração durante os 15 dias de monitoramento. Além da mudança do lote de TriCat 12, existe outro fator que pode ter sido a causa dessa diferença no valor de PdI : A formulação de VesCat produzida por CASTAGNOS, P. (2011) foi filtrada em filtro de membrana de $0,45 \mu\text{m}$ logo após sua obtenção. Essa etapa de filtração não foi repetida neste procedimento, visto que o tamanho médio dos agregados foi reprodutível.

Segundo o trabalho desenvolvido por CASTAGNOS et al. (2014), para a produção de 3,0 mL da formulação de VesCat/CIAIPc foi adicionada 5% da solução-estoque de CIAIPc em acetona. Portanto, uma etapa de remoção do solvente foi necessária após a sonicação e obtenção das nanovesículas. O protocolo definido para evaporação da acetona à pressão reduzida foi com pressão à 50 mBar, em banho-maria mantido à 40°C , durante 30 min. As características das VesCat reproduzidas seguindo este protocolo, acompanhadas durante 5 dias, são mostradas na **Figura 37**.

Figura 37. Gráficos com valores médios do tamanho (*z-average*, em barras), do índice de polidispersão (em linhas) para estudo de estabilidade no período de 5 dias das vesículas cataniônicas contendo ftalocianina de cloro alumínio (VesCat/CIAIPc) produzidas com remoção da acetona por evaporação à pressão reduzida durante 30 min, à 50 mBar e 40 °C. Resultados com análise de variância ANOVA unilateral, seguida do pós-teste de *Tukey* ($p < 0,05$). Média da triplicata $\pm$ desvio padrão.

O tamanho médio inicial das vesículas cataniônicas com CIAIPc foi de 306 nm e esse valor duplicou em apenas 5 dias, sendo que no segundo dia já houve um aumento significativo do tamanho. Porém, no trabalho de CASTAGNOS et al. (2014) o sistema vesicular contendo o ativo apresentou estabilidade por mais de 30 dias. Na reprodução deste procedimento para a obtenção das VesCat/CIAIPc, houve perda do volume da formulação de mais de 95% durante a etapa de evaporação do solvente, aumentando visualmente a viscosidade da formulação. Como resultado, houve grande aumento da concentração molar de TriCat 12 com CIAIPc, fator que pode ter alterado a estabilidade das vesículas, mesmo após ressuspender as VesCat para o volume inicial de 3,0 mL. Quanto ao valor de PDI, observou-se que o mesmo variou de 0,227 a 0,408, porém, sem alterações significativas.

Visando obter VesCat/CIAIPc com as mesmas características físico-químicas mencionadas no trabalho anterior, alguns parâmetros nessa etapa de evaporação do solvente foram aprimorados.

No processo de evaporação à pressão reduzida, utilizando banho-maria à temperatura de 40 °C, a pressão de vapor da água corresponde a 72 mBar e da acetona é de 556 mBar. Considerando essas informações, o aprimoramento da etapa de evaporação do solvente resultou no aumento da pressão de 50 para 100 mBar, com redução do tempo de 30 para 5 min. Desta forma, a pressão utilizada garantiu a remoção da acetona sem perda considerável do volume da formulação.

A estabilidade das VesCat/CIAIPc obtidas seguindo o protocolo aprimorado de evaporação do solvente encontra-se na **Figura 38**.

Figura 38. Gráficos com valores médios do tamanho (*z-average*, em barras), do índice de polidispersão (em linhas) para estudo de estabilidade no período de 5 dias das vesículas cataniônicas contendo ftalocianina de cloro alumínio produzidas com remoção da acetona por evaporação à pressão reduzida durante 5 min, com pressão de 100 mBar e à 40 °C. Resultados analisados com ANOVA unilateral, seguida do pós-teste de Tukey ($p < 0,05$). Média da triplicata $\pm$ desvio padrão.

A alteração desses parâmetros no método de produção das vesículas contendo o FS permitiu a obtenção de aglomerados com diâmetro médio de 260 nm que, mesmo sendo acima do tamanho das vesículas desenvolvidas por CASTAGNOS et al. (2014), manteve estabilidade sem alterações significativas por, pelo menos, 6 dias (tempo necessário para seu uso nos demais estudos). O índice de polidispersão variou de 0,243 a 0,300, sem diferença significativa, lembrando que no trabalho desenvolvido pelo grupo (2011), essa formulação também foi filtrada em filtro de membrana de 0,45 μ m, procedimento não efetuado neste trabalho.

Na **Tabela 14** encontram-se ilustrados as características finais das VesCat contendo ou não CIAIPc.

Tabela 14. Valores médios do diâmetro médio (*z-average*), índice de polidispersão e do potencial zeta das formulações de vesículas cataniônicas (VesCat), carregadas ou não com ftalocianina de cloro alumínio (CIAIPc), após aprimoramento do processo de obtenção das mesmas. Média da triplicata $\pm$ desvio padrão.

Formulações	Diâmetro médio (nm)	Índice de polidispersão	Potencial zeta (mV)
VesCat vazia	197,0 ($\pm 5,9$)	0,352 ($\pm 0,029$)	-28,2 ($\pm 2,1$)
VesCat/CIAIPc	261,8 ($\pm 7,3$)	0,279 ($\pm 0,064$)	-23,7 ($\pm 0,3$)

As diferenças observadas comparando-se as características das VesCat vazias com as VesCat/CIAIPc não podem ser atribuídas apenas à incorporação da ftalocianina na nanoestrutura. O método de obtenção das VesCat/CIAIPc apresenta uma etapa adicional de remoção do solvente com relação à produção das VesCat vazias, que pode ser o motivo de tal diferença. De forma geral, ambas apresentaram tamanho nanométrico, inclusive dentro do intervalo já relatado para vesículas cataniônicas como descrito por BLANZAT et al. (1999b) (entre 10 e 500 nm), SOUSSAN et al. (2008) (150 até 400 nm) ou CONSOLA et al. (2007) (entre 20 e 280 nm). O potencial zeta negativo das vesículas estão de acordo com os valores encontrados por CASTAGNOS, P. (2011) e confere boa estabilidade para os aglomerados em suspensão. Sabe-se que as VesCat são constituídas de uma mistura equimolar de cátions e ânions, portanto, assume-se que a carga negativa na superfície das vesículas é advinda de uma distribuição espacial não homogênea das cargas de seu tensoativo.

4.2.2 Efeito da adição do glicerol nas propriedades das vesículas cataniônicas.

Agentes crioprotetores são considerados fundamentais para manter a integridade da estrutura de nanopartículas e de material biológico durante a redução de temperatura, evitando a fusão/agregação das mesmas. A quantidade do crioprotetor utilizada varia, na literatura, de 2 a 30% (m/m), dependendo da via de administração do sistema e da toxicidade do crioprotetor (LEE e NAM, 2015; NIGHSWANDER-REMPEL et al., 2005).

Neste estudo, o crioprotetor foi adicionado à formulação para posterior estudo morfológico das nanoestruturas, portanto ele não pode alterar as características físicas das vesículas cataniônicas. Com o intuito de avaliar o efeito da adição do glicerol nas propriedades das VesCat, as concentrações 2, 5, 7 e 10% (m/m) foram avaliadas em formulação de VesCat/CIAIPc.

O valor médio do tamanho e índice de polidispersão das VesCat/CIAIPc com as diferentes concentrações de glicerol estão apresentados na **Tabela 15**.

Tabela 15. Valores médios do diâmetro médio (*z-average*) e índice de polidispersão das formulações de vesículas cataniônicas com ftalocianina de cloro alumínio (VesCat/CIAIPc) contendo diferentes concentrações de glicerol. Resultados analisados com ANOVA bilateral, seguida do pós-teste de Bonferroni ($p < 0,05$). Média da triplicata $\pm$ desvio padrão.

Concentração de glicerol (% m/m)	Tamanho médio (nm)		Índice de Polidispersão	
	1h	24h	1h	24h
0	261,8 ($\pm 7,3$)	292,5 ($\pm 14,9$)	0,279 ($\pm 0,064$)	0,270 ($\pm 0,038$)
2	283,8 ($\pm 15,7$)	271,4 ($\pm 26,6$)	0,387 ($\pm 0,058$)*	0,249 ($\pm 0,051$)
5	289,8 ($\pm 6,5$)	289,5 ($\pm 16,6$)	0,286 ($\pm 0,029$)	0,269 ($\pm 0,032$)
7	292,7 ($\pm 12,5$)	313,0 ($\pm 8,5$)	0,297 ($\pm 0,061$)	0,290 ($\pm 0,023$)
10	325,4 ($\pm 21,5$)*	319,2 ($\pm 23,6$)	0,360 ($\pm 0,053$)	0,286 ($\pm 0,036$)

* Indica que houve diferença significativa em relação à VesCat/CIAIPc sem glicerol.

Quanto ao tamanho médio, observou-se que quanto maior a quantidade de glicerol adicionada, maior o aumento do tamanho das nanopartículas, variando de 261,8 nm das VesCat/CIAIPc sem glicerol até 325,4 nm na concentração de 10% (m/m) do crioprotetor, sendo que nessa mais elevada concentração houve aumento significativo do tamanho ($p < 0,001$), comparado à formulação sem o glicerol. Foi observada alteração significativa do índice de polidispersão apenas das VesCat/CIAIPc com adição de 2% (m/m) de glicerol ($p < 0,05$). Portanto, avaliando os resultados de forma global, a formulação com concentração de 5% (m/m) foi escolhida para estudo de microscopia por apresentar as características de tamanho médio e PDI mais próximas das vesículas sem o crioprotetor.

4.2.3 Análise morfológica das vesículas cataniônicas.

A obtenção de imagens do sistema coloidal por microscopia eletrônica de varredura, utilizando a técnica de crio-fratura, foi de extrema importância para comprovar a formação das nanoestruturas, visto que o método de obtenção das vesículas cataniônicas foi aprimorado, além da mudança do lote do tensoativo TriCat 12.

A partir dos resultados obtidos no estudo anterior, foram analisadas formulações de VesCat/CIAIPc contendo 5% (m/m) de glicerol (**Figura 39 a e b**) e sem a presença do crioprotetor (**Figura 39 c e d**).

Figura 39. Fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura, utilizando a técnica de crio-fratura, das formulações de **(a e b)** vesículas cataniônicas carregadas com ftalocianina de cloro alumínio contendo 5% (m/m) de glicerol, **(c e d)** vesículas cataniônicas com ftalocianina de cloro alumínio sem o crioprotetor e **(e e f)** vesículas cataniônicas vazias sem crioprotetor.

Comparando as imagens com e sem glicerol, observou-se que a presença do crioprotetor não foi fundamental para viabilizar a análise das vesículas cataniônicas por MEV com crio-fratura,

pois na ausência do mesmo também foi possível obter imagens das nanoestruturas. Portanto, foram realizadas análises das VesCat vazias sem a presença do crioprotetor (**Figura 39 e f**). De forma geral, observou-se que as vesículas cataniônicas, com e sem o FS, apresentaram formato predominantemente esférico e arredondado, como demonstrado por RICO-LATTES et al. (2005) e SOUSSAN et al. (2008). Na **Figura 39 d** das vesículas contendo o FS, observou-se a presença de grandes estruturas e sugere-se que as mesmas podem ter sido formadas devido à ausência do crioprotetor.

Estas análises complementam os estudos de caracterização das VesCat, contendo ou não CIAIPc, fornecendo imagens que comprovem a formação espontânea das nanovesículas unilamelares com o novo lote do tensoativo TriCat 12 em água, após o aprimoramento do protocolo de obtenção das mesmas, com tamanho de acordo com resultados obtidos por PCS, na **Tabela 14** do item 4.2.1, com diâmetro médio de até ~200 nm para VesCat vazias e ~280 nm para VesCat/CIAIPc.

4.2.4 Desenvolvimento de métodos analíticos espectrofluorimétricos para quantificação de CIAIPc.

Todos os métodos analíticos para quantificação de CIAIPc desenvolvidos no laboratório francês utilizaram a técnica de espectroscopia de emissão de fluorescência, visto que houve a necessidade de desenvolver métodos mais sensíveis para analisar pequenas quantidades da ftalocianina. Como discutido no item 4.1.6, CIAIPc possui ótima emissão de fluorescência, característica que viabilizou esses estudos.

Os 3 métodos desenvolvidos para a quantificação de CIAIPc nas formulações de VesCat (em metanol e água na proporção 9:1, v/v), permeada no meio receptor das células de Franz (mistura de PBS e etanol na proporção 1:1, v/v) e retida na pele (em metanol puro) apresentaram o mesmo perfil, exemplificado na **Figura 40**, pelos espectros de emissão de fluorescência de CIAIPc obtidos na mistura de PBS e etanol, na proporção de 1:1 (v/v), característicos desta ftalocianina.

Figura 40. Espectros de emissão de fluorescência da ftalocianina de cloro alumínio obtidos na mistura de solventes PBS e etanol, na proporção de 1:1 (em volume), com comprimento de onda de emissão máximo em 679 nm. A equação da reta obtida foi $y = 14401009 x + 9773$, com coeficiente de correlação linear $r = 0,999$.

No caso dos espectros obtidos na **Figura 40**, ClAlPc foi avaliado na mistura de PBS e etanol (1:1, v/v), pois essa mistura de solventes foi utilizada no meio receptor das células de Franz para análise da permeação da ftalocianina através da pele (item 4.2.7). A linearidade foi registrada no intervalo de $0,009 - 0,115 \mu\text{g mL}^{-1}$ de ClAlPc, com emissão máxima de fluorescência no comprimento de onda de 679 nm e abertura espectral de 4 e 2 nm. A curva linear está ilustrada na **Figura 41 a**, e a equação da reta obtida foi $y = 14401009 x + 9773$, com coeficiente de correlação linear $r = 0,999$.

Figura 41. Gráficos das curvas-padrão de calibração, relacionando a concentração de ftalocianina de cloro alumínio (ClAlPc) versus emissão de fluorescência, das linearidades construídas em (a) mistura de solventes PBS e etanol (1:1, em volume), (b) metanol puro e (c) mistura de solventes metanol e água (9:1, em volume).

Na **Figura 41 b** encontra-se ilustrada a curva-padrão da linearidade desenvolvida para ClAlPc em metanol puro, método utilizado para quantificar a ftalocianina retida na pele, avaliada no item 4.2.7 e para cálculo da eficiência de encapsulação, descrito no item 4.2.5. Os espectros foram obtidos no intervalo de 0,05 e 0,45 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de ClAlPc, com abertura espectral de 2 nm e pico de emissão de fluorescência em 674 nm. Foi obtida a equação da reta $y = 2968281x + 122805$ com coeficiente de correlação $r = 0,999$.

A mistura de metanol e água na proporção de 9:1 (v/v) para quantificação de ClAlPc nas formulações de vesículas cataniônicas (item 4.2.5) também utilizou 2 nm como abertura espectral das análises no intervalo de concentração de 0,05-0,55 $\mu\text{g mL}^{-1}$, obtendo emissão máxima de fluorescência em 678 nm. A partir da curva padrão (**Figura 41 c**) obteve-se o coeficiente linear para o método analítico $r = 0,999$ e equação da reta $y = 2856714x + 143787$.

Para os três métodos desenvolvidos, foram obtidos coeficientes de correlação linear satisfatórios, segundo as normas da RE nº 899 (ANVISA, 2003; SIQUEIRA-MOURA et al., 2010).

Avaliando os resultados da ANOVA unilateral dos métodos desenvolvidos na **Tabela 16**, observou-se que os valores de F calculados para os modelos lineares foram maiores que os valores de F tabelados, com $p < 0,05$. Isso indica que as equações de regressão linear são estatisticamente significativas dentro do intervalo de confiança de 95%. Também foi observado que não houve falta de ajuste ($p > 0,05$) para as equações lineares.

Tabela 16. Resultados das análises de variância (ANOVA) unilateral para o modelo linear dos mínimos quadrados e para o teste da falta de ajuste (*Lack of Fit*), com nível de significância $p < 0,05$ dos 3 métodos analíticos desenvolvidos para o trabalho com vesículas cataniônicas.

Solventes	Parâmetros	Graus de liberdade	F calculado	F tabelado	p valor
Metanol e água (9:1, em volume)	Modelo linear	1	7803,2	4,2	0,0001 ^a
	Resíduos	33			
	Falta de ajuste	5	2,25	2,78	0,0940 ^b
	Erro Puro	28			
Metanol puro	Modelo linear	1	23651,2	4,2	0,0001
	Resíduos	28			
	Falta de ajuste	4	2,59	2,78	0,0620
	Erro Puro	24			
PBS e etanol (1:1, em volume)	Modelo linear	1	28098,3	4,1	0,0001
	Resíduos	46			
	Falta de ajuste	6	0,18	2,34	0,9820
	Erro Puro	40			

^a valor de $p < 0,05$ rejeita a hipótese nula (aceita o modelo linear)

^b valor de $p > 0,05$ aceita a hipótese nula (rejeita a falta de ajuste)

Pode-se concluir que a resposta do equipamento gera resultados linearmente relacionados à concentração do FS, enquadrados nas faixas analíticas avaliadas. Portanto, dentro dos intervalos especificados, as análises espectrofluorimétricas das amostras são diretamente proporcionais às concentrações de CIAIPc.

Quanto aos limites de detecção e quantificação, os mesmos foram determinados a partir das curvas de calibração construídas para obtenção das linearidades e são mostradas na **Tabela 17**.

Tabela 17. Valores dos limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) determinados para os métodos analíticos desenvolvidos para o trabalho com vesículas cataniônicas.

	Metanol puro	Metanol e água (9:1, em volume)	PBS e etanol (1:1, em volume)
LD (ng mL^{-1})	7,0	4,0	2,0
LQ (ng mL^{-1})	24,0	15,0	6,0

De acordo com os resultados, os métodos demonstraram ser sensíveis a pequenas variações da concentração da ClAlPc, considerado adequado para análises que exigem detecção de uma concentração baixa do ativo.

4.2.5 Doseamento de ClAlPc associado às vesículas cataniônicas.

A quantificação do conteúdo total do FS nas formulações de vesículas cataniônicas, assim como a determinação de ClAlPc livre no meio aquoso, foram realizadas utilizando os métodos espectrofluorimétricos desenvolvidos no item anterior.

O *drug loading* obtido para as formulações de VesCat/ClAlPc produzidas neste estudo foi de 47,1% (± 6.9). Esse baixo valor pode ser justificado devido á perdas obtidas no próprio processo para sua obtenção. Uma grande perda de ClAlPc foi observada no momento da produção das VesCat/ClAlPc, já na etapa de sonicação, quando se observou a formação de um “filme” azul (coloração característica do fotossensibilizante) na própria sonda utilizada. Na etapa seguinte de evaporação do solvente à pressão reduzida, mesmo que por um curto período de tempo, também foi observada essa coloração azulada na parte interna do balão utilizado no processo. Outra possível causa para o baixo valor de *drug loading* pode ser a concentração de TriCat 12 (1×10^{-4} M) que talvez não seja suficiente para incorporar com eficiência toda a ftalocianina adicionada à formulação. O uso de uma maior concentração de TriCat 12 para a formação de vesículas cataniônicas já foi reportado em outros estudos (BOUDIER et al., 2011; BEAUNE et al., 2009), que utilizaram 1×10^{-3} M do pó liofilizado deste tensoativo em água.

A eficiência de encapsulação de ClAlPc nas nanovesículas foi considerada de aproximadamente 100%, visto que a concentração de ClAlPc avaliada manteve-se abaixo do limite de detecção do método desenvolvido.

4.2.6 Estabilidade das VesCat/CIAIPc acondicionadas à 32 °C.

Para o estudo *in vitro* de permeação e retenção utilizando células de difusão do tipo Franz, o meio receptor foi mantido a 37 °C para alcançar a temperatura de 32 °C no lado externo da pele. Neste caso, amostras das VesCat/CIAIPc são depositadas sobre a pele da orelha de porco aquecida, onde permanece durante todo o estudo. A avaliação da estabilidade das formulações em função da temperatura é fundamental para a determinação do período de tempo em que elas mantém suas características físicas e, portanto, podem ser utilizadas nesse estudo.

Os resultados da avaliação de estabilidade das VesCat/CIAIPc são mostrados na **Tabelas 18**.

Tabela 18. Valores médios do diâmetro (*z-average*) e índice de polidispersão das formulações de vesículas cataniônicas com ftalocianina de cloro alumínio (VesCat/CIAIPc) armazenadas à 4, 25 e 32 °C, durante 48 h. Resultados analisados com ANOVA bilateral, seguida do pós-teste de *Bonferroni* ($p < 0,05$). Média da triplicata $\pm$ desvio padrão.

Tempo	4 °C	25 °C	32 °C
Tamanho médio (nm)			
0 h	270,4 ($\pm 3,4$)	283,1 ($\pm 12,1$)	278,8 ($\pm 1,4$)
24 h	311,7 ($\pm 9,9$)	292,5 ($\pm 14,9$)	443,7 ($\pm 25,7$) *
48 h	265,4 ($\pm 8,6$)	285,4 ($\pm 6,6$)	682,2 ($\pm 31,6$) *
Índice de polidispersão			
0 h	0,294 ($\pm 0,030$)	0,320 ($\pm 0,017$)	0,309 ($\pm 0,029$)
24 h	0,307 ($\pm 0,044$)	0,270 ($\pm 0,022$)	0,419 ($\pm 0,044$)
48 h	0,292 ($\pm 0,009$)	0,263 ($\pm 0,031$)	0,709 ($\pm 0,034$) *

* Indica que houve diferença significativa em relação à VesCat/CIAIPc acondicionadas à 4 °C.

Como pode ser visto, as VesCat/CIAIPc acondicionadas à 4 °C ou 25 °C sofreram variações mínimas nos parâmetros analisados, sem alterações significativas durante as 48 h de avaliação. Da mesma forma, o caráter homogêneo da formulação permaneceu praticamente inalterado. Porém, quando a formulação foi mantida à 32 °C, comparando com as formulações à 4 °C, observou-se aumento de 35% do PdI e de 60% no tamanho médio ($p < 0,001$) nas primeiras 24 h de análise e, após 48 h, observou-se variação significativa de ambos os parâmetros, com aumento de pelo menos 200%. Esses resultados indicaram que a partir de 24 h de exposição das formulações mantidas à 32 °C há alteração significativa das características físicas das nanovesículas. Portanto, após este período de tempo, as VesCat/CIAIPc não podem mais serem consideradas estáveis, inviabilizando seu uso em outros estudos.

4.2.7 Estudos de permeação e retenção cutânea *in vitro* de CIAIPc veiculada nas Vescat.

Nos estudos de permeação cutânea *in vitro* com duração de 8 h, as concentrações de CIAIPc avaliadas nas alíquotas coletadas do meio doador durante o experimento foram abaixo do limite de detecção determinado para o método espectrofluorimétrico correspondente (item 4.2.4). Portanto, concluiu-se que a ftalocianina não permeou a pele, evitando-se assim efeitos sistêmicos indesejados.

Ao fim do experimento, o estrato córneo (EC) foi removido por *tape stripping* e tratado separadamente do restante da epiderme viável e derme, que foram homogeneizados. Nos dois casos as amostras foram deixadas em metanol puro para posterior análise por espectroscopia de emissão de fluorescência nas condições obtidas pelos métodos descritos no item 4.2.4.

No estudo de retenção do FS na pele foi observada uma taxa de acúmulo de CIAIPc de $0,017 \mu\text{g cm}^{-2}$ de CIAIPc no extrato córneo, porém, não se observou acúmulo do FS na derme e epiderme viável. Uma possível causa para esse resultado pode ser que o tempo total de experimento de 8 h não tenha sido suficiente para haver a penetração do ativo até camadas mais internas da pele.

Uma forte interação entre o fármaco e as vesículas já foi relatado por SOUSSAN et al. (2008) e ZHAO et al. (2013), evidenciada em estudos de diálise utilizando vesículas cataniônicas contendo outros fármacos hidrofóbicos. Nestes trabalhos foi demonstrado que os ativos utilizados apresentaram forte ligação com a vesícula, concluindo que apenas as moléculas dos ativos não encapsuladas atravessaram a membrana sintética. Foi demonstrado também que nos estudos de diálise utilizando vesículas cataniônicas, as mesmas mantiveram sua estabilidade mesmo sob a pressão osmótica gerada no experimento, assumindo que as estruturas vesiculares não foram rompidas.

Entretanto, no trabalho desenvolvido por CONSOLA et al. (2007), a avaliação da permeação e retenção *in vitro* da indometacina veiculada nas vesículas cataniônicas, utilizando a pele da orelha de porco, demonstrou a ocorrência de permeação e retenção do fármaco em um experimento de 24 h de duração e adicionando o equivalente a 200 mg do fármaco. Esses resultados indicaram que o sistema vesicular apresentou liberação controlada do ativo, funcionando como reservatório. Também foi concluído que a indometacina, quando nas vesículas cataniônicas, apresentaram maior acúmulo na pele do que em sua forma livre.

Portanto, estudos anteriores demonstraram que as vesículas cataniônicas funcionam como um sistema de liberação controlada e favorecem o acúmulo de fármacos hidrofóbicos na pele.

Porém, sugere-se que este resultado não foi obtido neste estudo em função da baixa concentração de CIAIPc nas vesículas cataniônicas adicionadas no meio doador ou que o tempo do experimento não foi suficiente para viabilizar a liberação controlada da CIAIPc veiculada para apresentar a retenção nas camadas mais profundas da pele.

5. CONCLUSÃO

Neste trabalho foi possível desenvolver com sucesso o sistema de nanopartículas lipídicas sólidas, por emulsificação direta, e aprimorar o método de obtenção das vesículas cataniônicas. As formulações obtidas apresentaram partículas em dimensões nanométricas e foram capazes de veicular o fármaco fotossensibilizante, com grande potencial para aplicação na terapia fotodinâmica.

No desenvolvimento das nanopartículas lipídicas sólidas, com base no diagrama de fases, foi observada a influência do tipo de lipídio sólido empregado (compritol ou ácido esteárico) e da proporção entre os componentes da formulação sobre as características físico-químicas das formulações finais. O compritol foi o lipídio mais adequado para compor a formulação de NLS, estabilizada pelos tensoativos isoestearato de sorbitano e óleo de rícino hidrogenado 40-OE, em água ultrapura, resultando em partículas com tamanho médio entre 100 e 200 nm e com baixa polidispersão.

A ftalocianina de cloro alumínio foi incorporada com sucesso nas NLS em 7 diferentes concentrações, demonstrando que o sistema apresenta grande capacidade de incorporação do fármaco altamente hidrofóbico. Não foram observadas diferenças significativas entre as características físico-químicas das nanopartículas lipídicas sólidas contendo ou não ClAlPc.

Foi possível obter vesículas cataniônicas utilizando o novo lote do tensoativo TriCat 12 mantendo as características físico-químicas dos trabalhos anteriores. O processo de obtenção aprimorado das vesículas cataniônicas contendo ClAlPc proporcionou redução superior a 50% no tempo total de produção, sem alteração das características físico-químicas das nanovesículas, com tamanho reduzido de partícula, baixa polidispersão

A avaliação morfológica das VesCat e das NLS, vazias ou com ftalocianina, confirmou a formação de partículas esféricas e arredondadas com tamanhos nanométricos correspondentes aos obtidos por PCS.

As NLS são bastante estáveis, visto que elas são estabilizadas tanto pela carga elétrica negativa das nanoestruturas quanto pelo impedimento estérico dos grupamentos presentes nos tensoativos. A elevada estabilidade foi comprovada no estudo de estabilidade ao longo do tempo, realizado durante 24 meses, quando armazenadas à 4 °C, sem diferenças significativas do tamanho médio, índice de polidispersão e potencial zeta das formulações, e no estudo da

estabilidade acelerada utilizando o *LUMiSizer*, com previsão da estabilidade das NLS por 12 meses à 25 °C.

As análises da estrutura cristalina do lipídio sólido nas NLS indicaram a formação de diferentes estruturas polimórficas e menor grau de cristalinidade da matriz lipídica das nanopartículas comparadas com o lipídio puro, confirmando a maior desorganização da rede cristalina das NLS, sem grandes alterações durante 24 meses de estocagem. Esses resultados também evidenciaram ótimas propriedades para encapsulação de fármacos lipofílicos, possibilitando maior acomodação da ftalocianina, além de comprovar a ausência de fenômenos de instabilidade, como: expulsão do fármaco durante estocagem, fenômeno da gelificação ou formação de gotículas super-resfriadas.

Os métodos analíticos para quantificação de CIAIPc, desenvolvidos por espectroscopia de UV-visível ou de emissão de fluorescência, foram lineares, eficientes e reprodutíveis, capazes de determinar pequenas quantidade do fotossensibilizante.

A aplicação *in vitro* de CIAIPc veiculada nas nanopartículas lipídicas, sobre a pele dorsal da orelha de porco, evidenciou maior retenção do fotossensibilizante nas camadas mais profundas da pele, não sendo detectado traços da ftalocianina no meio receptor, sugerindo que não houve permeação do mesmo. Os dados obtidos favorecem o uso desse nanocarreador no tratamento do melanoma pigmentado ou de outras doenças cutâneas, ou ainda em outros segmentos farmacêuticos e cosméticos, podendo eliminar a possibilidade de efeitos adversos por via sistêmica. Já com o sistema vesicular, a ftalocianina não alcançou as camadas mais profundas da pele, ficando retida no estrato córneo, talvez pela baixa quantidade do fármaco na formulação ou pelo tempo de duração do experimento não ter sido adequado. Porém, outros estudos demonstraram que as vesículas cataniônicas apresentaram liberação de fármacos lipofílicos quando em maior concentração na formulação.

As NLS apresentaram biocompatibilidade com linhagem de fibroblastos NIH-3T3. Não foi observado efeito tóxico da ftalocianina encapsuladas nas NLS sobre a linhagem melanocítica B16-F10 no escuro. A CIAIPc encapsulada nas NLS apresentou ótima atividade fotodinâmica, causando morte celular significativa das células de melanoma. O fotodano foi dependente da dose de irradiação aplicada no melanoma maligno. Enfim, o uso das nanopartículas lipídicas sólidas para a veiculação da ftalocianina de cloro alumínio apresenta grande potencial na aplicação da terapia fotodinâmica, conforme demonstrado pela expressiva redução da viabilidade celular das B16-F10 comparando com a morte celular causada com a CIAIPc livre.

Portanto, pode-se concluir que esse trabalho possibilitou obter nanocarreadores biocompatíveis, com ótimas propriedades físico-químicas e fotodinâmicas e que viabilizam a aplicação de fármacos fotossensibilizantes hidrofóbicos em meio biológico. Pode-se dizer que os produtos, protocolos e técnicas estudados e desenvolvidos contribuirão para a aplicação da TFD no tratamento de neoplasias e outras doenças cutâneas, através do uso da nanotecnologia, abrindo novas possibilidades para futuros estudos clínicos e pré-clínicos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

A.M.C. Is my calibration linear?, *Analyst*,

London: The Royal Society of Chemistry, v. 119, p. 2363-2366, 1994.

ABURAHMA, M. H.; BADR-ELDIN, S. M. Compritol 888 ATO: a multifunctional lipid excipient in drug delivery systems and nanopharmaceuticals, *Expert Opinion on Drug Delivery*, London: Informa Healthcare, v. 11, p. 1865-1883, 2014.

AGOSTINIS, P.; BERG, K.; CENGEL, K. A.; FOSTER, T. H.; GIROTTI, A. W.; GOLLNICK, S. O.; HAHN, S. M.; HAMBLIN, M. R.; JUZENIENE, A.; KESSEL, D.; KORBELIK, M.; MOAN, J.; MROZ, P.; NOWIS, D.; PIETTE, J.; WILSON, B. C.; GOLAB, J. Photodynamic therapy of cancer: An update, *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, New York: American Cancer Society, v. 61, p. 250-281, 2011.

ALLISON, R. R.; SIBATA, C. H. Oncologic photodynamic therapy photosensitizers: A clinical review, *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, Amsterdam: Elsevier, v. 7, p. 61-75, 2010.

ALMEIDA, E. D. P.; COSTA, A. A.; SERAFINI, M. R.; ROSSETTI, F. C.; MARCHETTI, J. M.; SARMENTO, V. H. V.; NUNES, R. S.; VALERIO, M. E. G.; ARAÚJO, A. A. S.; LIRA, A. A. M. Preparation and characterization of chloroaluminum phthalocyanine-loaded solid lipid nanoparticles by thermal analysis and powder X-ray diffraction techniques, *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, v. 108, p. 191-196, 2012.

ALMEIDA, E. D. P. **Desenvolvimento de partículas lipídicas contendo alumínio-cloroftalocianina para aplicação na terapia fotodinâmica do câncer de pele.** 2015. 83 f. Mestrado - Universidade Federal de Sergipe, Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, São Cristóvão, 2015.

ANTON, N.; BENOIT, J. P.; SAULNIER, P. Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates – A review, *Journal of Controlled Release*, Amsterdam: Elsevier, v. 128, p. 185-199, 2008.

ANTON, N.; GAYET, P.; BENOIT, J. P.; SAULNIER, P. Nano-emulsions and nanocapsules by the PIT method: An investigation on the role of the temperature cycling on the emulsion phase inversion, *International Journal of Pharmaceutics*, Amsterdam: Elsevier/North-Holland Biomedical Press, v. 344, p. 44-52, 2007.

ANTON, N.; VANDAMME, T. F. The universality of low-energy nano-emulsification, *International Journal of Pharmaceutics*, Amsterdam: Elsevier/North-Holland Biomedical Press, v. 377, p. 142-147, 2009.

ANVISA. *Resolução Específica nº899, de 29 de maio de 2003 - Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos.* Brasília, DF: Diário Oficial da União, Poder Executivo. 29 May 2003.

- ANVISA. *Resolução Específica nº 1, de 29 de julho de 2005 - Guia para a realização de estudos de estabilidade*. Brasília, DF: Diário Oficial da União, Poder Executivo. 29 Jul 2005.
- ATTWOOD, D.; FLORENCE, A. T. **Princípios Físico-Químicos em Farmácia** 4 ed. 2003.
- Avci P., G. K. Gupta, M. Kawakubo, and M. R. Hamblin. **Photodynamic Therapy for Melanoma: Efficacy and Immunologic Effects**, Bellingham: SPIE, 28 Feb 2014. 894403-894410.
- BABILAS, P.; SCHREML, S.; LANDTHALER, M.; SZEIMIES, R. M. Photodynamic therapy in dermatology: state-of-the-art, *Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine*, Oxford: Munksgaard, v. 26, p. 118-132, 2010.
- BALDEA, I.; FILIP, A. G. Photodynamic therapy in melanoma--an update, *Journal Of Physiology and Pharmacology*, Krakow: Polish Physiological Society, v. 63, p. 109-118, 2012.
- BEAUNE, G.; SOUSSAN, E.; BLANZAT, M.; RICO-LATTES, I.; CABUIL, V.; MÉNAGER, C. Interaction between catanionic vesicles and giant magnetic vesicles, *Comptes Rendus Chimie*, Paris: Elsevier, v. 12, p. 38-44, 2009.
- BECHET, D.; COULEAUD, P.; FROCHOT, C.; VIRIOT, M. L.; GUILLEMIN, F.; BARBERI-HEYOB, M. Nanoparticles as vehicles for delivery of photodynamic therapy agents, *Trends in Biotechnology*, Barking: Elsevier Science Publishers, v. 26, p. 612-621, 2008.
- BÉDANE, Ch. Photothérapie dynamique en dermatologie, autres indications et perspectives, *Annales de Dermatologie et de Vénéréologie*, Paris: Elsevier, v. 140, Supplement 2, p. 229-235, 2013.
- BHALEKAR, M. R.; UPADHAYA, P. G.; NALAWADE, S. D.; MADGULKAR, A. R.; KSHIRSAGAR, S. J. Anti-rheumatic activity of chloroquine-SLN gel on wistar rats using complete freund's adjuvant (CFA) model, *Indian Journal of Rheumatology*, New Delhi: Elsevier, v. 10, p. 58-64, 2015.
- BLANZAT, M.; PEREZ, E.; RICO-LATTES, I.; LATTES, A. Synthesis and anti-HIV activity of catanionic analogs of galactosylceramide, *New Journal of Chemistry*, Paris: The Royal Society of Chemistry, v. 23, p. 1063-1065, 1999a.
- BLANZAT, M.; PEREZ, E.; RICO-LATTES, I.; PROMÉ, D.; PROMÉ, J. C.; LATTES, A. New Catanionic Glycolipids. 1. Synthesis, Characterization, and Biological Activity of Double-Chain and Gemini Catanionic Analogues of Galactosylceramide (gal β 1cer), *Langmuir*, Washington, DC: American Chemical Society, v. 15, p. 6163-6169, 1999b.
- BOLFARINI, G. C.; SIQUEIRA-MOURA, M. P.; DEMETS, G. J. F.; MORAIS, P. C.; TEDESCO, A. C. In vitro evaluation of combined hyperthermia and photodynamic effects using magnetoliposomes loaded with cucurbituril zinc phthalocyanine complex on melanoma, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, Lausanne: Elsevier Sequoia, v. 115, p. 1-4, 2012.

- BOUDIER, A.; CASTAGNOS, P.; SOUSSAN, E.; BEAUNE, G.; BELKHELFA, H.; MÉNAGER, C.; CABUIL, V.; HADDIOUI, L.; ROQUES, C.; RICO-LATTES, I.; BLANZAT, M. Polyvalent catanionic vesicles: Exploring the drug delivery mechanisms, *International Journal of Pharmaceutics*, Amsterdam: Elsevier/North-Holland Biomedical Press, v. 403, p. 230-236, 2011.
- BRAMER, T.; DEW, N.; EDSMAN, K. Pharmaceutical applications for catanionic mixtures, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, London: Pharmaceutical Society of Great Britain, v. 59, p. 1319-1334, 2007.
- BRUBACH, J. B.; JANNIN, V.; MAHLER, B.; BOURGAUX, C.; LESSIEUR, P.; ROY, P.; OLLIVON, M. Structural and thermal characterization of glyceryl behenate by X-ray diffraction coupled to differential calorimetry and infrared spectroscopy, *International Journal of Pharmaceutics*, Amsterdam: Elsevier/North-Holland Biomedical Press, v. 336, p. 248-256, 2007.
- ÇAKIR, V.; ÇAKIR, D.; PISKIN, M.; DURMUS, M.; BIYIKLIOGLU, Z. Water soluble peripheral and non-peripheral tetrasubstituted zinc phthalocyanines: Synthesis, photochemistry and bovine serum albumin binding behavior, *Journal of Luminescence*, Amsterdam: Elsevier, v. 154, p. 274-284, 2014.
- CARBONE, C.; TOMASELLO, B.; RUOZI, B.; RENIS, M.; PUGLISI, G. Preparation and optimization of PIT solid lipid nanoparticles via statistical factorial design, *European Journal of Medicinal Chemistry*, Paris: Editions Scientifiques Elsevier, v. 49, p. 110-117, 2012.
- CASTAGNOS, P. **Vésicules catanioniques: design et mécanismes de délivrance de principes actifs**. 2011. 208 f. Doutorado (Tese em Química) - Université Toulouse III Paul Sabatier, Toulouse, 2011.
- CASTAGNOS, P.; SIQUEIRA-MOURA, M. P.; LEME GOTO, P.; PEREZ, E.; FRANCESCHI, S.; RICO-LATTES, I.; TEDESCO, A. C.; BLANZAT, M. Catanionic vesicles charged with chloroaluminium phthalocyanine for topical photodynamic therapy. In vitro phototoxicity towards human carcinoma and melanoma cell lines, *RSC Advances*, Amsterdam: Elsevier, v. 4, p. 39972-39377, 2014.
- CASTANO, A. P.; DEMIDOVA, T. N.; HAMBLIN, M. R. Mechanisms in photodynamic therapy: part one: photosensitizers, photochemistry and cellular localization, *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, Amsterdam: Elsevier, v. 1, p. 279-293, 2004.
- CASTANO, A. P.; DEMIDOVA, T. N.; HAMBLIN, M. R. Mechanisms in photodynamic therapy: part two: cellular signaling, cell metabolism and modes of cell death, *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, Amsterdam: Elsevier, v. 2, p. 1-23, 2005.
- Centralx Atlas. *O atlas do corpo humano*. 2015. Disponível em <http://centralx.com.br/atlas/>, acessado em 06/12/2015.
- CHATTERJEE, D. K.; FONG, L. S.; ZHANG, Y. Nanoparticles in photodynamic therapy: An emerging paradigm, *Advanced Drug Delivery Reviews*, Amsterdam: Elsevier Science Publishers, B.V., v. 60, p. 1627-1637, 2008.

- CHIU, H. T.; YANG, H. M.; LIU, C. S.; HSU, H. Y. Synthesis, Stability and Properties of Polyurethane/Acrylic Hybrids Using m-TMXDI-based Anionic Poly(urethane-urea) Dispersion, *Polymer-Plastics Technology and Engineering*, Philadelphia: Taylor & Francis Group, v. 51, p. 945-953, 2012.
- CLARK, W. H.; FROM, L.; BERNARDINO, E. A.; MIHM, M. C. The Histogenesis and Biologic Behavior of Primary Human Malignant Melanomas of the Skin, *Cancer Research*, Baltimore, v. 29, p. 705-727, 1969.
- CONSOLA, S.; BLANZAT, M.; PEREZ, E.; GARRIGUES, J. C.; BORDAT, P.; RICO-LATTES, I. Design of Original Bioactive Formulations Based on Sugar-Surfactant/Non-steroidal Anti-inflammatory Catanionic Self-Assemblies: A New Way of Dermal Drug Delivery, *Chemistry: A European Journal*, Weinheim: WILEY-VCH Verlag, v. 13, p. 3039-3047, 2007.
- DABROWSKI, J. M.; ARNAUT, L. G. Photodynamic therapy (PDT) of cancer: from local to systemic treatment, *Photochemical & Photobiological Sciences*, Cambridge, UK: The Royal Society of Chemistry, v. 14, p. 1765-1780, 2015.
- DAL PIZZOL, C. **Desenvolvimento de nanopartícula lipídica sólida contendo um análogo de pirimidina e avaliação in vitro da atividade antitumoral.** 2014. 172 f. Doutorado (Tese em Farmácia) - Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2014.
- DAS, S.; CHAUDHURY, A. Recent Advances in Lipid Nanoparticle Formulations with Solid Matrix for Oral Drug Delivery, *American Association of Pharmaceutical Scientists*, New York: Springer, v. 12, p. 62-76, 2010.
- DAS, S.; NG, W. K.; KANAUIA, P.; KIM, S.; TAN, R. B. Formulation design, preparation and physicochemical characterizations of solid lipid nanoparticles containing a hydrophobic drug: effects of process variables, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, Amsterdam; New York: Elsevier, v. 88, p. 483-489, 2011.
- DAVIDS, L. M.; KLEEMANN, B. Combating melanoma: The use of photodynamic therapy as a novel, adjuvant therapeutic tool, *Cancer Treatment Reviews*, Amsterdam: Elsevier, v. 37, p. 465-475, 2011.
- DE CARVALHO, S. M.; NORONHA, C. M.; FLORIANI, C. L.; LINO, R. C.; ROCHA, G.; BELLETTINI, I. C.; OGLIARI, P. J.; BARRETO, P. L. M. Optimization of atocopherol loaded solid lipid nanoparticles by central composite design, *Industrial Crops and Products*, Amsterdam; New York: Elsevier, v. 49, p. 278-285, 2013.
- DEBELE, T. A.; PENG, S.; TSAI, H. C. Drug Carrier for Photodynamic Cancer Therapy, *International Journal of Molecular Sciences*, Basel: MDPI, v. 16, p. 22094-22136, 2015.
- Dedavid B. A., C. I Gomes, and G. Machado. *Microscopia eletrônica de varredura : aplicações e preparação de amostras : materiais poliméricos, metálicos e semicondutores.* ed. CEMM - Centro de Microscopia e Microanálises do IDÉIAPUCRS - Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2007.

- DENIZOT, F.; LANG, R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability, ***Journal of Immunological Methods***, Amsterdam: Elsevier, v. 89, p. 271-277, 1986.
- DETLOFF, T.; SOBISCH, T.; LERCHE, D. Particle size distribution by space or time dependent extinction profiles obtained by analytical centrifugation (concentrated systems), ***Powder Technology***, Lausanne: Elsevier Sequoia, v. 174, p. 50-55, 2007.
- DOKTOROVOVA, S.; SOUTO, E. B.; SILVA, A. M. Nanotoxicology applied to solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers – A systematic review of in vitro data, ***European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics***, Amsterdam: Elsevier Science, v. 87, p. 1-18, 2014.
- DOLATABADI, J. E. N.; HAMISHEHKAR, H.; ESKANDANI, M.; VALIZADEH, H. Formulation, characterization and cytotoxicity studies of alendronate sodium-loaded solid lipid nanoparticles, ***Colloids and Surfaces B: Biointerfaces***, Amsterdam; New York: Elsevier, v. 117, p. 21-28, 2014.
- ELAKKIYA, T.; SHEEJA, R.; RAMADHAR, K.; NATARAJAN, T. S. Biocompatibility studies of electrospun nanofibrous membrane of PLLA-PVA blend, ***Journal of Applied Polymer Science***, Hoboken, NJ: A Wiley Company, v. 128, p. 2840-2846, 2013.
- ESTELLA-HERMOSO DE MENDOZA, A.; CAMPANERO, M. A.; LANA, H.; VILLA-PULGARIN, J. A.; DE LA IGLESIA-VICENTE, J.; MOLLINEDO, F.; BLANCO-PRIETO, M. J. Complete inhibition of extranodal dissemination of lymphoma by edelfosine-loaded lipid nanoparticles, ***Nanomedicine***, London: Future Medicine, v. 7, p. 679-690, 2012.
- FEINGOLD, K. R.; ELIAS, P. M. Role of lipids in the formation and maintenance of the cutaneous permeability barrier, ***Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids***, Amsterdam: Elsevier Pub. Co., v. 1841, p. 280-294, 2014.
- FERNANDEZ, P.; ANDRÉ, V.; RIEGER, J.; KÜHNLE, A. Nano-emulsion formation by emulsion phase inversion, ***Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects***, Amsterdam; New York: Elsevier, v. 251, p. 53-58, 2004.
- Ferreira M. Ácido hialurónico. 2015. Disponível em <http://apelequehabitoblog.blogspot.com.br/2015/09/acido-hialuronico.html#.VyNtIvkrKM9>, acessado em 13/01/2016.
- FICHEUX, H. Principes et applications thérapeutiques de la photothérapie dynamique, ***Annales Pharmaceutiques Françaises***, Paris: Elsevier Masson Editeur, v. 67, p. 32-40, 2009.
- FREITAS, C.; MULLER, R. H. Correlation between long-term stability of solid lipid nanoparticles (SLN) and crystallinity of the lipid phase, ***European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics***, Amsterdam: Elsevier Science, v. 47, p. 125-132, 1999.
- GANDHI, S. A.; KAMPP, J. Skin Cancer Epidemiology, Detection, and Management, ***The Medical Clinics of North America***, Philadelphia, PA: W B Saunders, v. 99, p. 1323-1335, 2015.

- GASTALDI, L.; BATTAGLIA, L.; PEIRA, E.; CHIRIO, D.; MUNTONI, E.; SOLAZZI, I.; GALLARATE, M.; DOSIO, F. Solid lipid nanoparticles as vehicles of drugs to the brain: Current state of the art, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, Amsterdam: Elsevier Science, v. 87, p. 433-444, 2014.
- GIROTTI, M. R.; SATURNO, G.; LORIGAN, P.; MARAIS, R. No longer an untreatable disease: How targeted and immunotherapies have changed the management of melanoma patients, *Molecular Oncology*, Amsterdam: Elsevier, v. 8, p. 1140-1158, 2014.
- GODIN, B.; TOUITOU, E. Transdermal skin delivery: Predictions for humans from in vivo, ex vivo and animal models, *Advanced Drug Delivery Reviews*, Amsterdam: Elsevier Science Publishers, B.V., v. 59, p. 1152-1161, 2007.
- GOKCE, E. H.; KORKMAZ, E.; TUNCAY-TANRIVERDI, S.; DELLERA, E.; SANDRI, G.; BONFERONI, M. C.; OZER, O. A comparative evaluation of coenzyme Q10-loaded liposomes and solid lipid nanoparticles as dermal antioxidant carriers, *International Journal of Nanomedicine*, Auckland: Dove Medical Press, v. 7, p. 5109-5117, 2012.
- GONZALEZ, A. G.; HERRADOR, M. A.; ASUERO, A.; SAYAGO, A. The correlation coefficient attacks again, *Accreditation and Quality Assurance*, Berlin: Springer, v. 11, p. 256-258, 2006.
- GORDON, R. Skin Cancer: An Overview of Epidemiology and Risk Factors, *Seminars in Oncology Nursing*, Philadelphia, PA: W.B. Saunders, v. 29, p. 160-169, 2013.
- GOTO, P. L. **Desenvolvimento de nanopartículas poliméricas por polimerização in situ a partir de nanoemulsões produzidas por inversão de fases.** 2011. 108 f. Mestrado (Dissertação em Ciências Farmacêuticas) - Escola de Farmácia - Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto - MG, 2011.
- GOTO, P. L.; VILELA, J. M. C.; ANDRADE, M. S.; SANTOS, O. D. H. Preparation and Characterization of Polymeric Nanocapsules Produced by in Situ Polymerization From Nanoemulsions Produced by Direct Emulsification, *Journal of Dispersion Science and Technology*, New York: M. Dekker, v. 34, p. 228-233, 2012.
- GRIFFIN, W. C. Classification of Surface Active Agents by HLB, *Journal of Cosmetic Science*, New York, NY: Society of Cosmetic Chemists, v. 1, p. 311-326, 1949.
- GRIFFIN, W. C. Calculation of HLB values of Nonionic Surfactants, *Journal of Cosmetic Science*, New York, NY: Society of Cosmetic Chemists, v. 5, p. 249-256, 1954.
- HADJUR, C.; RICHARD, M. J.; PARAT, M. O.; JARDON, P.; FAVIER, A. Photodynamic Effects of Hypericin on Lipid Peroxidation and Antioxidant Status in Melanoma Cells, *Photochemistry and Photobiology*, Lawrence KS: American Society for Photobiology, v. 64, p. 375-381, 1996.
- HEURTAULT, B.; SAULNIER, P.; PECH, B.; PROUST, J. E.; BENOIT, J. P. Physico-chemical stability of colloidal lipid particles, *Biomaterials*, Amsterdam: Elsevier Science, v. 24, p. 4283-4300, 2003.

- HOU, D. Z.; XIE, C. S.; HUANG, K. J.; ZHU, C. H. The production and characteristics of solid lipid nanoparticles (SLNs), **Biomaterials**, Amsterdam: Elsevier Science, v. 24, p. 1781-1785, 2003.
- IDOWU, M.; NYOKONG, T. Photophysical and photochemical properties of zinc and aluminum phthalocyanines in the presence of magnetic fluid, **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, Lausanne: Elsevier Sequoia, v. 188, p. 200-206, 2007.
- INCA. *Estimativa Incidência de câncer no Brasil*. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Coordenação de Prevenção e Vigilância ed. Rio de Janeiro: INCA, 2014.
- INGRAFFEA, A. Melanoma, **Facial Plastic Surgery Clinics of North America**, Philadelphia: Philadelphia : Elsevier Health Sciences Division, v. 21, p. 33-42, 2013.
- ISO. *ISO 10993-5:2009 Biological evaluation of medical devices -- Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity*. 6 Jan 2009.
- ISSA, M. C. A.; MANELA-AZULAY, M. Terapia fotodinâmica: revisão da literatura e documentação iconográfica, **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio De Janeiro: Sociedade Brasileira de Dermatologia, v. 85, p. 501-511, 2010.
- IYER, A. K.; KHALED, G.; FANG, J.; MAEDA, H. Exploiting the enhanced permeability and retention effect for tumor targeting, **Drug Discovery Today**, Kidlington, Irvington: Elsevier Science Ltd., v. 11, p. 812-818, 2006.
- Jadhav D. S. *Surfactants and its application in pharmaceuticals:an overview*. 2004. Disponível em <http://www.pharmatutor.org/articles/surfactants-and-its-applications-in-pharmaceuticals-overview>, acessado 28/08/2015.
- JENNING, V.; LIPPACHER, A.; GOHLA, S. H. Medium scale production of solid lipid nanoparticles (SLN) by high pressure homogenization, **Journal of Microencapsulation**, London: Informa Healthcare, v. 19, p. 1-10, 2002.
- JENNING, V.; SCHÄFER-KORTING, M.; GOHLA, S. Vitamin A-loaded solid lipid nanoparticles for topical use: drug release properties, **Journal of Controlled Release**, Amsterdam: Elsevier, v. 66, p. 115-126, 2000.
- JOSEFSEN, L. B.; BOYLE, R. W. Photodynamic therapy: novel third-generation photosensitizers one step closer?, **British Journal of Pharmacology**, London: Wiley, v. 154, p. 1-3, 2008.
- JOSHI, M. D.; MÜLLER, R. H. Lipid nanoparticles for parenteral delivery of actives, **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, Amsterdam: Elsevier Science, v. 71, p. 161-172, 2009.
- JUARRANZ, A.; JAÉN, P.; SANZ-RODRÍGUEZ, F.; CUEVAS, J.; GONZÁLEZ, S. Photodynamic therapy of cancer. Basic principles and applications, **Clinical and Translational Oncology**, Milan: Springer Italia, v. 10, p. 148-154, 2008.

- KAKADIA, P. G.; CONWAY, B. R. Solid Lipid Nanoparticles: A Potential Approach for Dermal Drug Delivery, *American Journal of Pharmacological Sciences*, Newark: Science and Education Publishing, v. 2, p. 1-7, 2014.
- KALER, E. W.; MURTHY, A. K.; RODRIGUEZ, B. E.; ZASADZINSKI, J. A. Spontaneous vesicle formation in aqueous mixtures of single-tailed surfactants, *Science*, Washington: The American Association for the Advancement of Science, v. 245, p. 1371-1374, 1989.
- KAMBA, A. S.; ISMAIL, M.; IBRAHIM, T. A. T.; ZAKARIA, Z. A. B. Biocompatibility of Bio Based Calcium Carbonate Nanocrystals Aragonite Polymorph on NIH 3T3 Fibroblast Cell Line, *African Journal of Traditional Complementary and Alternative Medicines*, Nigeria: African Networks on Ethnomedicines, v. 11, p. 31-38, 2014.
- KARPANEN, T. J.; WORTHINGTON, T.; CONWAY, B. R.; HILTON, A. C.; ELLIOTT, T. S. J.; LAMBERT, P. A. Penetration of Chlorhexidine into Human Skin, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Washington: American Society for Microbiology, v. 52, p. 3633-3636, 2008.
- KAWCZYK-KRUPKA, A.; BUGAJ, A. M.; LATOS, W.; ZAREMBA, K.; SIERON, A. Photodynamic therapy in treatment of cutaneous and choroidal melanoma, *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, Amsterdam: Elsevier, v. 10, p. 503-509, 2013.
- KECK, C. M.; MÜLLER, R. H. Nanotoxicological classification system (NCS) - A guide for the risk-benefit assessment of nanoparticulate drug delivery systems, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, Elsevier Science, v. 84, p. 445-448, 2013.
- KOLK, A.; WOLFF, K. D.; SMEETS, R.; KESTING, M.; HEIN, R.; ECKERT, A. W. Melanotic and non-melanotic malignancies of the face and external ear – A review of current treatment concepts and future options, *Cancer Treatment Reviews*, Amsterdam: Elsevier, v. 40, p. 819-837, 2014.
- KONAN, Y. N.; GURNY, R.; ALLÉMANN, E. State of the art in the delivery of photosensitizers for photodynamic therapy, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, Lausanne: Elsevier Sequoia, v. 66, p. 89-106, 2002.
- KUMAR, S.; RANDHAWA, J. K. Preparation and characterization of Paliperidone loaded solid lipid nanoparticles, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, Amsterdam; New York: Elsevier, v. 102, p. 562-568, 2013.
- KYRIAZI, M.; ALEXANDRATOU, E.; YOVA, D.; RALLIS, M.; TREBST, T. Topical photodynamic therapy of murine non-melanoma skin carcinomas with aluminum phthalocyanine chloride and a diode laser: pharmacokinetics, tumor response and cosmetic outcomes, *Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine*, Oxford: Blackwell Publishing Ltd, v. 24, p. 87-94, 2008.
- L.U.M.GmbH. *Manual Dispersion Analyser LUMiSizer®*. 1.2.0 ed. Berlim, Alemanha: L.U.M.GmbH; 22 Jan 2010.

- LANIGAN, R. S.; YAMARIK, T. A. Final Report on the Safety Assessment of Sorbitan Caprylate, Sorbitan Cocoate, Sorbitan Diisostearate, Sorbitan Dioleate, Sorbitan Distearate, Sorbitan Isostearate, Sorbitan Oliviate, Sorbitan Sesquiisostearate, Sorbitan Sesquisteate, and Sorbitan Triisostearate, *International Journal of Toxicology*, Thousand Oaks: Sage Publications, v. 21, p. 93-112, 2002.
- LAZARETH, V. Management of Non-melanoma Skin Cancer, *Seminars in Oncology Nursing*, Philadelphia, PA: W.B. Saunders, v. 29, p. 182-194, 2013.
- LEE, S. S.; ROBINSON, F. M.; WANG, H. Y. Rapid determination of yeast viability, *Biotechnology and Bioengineering Symposium*, USA, v. 11, 1981.
- LEE, Y. N.; NAM, K. W. Cryopreservation of gametophytic thalli of *Ulva prolifera* (Ulvales, Chlorophyta) from Korea, *Journal of Applied Phycology*, Dordrecht: Kluwer Academicp. 1-7, 2015.
- LI, S.; JI, Z.; ZOU, M. J.; NIE, X.; SHI, Y.; CHENG, G. Preparation, Characterization, Pharmacokinetics and Tissue Distribution of Solid Lipid Nanoparticles Loaded with Tetrandrine, *American Association of Pharmaceutical Scientists*, New York: Springer, v. 12, p. 1011-1018, 2011.
- LIM, C. K.; HEO, J.; SHIN, S.; JEONG, K.; SEO, Y. H.; JANG, W. D.; PARK, C. R.; PARK, S. Y.; KIM, S.; KWON, I. C. Nanophotosensitizers toward advanced photodynamic therapy of Cancer, *Cancer Letters*, Limerick: Elsevier Science Ireland, v. 334, p. 176-187, 2013.
- LIPPACHER, A.; MÜLLER, R. H.; MÄDER, K. Preparation of semisolid drug carriers for topical application based on solid lipid nanoparticles, *International Journal of Pharmaceutics*, Amsterdam: Elsevier/North-Holland Biomedical Press, v. 214, p. 9-12, 2001.
- LIPPOLD, B. C. Selection of the vehicle for topical administration of drugs, *Pharmaceutica acta Helvetiae*, Zürich: Schweizerische Apotheker-Verein, v. 59, p. 166-171, 1984.
- LIU, M.; ZHANG, Y.; WU, C.; XIONG, S.; ZHOU, C. Chitosan/halloysite nanotubes bionanocomposites: structure, mechanical properties and biocompatibility, *International Journal of Biological Macromolecules*, Amsterdam: Elsevier, v. 51, p. 566-575, 2012.
- LOBOVKINA, T.; JACOBSON, G. B.; GONZALEZ-GONZALEZ, E.; HICKERSON, R. P.; LEAKE, D.; KASPAR, R. L.; CONTAG, C. H.; ZARE, R. N. In Vivo Sustained Release of siRNA from Solid Lipid Nanoparticles, *ACS Nano*, Washington D.C.: American Chemical Society, v. 5, p. 9977-9983, 2011.
- LONGO, J. P. F.; LOZZI, S. P.; SIMIONI, A. R.; MORAIS, P. C.; TEDESCO, A. C.; AZEVEDO, R. B. Photodynamic therapy with aluminum-chloro-phtalocyanine induces necrosis and vascular damage in mice tongue tumors, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, Lausanne: Elsevier Sequoia, v. 94, p. 143-146, 2009.
- LUCKY, S. S.; SOO, K. C.; ZHANG, Y. Nanoparticles in Photodynamic Therapy, *Chemical Reviews*, Washington, DC: American Chemical Society, v. 115, p. 1990-2042, 2015.

- MAIER, K.; SCHMITT-LANDGRAF, R.; SIEGEMUND, B. Development of an in vitro test system with human skin cells for evaluation of phototoxicity, *Toxicology in Vitro*, Oxford; New York: Pergamon Press, v. 5, p. 457-461, 1991.
- MALKIN, T. The polymorphism of glycerides, *Progress in the Chemistry of Fats and other Lipids*, Oxford: Oxford : Pergamon Press, v. 2, p. 1-50, 1954.
- Malvern Instruments Ltd. *Zetasizer Nano Series User Manual*. 1 ed. no. 1. United Kingdom: Feb 2004.
- MARQUES, E.; KHAN, A.; DA GRACA MIGUEL, M.; LINDMAN, B. Self-assembly in mixtures of a cationic and an anionic surfactant: the sodium dodecyl sulfate-didodecyldimethylammonium bromide-water system, *The Journal of Physical Chemistry*, Washington, D.C: American Chemical Society, v. 97, p. 4729-4736, 1993.
- MARQUES, E. F.; REGEV, O.; KHAN, A.; LINDMAN, B. Self-organization of double-chained and pseudodouble-chained surfactants: counterion and geometry effects, *Advances in Colloid and Interface Science*, Amsterdam: Elsevierp. 83-104, 2003.
- MARUNO, M. **Desenvolvimento de nanoemulsões à base de óleo de gergelim aditivadas de óleo de framboesa para queimaduras da pele**. 2009. 166 f. Doutorado (Tese em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP, Ribeirão Preto, 2009.
- MEHNERT, W.; MADER, K. Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications, *Advanced Drug Delivery Reviews*, Amsterdam: Elsevier Science Publishers, B.V., v. 47, p. 165-196, 2001.
- MONGE-FUENTES, V.; MUEHLMANN, L. A.; DE AZEVEDO, R. B. Perspectives on the application of nanotechnology in photodynamic therapy for the treatment of melanoma, *Nano Reviews*, Sweden: Co-Action Publishing, v. 5, p. 10, 2014.
- MONTENEGRO, L.; SARPIETRO, M. G.; OTTIMO, S.; PUGLISI, G.; CASTELLI, F. Differential scanning calorimetry studies on sunscreen loaded solid lipid nanoparticles prepared by the phase inversion temperature method, *International Journal of Pharmaceutics*, Elsevier/North-Holland Biomedical Press, v. 415, p. 301-306, 2011.
- MROZ, P.; HUANG, Y. Y.; SZOKALSKA, A.; ZHIYENTAYEV, T.; JANJUA, S.; NIFLI, A. P.; SHERWOOD, M. E.; RUZIÉ, C.; BORBAS, K. E.; FAN, D.; KRAYER, M.; BALASUBRAMANIAN, T.; YANG, E.; KEE, H. L.; KIRMAIER, C.; DIERS, J. R.; BOCIAN, D. F.; HOLTEN, D.; LINDSEY, J. S.; HAMBLIN, M. R. Stable synthetic bacteriochlorins overcome the resistance of melanoma to photodynamic therapy, *The FASEB Journal*: Federation of American Societies for Experimental Biology, v. 24, p. 3160-3170, 2010.
- MUEHLMANN, L.; RODRIGUES, M.; LONGO, J.; GARCIA, M.; PY-DANIEL, K.; VELOSO, A.; DE SOUZA, P.; DA SILVA, S.; AZEVEDO, R. B. Aluminium-phthalocyanine chloride nanoemulsions for anticancer photodynamic therapy: Development and in vitro activity against monolayers and spheroids of human mammary adenocarcinoma MCF-7 cells, *Journal of Nanobiotechnology*, London: BioMed Central, v. 13, p. 36, 2015.

- MÜLLER, R. H.; MÄDER, K.; GOHLA, S. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery - a review of the state of the art, ***European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics***, Amsterdam: Elsevier Science, v. 50, p. 161-177, 2000.
- MÜLLER, R. H.; RADTKE, M.; WISSING, S. A. Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations, ***Advanced Drug Delivery Reviews***, Amsterdam: Elsevier Science Publishers, B.V., v. 54, Supplement, p. S131-S155, 2002.
- MÜLLER, R. H.; SHEGOKAR, R.; CORNELIA, M. K. 20 Years of Lipid Nanoparticles (SLN & NLC): Present State of Development & Industrial Applications, ***Current Drug Discovery Technologies***, San Francisco: Bentham Science Publishers, v. 8, p. 207-227, 2011.
- NEGI, J. S.; CHATTOPADHYAY, P.; SHARMA, A. K.; RAM, V. Development of solid lipid nanoparticles (SLNs) of lopinavir using hot self nano-emulsification (SNE) technique, ***European Journal of Pharmaceutical Sciences***, Amsterdam: Elsevier Science B.V, v. 48, p. 231-239, 2013.
- NEGI, L. M.; JAGGI, M.; TALEGAONKAR, S. Development of protocol for screening the formulation components and the assessment of common quality problems of nano-structured lipid carriers, ***International Journal of Pharmaceutics***, Amsterdam: Elsevier/North-Holland Biomedical Press, v. 461, p. 403-410, 2014.
- NELSON, J. S.; MCCULLOUGH, J. L.; BERNS, M. W. Photodynamic Therapy of Human Malignant Melanoma Xenografts in Athymic Nude Mice, ***Journal of the National Cancer Institute***, Cary: Oxford University Press, v. 80, p. 56-60, 1988.
- NIGHSWANDER-REMPEL, S. P.; RIESZ, J.; GILMORE, J.; BOTHMA, J. P.; MEREDITH, P. Quantitative Fluorescence Excitation Spectra of Synthetic Eumelanin, ***The Journal of Physical Chemistry B***, Washington, D.C.: American Chemical Society, v. 109, p. 20629-20635, 2005.
- NUNES, S. M. T.; SGUILLA, F. S.; TEDESCO, A. C. Photophysical studies of zinc phthalocyanine and chloroaluminum phthalocyanine incorporated into liposomes in the presence of additives, ***Brazilian Journal of Medical and Biological Research***, São Paulo: Associação Brasileira de Divulgação Científica, v. 37, p. 273-284, 2004.
- O.E.C.D. Guidance Document for the Conduct of Skin Absorption Studies, ***OECD Series on Testing and Assessment***, Paris: OECD Publishing, v. No. 28, p. 1-31, 2004a.
- O.E.C.D. Test No. 428: Skin Absorption: In Vitro Method, ***OECD Guidelines for the Testing of Chemicals***, Paris: OECD Publishing, v. Section 4, 2004b.
- OZOEMENA, K.; KUZNETSOVA, N.; NYOKONG, T. Photosensitized transformation of 4-chlorophenol in the presence of aggregated and non-aggregated metallophthalocyanines, ***Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry***, Lausanne: Elsevier Sequoia, v. 139, p. 217-224, 2001.
- PARDEIKE, J.; HOMMOSS, A.; MULLER, R. H. Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products, ***International Journal of Pharmaceutics***, Elsevier/North-Holland Biomedical Press, v. 366, p. 170-184, 2009.

- PASZKO, E.; EHRHARDT, C.; SENGE, M. O.; KELLEHER, D. P.; REYNOLDS, J. V. Nanodrug applications in photodynamic therapy, *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, Amsterdam: Elsevier, v. 8, p. 14-29, 2011.
- PELEGRINO, A. C. **Estudos fotofísicos, fotoquímicos e fotobiológicos de porfirinas e ftalocianinas derivadas de éter de coroa**. 2009. Doutorado (Tese em Química) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.
- PLAETZER, K.; KRAMMER, B.; BERLANDA, J.; BERR, F.; KIESSLICH, T. Photophysics and photochemistry of photodynamic therapy: fundamental aspects, *Lasers in Medical Science*, London: Springer, v. 24, p. 259-268, 2008.
- PRIMO, F. L.; RODRIGUES, M. M. A.; SIMIONI, A. R.; BENTLEY, M. V. L. B.; MORAIS, P. C.; TEDESCO, A. C. In vitro studies of cutaneous retention of magnetic nanoemulsion loaded with zinc phthalocyanine for synergic use in skin cancer treatment, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, Amsterdam: North-Holland Pub. Co., v. 320, p. E211-E214, 2008.
- RAHMAN, Z.; ZIDAN, A. S.; KHAN, M. A. Non-destructive methods of characterization of risperidone solid lipid nanoparticles, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, Amsterdam: Elsevier Science, v. 76, p. 127-137, 2010.
- RAMANATHAN, G.; SINGARAVELU, S.; RAJA, M. D.; SIVAGNANAM, U. T. Synthesis of highly interconnected 3D scaffold from Arothron stellatus skin collagen for tissue engineering application, *Micron*, Oxford; New York: Pergamon Press, v. 78, p. 28-32, 2015.
- RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos, *Química Nova*, São Paulo: Sociedade Brasileira de Química, v. 27, p. 771-780, 2004.
- RIBEIRO, F. A. L.; FERREIRA, M. M. C.; MORANO, S. C.; SILVA, L. R.; SCHNEIDER, R. P. Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados, *Química Nova*, São Paulo: Sociedade Brasileira de Química, v. 31, p. 164-171, 2008.
- RICO-LATTES, I.; BLANZAT, M.; FRANCESCHI-MESSANT, S.; PEREZ, E.; LATTES, A. Catanionic sugar derived surfactants, polymers and dendrimers: from molecules to targeted self-organized systems, *Comptes Rendus Chimie*, Paris: Elsevier, v. 8, p. 807-814, 2005.
- RIGON, R. B.; OYAFUSO, M. H.; FUJIMURA, A. T.; GONÇALEZ, M. L.; PRADO, A. H.; GREMIÃO, M. P. D.; CHORILLI, M. Nanotechnology-Based Drug Delivery Systems for Melanoma Antitumoral Therapy: A Review, *BioMed Research International*, New York, NY: Hindawi Pub. Co., v. 2015, p. 1-22, 2015.
- ROLAND, I.; PIEL, G.; DELATTRE, L.; EVRARD, B. Systematic characterization of oil-in-water emulsions for formulation design, *International Journal of Pharmaceutics*, Amsterdam: Elsevier/North-Holland Biomedical Press, v. 263, p. 85-94, 2003.

- ROSSETTI, F. C. **Nanodispersões de cristais líquidos como sistemas de liberação de fotossensibilizadores na terapia fotodinâmica do câncer de pele: avaliação in vitro e in vivo da permeação e retenção cutâneas.** 2010. 133 f. Doutorado (Tese em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.
- S.C.C.S Basic criteria for the in vitro assessment of dermal absorption of cosmetic ingredients., *European Union* p. 1-14, 2010.
- SCALIA, S.; SALAMA, R.; YOUNG, P.; TRAINI, D. Preparation and in vitro evaluation of salbutamol-loaded lipid microparticles for sustained release pulmonary therapy, *Journal of Microencapsulation*, London: Informa Healthcare, v. 29, p. 225-233, 2012.
- SCHAFFAZICK, S. R.; GUTERRES, S. S.; FREITAS, L. L.; POHLMANN, A. R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos, *Química Nova*, São Paulo: Sociedade Brasileira de Química, v. 26, p. 726-737, 2003.
- SCHWARZ, C. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery II. drug incorporation and physicochemical characterization, *Journal of Microencapsulation*, London: Informa Healthcare, v. 16, p. 205-213, 1999.
- SCHWARZ, C.; MEHNERT, W.; LUCKS, J. S.; MÜLLER, R. H. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery. I. Production, characterization and sterilization, *Journal of Controlled Release*, Amsterdam: Elsevier, v. 30, p. 83-96, 1994.
- SCHWEITZER, V. G. PHOTOFRIN-mediated photodynamic therapy for treatment of early stage oral cavity and laryngeal malignancies, *Lasers in Surgery and Medicine*, New York: Wiley-Liss, v. 29, p. 305-313, 2001.
- SEVERINO, P.; ANDREANI, T.; MACEDO, A. S.; FANGUEIRO, J. F.; SANTANA, M. H.; SILVA, A. M.; SOUTO, E. B. Current State-of-Art and New Trends on Lipid Nanoparticles (SLN and NLC) for Oral Drug Delivery, *Journal of Drug Delivery*, Cairo: Hindawi Publishing Corporation, v. 2012, p. 750891, 2012.
- SEVERINO, P.; FANGUEIRO, J. F.; FERREIRA, S. V.; BASSO, R.; CHAUD, M. V.; SANTANA, M. H. A.; ROSMANINHO, A.; SOUTO, E. B. Nanoemulsions and nanoparticles for non-melanoma skin cancer: effects of lipid materials, *Clinical & translational oncology*, Milan: Springer Italia, v. 15, p. 417-424, 2013.
- SHARMA, K. V.; DAVIDS, L. M. Depigmentation in melanomas increases the efficacy of hypericin-mediated photodynamic-induced cell death, *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, Amsterdam: Elsevier, v. 9, p. 156-163, 2012.
- SIEKMANN, B.; WESTESEN, K. Thermoanalysis of the recrystallization process of melt-homogenized glyceride nanoparticles, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, Amsterdam; New York: Elsevier, v. 3, p. 159-175, 1994.
- Sigma Aldrich. 362530 Cloreto de Alumínio Ftalocianina. 5.1. 2 Apr 2014.
- Sigma Aldrich. W303518 Ácido Esteárico 95% FCC. 5.6. 21 Apr 2015.

- SILVA, A. C.; AMARAL, M. H.; GONZÁLEZ-MIRA, E.; SANTOS, D.; FERREIRA, D. Solid lipid nanoparticles (SLN) - based hydrogels as potential carriers for oral transmucosal delivery of Risperidone: Preparation and characterization studies, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, Amsterdam; New York: Elsevier, v. 93, p. 241-248, 2012a.
- SILVA, A. C.; GONZÁLEZ-MIRA, E.; GARCÍA, M. L.; EGEA, M. A.; FONSECA, J.; SILVA, R.; SANTOS, D.; SOUTO, E. B.; FERREIRA, D. Preparation, characterization and biocompatibility studies on risperidone-loaded solid lipid nanoparticles (SLN): High pressure homogenization versus ultrasound, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, Amsterdam; New York: Elsevier, v. 86, p. 158-165, 2011.
- SILVA, A. C.; KUMAR, A.; WILD, W.; FERREIRA, D.; SANTOS, D.; FORBES, B. Long-term stability, biocompatibility and oral delivery potential of risperidone-loaded solid lipid nanoparticles, *International Journal of Pharmaceutics*, Amsterdam: Elsevier/North-Holland Biomedical Press, v. 436, p. 798-805, 2012b.
- SIMÕES, M. C. F.; SOUSA, J. J. S.; PAIS, A. A. C. C. Skin cancer and new treatment perspectives: A review, *Cancer Letters*, Limerick: Elsevier Science Ireland, v. 357, p. 8-42, 2015.
- SIMPLICIO, F. I.; MAIONCHI, F.; HIOKA, N. Terapia fotodinâmica: aspectos farmacológicos, aplicações e avanços recentes no desenvolvimento de medicamentos, *Química Nova*, São Paulo: Sociedade Brasileira de Química, v. 25, p. 801-807, 2002.
- SINGARAVELU, S.; RAMANATHAN, G.; RAJA, M. D.; BARGE, S.; SIVAGNANAM, U. T. Preparation and characterization of keratin-based biosheet from bovine horn waste as wound dressing material, *Materials Letters*, Amsterdam: North-Holland, v. 152, p. 90-93, 2015.
- SIQUEIRA-MOURA, M. P.; PRIMO, F. L.; ESPREAFICO, E. M.; TEDESCO, A. C. Development, characterization, and photocytotoxicity assessment on human melanoma of chloroaluminum phthalocyanine nanocapsules, *Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications*, Amsterdam: Elsevier, v. 33, p. 1744-1752, 2013.
- SIQUEIRA-MOURA, M. P.; PRIMO, F. L.; PETI, A. P.; TEDESCO, A. C. Validated spectrophotometric and spectrofluorimetric methods for determination of chloroaluminum phthalocyanine in nanocarriers, *Pharmazie*, Eschborn: Govi-Verlag Pharmazautischer Verlag, v. 65, p. 9-14, 2010.
- SLOMINSKI, A.; TOBIN, D. J.; SHIBAHARA, S.; WORTSMAN, J. Melanin Pigmentation in Mammalian Skin and Its Hormonal Regulation, *Physiological Reviews*, Bethesda: American Physiological Society, v. 84, p. 1155-1228, 2004.
- SOUSA, E. C. **Avaliação da atividade in vitro de nanoemulsões e nanocápsulas de fluconazol contra candida spp.** 2007. 140 f. Mestrado (Dissertação em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2007.
- SOUSSAN, E. **Conception de vésicules catanioniques dérivées de sucre et étude de leur mécanisme de délivrance de principes actifs.** 2007. Doutorado (Tese em Química) - Université Paul Sabatier III Toulouse, Toulouse, França, 2007.

- SOUSSAN, E.; BLANZAT, M.; RICO-LATTES, I.; BRUN, A.; TEIXEIRA, C. V.; BREZESINSKI, G.; AL-ALI, F.; BANU, A.; TANAKA, M. Physical study of the arrangement of pure catanionic glycolipids and interaction with phospholipids, in support of the optimisation of anti-HIV therapies, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, Amsterdam; New York: Elsevier, v. 303, p. 55-72, 2007.
- SOUSSAN, E.; CASSEL, S.; BLANZAT, M.; RICO-LATTES, I. Drug Delivery by Soft Matter: Matrix and Vesicular Carriers, *Angewandte Chemie International Edition*, Weinheim: WILEY-VCH Verlag, v. 48, p. 274-288, 2009.
- SOUSSAN, E.; MILLE, C.; BLANZAT, M.; BORDAT, P.; RICO-LATTES, I. Sugar-Derived Tricatenar Catanionic Surfactant: Synthesis, Self-Assembly Properties, and Hydrophilic Probe Encapsulation by Vesicles., *Langmuir*, Washington, DC: American Chemical Society, v. 24, p. 2326-2330, 2008.
- SOUTO, E. B.; MEHNERT, W.; MÜLLER, R. H. Polymorphic behaviour of Compritol®888 ATO as bulk lipid and as SLN and NLC, *Journal of Microencapsulation*, London: Informa Healthcare, v. 23, p. 417-433, 2006.
- SOUTO, E. B.; SEVERINO, P.; SANTANA, M. H.; PINHO, S. C. Nanopartículas de lipídios sólidos: métodos clássicos de produção laboratorial, *Química Nova*, São Paulo: Sociedade Brasileira de Química, v. 34, p. 1762-1769, 2011.
- SPARSA, A.; BELLATON, S.; NAVES, T.; JAUBERTEAU, M.; BONNETBLANC, J.; SOL, V.; VERDIER, M.; RATINAUD, M. Photodynamic treatment induces cell death by apoptosis or autophagy depending on the melanin content in two B16 melanoma cell lines, *Oncology Reports*, Athens: D.A. Spandidos, v. 29, p. 1196-1200, 2013.
- SWATHI, G.; PRASANTHI, N. L.; MANIKIRAN, S. S.; RAMARAO, N. Solid Lipid Nanoparticles: Colloidal Carrier Systems for Drug Delivery, *International journal of pharmaceutical sciences and research*, Jhansi: Shashi Alok, v. 43, p. no, 2012.
- TADROS, T.; IZQUIERDO, P.; ESQUENA, J.; SOLANS, C. Formation and stability of nano-emulsions, *Advances in Colloid and Interface Science*, Amsterdam: Elsevier, p. 303-318, 2004.
- TEDESCO, A. C.; ROTTA, J. C. G.; LUNARDI, C. N. Synthesis, Photophysical and Photochemical Aspects of Phthalocyanines for Photodynamic Therapy, *Current Organic Chemistry*, Hilversum: Bentham Science, v. 7, p. 187-196, 2003.
- TIOSSI, R. F. J.; DA COSTA, J. C.; MIRANDA, M. A.; PRAÇA, F. S. G.; MCCHESENEY, J. D.; BENTLEY, M. V.; BASTOS, J. K. In vitro and in vivo evaluation of the delivery of topical formulations containing glycoalkaloids of Solanum lycocarpum fruits, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, Amsterdam: Elsevier Science, v. 88, p. 28-33, 2014.
- TRAN, T. H.; RAMASAMY, T.; TRUONG, D. H.; CHOI, H. G.; YONG, C. S.; KIM, J. O. Preparation and Characterization of Fenofibrate-Loaded Nanostructured Lipid Carriers for Oral Bioavailability Enhancement, *American Association of Pharmaceutical Scientists*, New York: Springer, v. 15, p. 1509-1515, 2014.

- TWENTYMAN, P. R.; LUSCOMBE, M. A study of some variables in a tetrazolium dye (MTT) based assay for cell growth and chemosensitivity, *British Journal of Cancer*, London: Nature Publishing Group on behalf of Cancer Research UK, v. 56, p. 279-285, 1987.
- U.S. Food and Drug Administration. *21 CFR Part 182, Substances Generally Recognized as Safe*. Washington, DC: U.S. Food and Drug Administration. 15 Jan 2016.
- VERA, R. E.; LAMBERTI, M. J.; RIVAROLA, V. A.; RUMIE VITTAR, N. B. Developing strategies to predict photodynamic therapy outcome: the role of melanoma microenvironment, *Tumor Biology*, Dordrecht: Springer Netherlands, v. 36, p. 9127-9136, 2015.
- VILLANUEVA, J.; HERLYN, M. Melanoma and the tumor microenvironment, *Current Oncology Reports*, Philadelphia, PA: Current Science, v. 10, p. 439-446, 2008.
- VITORINO, C.; CARVALHO, F. A.; ALMEIDA, A. J.; SOUSA, J. J.; PAIS, A. A. C. C. The size of solid lipid nanoparticles: An interpretation from experimental design, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, Amsterdam; New York: Elsevier, v. 84, p. 117-130, 2011.
- VIVARES, D.; SOUSSAN, E.; BLANZAT, M.; RICO-LATTES, I. Sugar-Derived Tricatenar Catanionic Surfactant: Self-Assembly and Aggregation Behavior in the Cationic-Rich Side of the System, *Langmuir*, Washington, DC: American Chemical Society, v. 24, p. 9260-9267, 2008.
- WESTESEN, K.; BUNJES, H.; KOCH, M. H. J. Physicochemical characterization of lipid nanoparticles and evaluation of their drug loading capacity and sustained release potential, *Journal of Controlled Release*, Amsterdam: Elsevier, v. 48, p. 223-236, 1997.
- WICKETT, R. R.; VISSCHER, M. O. Structure and function of the epidermal barrier, *American Journal of Infection Control*, St. Louis: Elsevier, v. 34, p. S98-S110, 2006.
- WISSING, S. A.; KAYSER, O.; MÜLLER, R. H. Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery, *Advanced Drug Delivery Reviews*, Amsterdam: Elsevier Science Publishers, v. 56, p. 1257-1272, 2004.
- ZANATTA, C. F.; UGARTONDO, V.; MITJANS, M.; ROCHA-FILHO, P. A.; VINARDELL, M. P. Low cytotoxicity of creams and lotions formulated with Buriti oil (*Mauritia flexuosa*) assessed by the neutral red release test, *Food and Chemical Toxicology*, Exeter: Elsevier Science Ltd, v. 46, p. 2776-2781, 2008.
- ZHAO, L.; LIU, J.; ZHANG, L.; GAO, Y.; ZHANG, Z.; LUAN, Y. Self-assembly properties, aggregation behavior and prospective application for sustained drug delivery of a drug-participating catanionic system, *International Journal of Pharmaceutics*, Amsterdam: Elsevier/North-Holland Biomedical Press, v. 452, p. 108-115, 2013.

7. ANEXO(S)

ANEXO 1 – Perfis de transmitância obtidos por análise de estabilidade acelerada com *LUMiSizer*.

Figura 01. Gráfico da transmissão normalizada de NIR versus posição da cubeta, representando o perfil de transmitância da formulação de nanopartículas lipídicas sólidas com ftalocianina de cloro alumínio CIAIPc-A-NLS, na análise de estabilidade por centrifugação com o *LUMiSizer*. Os perfis iniciais estão em vermelho e a coloração verde sinaliza perfis registrados próximo ao fim do experimento.

Figura 02. Gráfico da transmissão normalizada de NIR versus posição da cubeta, representando o perfil de transmitância da formulação de nanopartículas lipídicas sólidas com ftalocianina de cloro alumínio CIAIPc-B-NLS, na análise de estabilidade por centrifugação com o *LUMiSizer*. Os perfis iniciais estão em vermelho e a coloração verde sinaliza perfis registrados próximo ao fim do experimento.

Figura 03. Gráfico da transmissão normalizada de NIR versus posição da cubeta, representando o perfil de transmitância da formulação de nanopartículas lipídicas sólidas com ftalocianina de cloro alumínio CIAIPc-D-NLS, na análise de estabilidade por centrifugação com o *LUMiSizer*. Os perfis iniciais estão em vermelho e a coloração verde sinaliza perfis registrados próximo ao fim do experimento.

Figura 04. Gráfico da transmissão normalizada de NIR versus posição da cubeta, representando o perfil de transmitância da formulação de nanopartículas lipídicas sólidas com ftalocianina de cloro alumínio CIAIPc-E-NLS, na análise de estabilidade por centrifugação com o *LUMiSizer*. Os perfis iniciais estão em vermelho e a coloração verde sinaliza perfis registrados próximo ao fim do experimento.

Figura 05. Gráfico da transmissão normalizada de NIR versus posição da cubeta, representando o perfil de transmitância da formulação de nanopartículas lipídicas sólidas com ftalocianina de cloro alumínio CIAIPc-F-NLS, na análise de estabilidade por centrifugação com o *LUMiSizer*. Os perfis iniciais estão em vermelho e a coloração verde sinaliza perfis registrados próximo ao fim do experimento.

Figura 06. Gráfico da transmissão normalizada de NIR versus posição da cubeta, representando o perfil de transmitância da formulação de nanopartículas lipídicas sólidas com ftalocianina de cloro alumínio CIAIPc-G-NLS, na análise de estabilidade por centrifugação com o *LUMiSizer*. Os perfis iniciais estão em vermelho e a coloração verde sinaliza perfis registrados próximo ao fim do experimento.

ANEXO 2 – Termogramas obtidos por análise de DSC de cada amostra analisada

Figura 01. Termograma obtido por calorimetria exploratória diferencial do lipídio puro compritol.

Figura 02. Termograma obtido por calorimetria exploratória diferencial das nanopartículas lipídicas sólidas vazias após 1 mês de sua preparação.

Figura 03. Termograma obtido por calorimetria exploratória diferencial das nanopartículas lipídicas sólidas vazias após 24 meses de sua preparação.

Figura 04. Termograma obtido por calorimetria exploratória diferencial das nanopartículas lipídicas sólidas com ftalocianina de cloro alumínio após 1 mês de sua preparação.

Figura 05. Termograma obtido por calorimetria exploratória diferencial das nanopartículas lipídicas sólidas com ftalocianina de cloro alumínio após 24 meses de sua preparação.