UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Influência da iontoforese na penetração de nanopartículas lipídicas
sólidas em tumores cutâneos**

Lucas de Andrade Huber

Ribeirão Preto
2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Influência da iontoforese na penetração de nanopartículas lipídicas
sólidas em tumores cutâneos**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas para obtenção do Título de
Mestre em Ciências

Área de Concentração: Medicamentos e
Cosméticos.

Orientado: Lucas de Andrade Huber

Orientadora: Profa. Dra. Renata Fonseca
Vianna Lopez

Ribeirão Preto
2013

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.

Huber, Lucas de Andrade

Influência da iontoforese na penetração de nanopartículas lipídicas sólidas em tumores cutâneos, 2013.
106 p.; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Medicamentos e Cosméticos
Orientador: Lopez, R.F.V.

1. Nanopartícula Lipídica Sólida 2. Iontoforese. 3. Doxorrubicina.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do aluno: Lucas de Andrade Huber

Título do trabalho: Influência da iontoforese na penetração de nanopartículas lipídicas sólidas em tumores cutâneos

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas para obtenção do Título de
Mestre em Ciências

Área de Concentração Medicamentos e
Cosméticos.

Orientadora: Profa. Dra. Renata Fonseca
Vianna Lopez

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Ao meu pai Leo Huber, que me ensinou a razão, a ideia e o pensamento. Que me mostrou o significado da perseverança, da audácia e da coragem. Que me apresentou um mundo limitado apenas pelos meus sonhos.

À minha mãe Elza Maria de Andrade, que me ensinou a sentimento, o carinho e a compaixão. Que me mostrou o significado de rir, chorar e se emocionar. Que me apresentou um mundo limitado apenas pelo amor.

Ao meu irmão Mateus de Andrade Huber, que me ensinou que a força e a sensibilidade podem andar juntas. Que me mostrou o significado de ser forte sem precisar o ser. Que me apresentou um mundo limitado apenas por mim mesmo.

À toda a minha família por ensinar sentido da palavra amor, sem sequer, dizer uma palavra.

À Ana Rubia Rockenbach, pela paciência ao meu lado, pelo apoio, (e pelos bolos, pavês, doces, e sorrisos). Mas acima de tudo pelo amor.

Aos meus irmãos e amigos, Gilcinei “zubbat” Tiago, Ewerton “elfo” Longo, Rodrigo “mestre” Torres, pela amizade e bons momentos juntos.

À minha orientadora Renata Fonseca Vianna Lopez, por ter me aceito como seu aluno. Por ter me entendido e me ajudado. Por ter me apoiado e me ensinado. Pelas broncas e pelas risadas (até das piadas sem graça).

Mas acima de tudo a Deus, por ter colocado pessoas tão boas em meu caminho. Sem elas eu nunca teria chegado até aqui.

AGRADECIMENTOS

Aos meus colegas de laboratório: Karina Dias, Daniela Bernardi, Estael Cruz, Caroline Gondo, Beatriz Perusso, Camila Lemos, Silas Arandas, e em especial, Tatiana Pereira, Joel Souza, e Laura Pimenta pelo apoio e pelas risadas.

À técnica de laboratório Patrícia Sper pela grande ajuda com os experimentos.

Ao aluno Lucas Rezende pelas valiosas reflexões sobre o trabalho e pela síntese do composto BODIPY FSE-8.

Ao Prof. Dr. Flávio da Silva Emery pela parceria e apoio fundamentais para a realização deste projeto.

À FAPESP e ao CNPQ pelo apoio financeiro.

"Uma vida não questionada não merece ser vivida."

Platão

RESUMO

HUBER, L. A. **Influência da iontoforese na penetração de nanopartículas lipídicas sólidas em tumores cutâneos**. 2013. 106f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

O tratamento tópico do câncer de pele é uma estratégia promissora para aumentar a biodisponibilidade local de antineoplásicos e diminuir efeitos sistêmicos adversos. No entanto, altas concentrações do fármaco nos tumores, que acometem as camadas mais profundas da pele, são requeridas para que o tratamento seja adequado. Para promover a penetração cutânea dos antineoplásicos e atingir o tumor, sistemas de liberação nanoparticulados associados a métodos físicos, como a iontoforese, vêm sendo estudados. Nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) são sistemas carreadores explorados para a administração tópica, principalmente, de produtos cosméticos. Pouco se sabe, no entanto, sobre sua influência na penetração cutânea de fármacos e sobre os mecanismos pelos quais as NLS agem para aumentar esta penetração. A iontoforese é um método físico que aumenta a permeação cutânea de fármacos através da aplicação de uma corrente elétrica de baixa densidade. Sua influência na penetração tumoral de fármacos carregados por NLS ainda não foi explorada. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da iontoforese na penetração tumoral do antineoplásico modelo doxorrubicina (DOX) a partir de NLS catiônicas. Para tanto, NLS contendo DOX foram preparadas e caracterizadas quanto a distribuição de tamanho, potencial zeta e pH. NLS idênticas, mas marcadas com um fluoróforo lipofílico, o BODIPY FSE-8 (BOD), sintetizado especificamente para este fim, também foram obtidas e caracterizadas. Estas nanopartículas fluorescentes contendo DOX e BOD foram utilizadas para estudar, por microscopia confocal de varredura a laser, *in vitro* e *in vivo*, as vias de penetração dos compostos lipofílicos presentes nas NLS e da própria DOX. A penetração da DOX nas diferentes camadas da pele foi avaliada *in vitro* usando-se células de difusão vertical e pele de suíno. *In vivo*, a penetração do fármaco foi avaliada também no tumor e no plasma, após 1 h de aplicação passiva e iontoforética das NLS em tumores de células escamosas induzidos em camundongos imunossuprimidos. Nos estudos de microscopia observou-se que a aplicação das NLS levou a uma distribuição mais homogênea da fluorescência no estrato córneo (EC) do que a aplicação de soluções dos fluoróforos livres. A iontoforese aumentou a fluorescência de todas as amostras testadas, levando inclusive a presença de agregados fluorescentes abaixo dos folículos pilosos e a formação de regiões de transporte localizadas mais permeáveis no EC. Nos estudos quantitativos *in vitro* a iontoforese anódica (a partir do eletrodo positivo) das NLS-DOX levou a concentrações cerca de 39 vezes maiores de DOX na epiderme viável do que todas as outras formulações, indicando um efeito positivo da eletromigração na penetração das NLS catiônicas. Nos estudos *in vivo*, o aumento da quantidade de DOX acumulada na pele após a iontoforese anódica das NLS-DOX foi bem acentuado frente às outras formulações. Já a presença de fármaco no tumor, apesar de apresentar uma tendência maior de acúmulo quando a iontoforese foi aplicada, não foi estatisticamente diferente das demais formulações. No entanto, a tendência das NLS de ficarem acumuladas na pele, diminuindo a presença da DOX na circulação, foi bastante característica. Pode-se concluir, portanto, que a aplicação de NLS associadas a iontoforese apresenta alto potencial de sucesso para o tratamento tópico, localizado, de tumores cutâneos.

Palavras-chave: Iontoforeses; Nanopartículas Lipídicas Sólidas; Doxorrubicina; Câncer de pele.

ABSTRACT

HUBER, L. A. **Influence of iontophoresis on the penetration of solid lipid nanoparticles in skin tumors**.. 2013. 106f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

Topical treatment of skin cancer is a promising strategy to increase local bioavailability of antineoplastic drugs and to reduce systemic adverse effects. However, elevated concentrations of the drug in tumors presented in deep skin layers are required for the adequate treatment. To increase drug skin penetration, nanoparticles associated with physical methods, such as iontophoresis, have been studied. Solid lipid nanoparticles (SLN) are drug carrier systems developed for topical administration, especially of cosmetic products. However, almost nothing is known about their influence on the skin penetration of drugs or on the mechanisms by which they enhance drug penetration through the skin. Iontophoresis is a physical method which increases the skin permeation of drugs through the application of a low density electrical current. Its influence on tumor penetration of drugs carried by SLN has not been explored yet. Therefore, the aim of this study was to evaluate the influence of iontophoresis on the penetration of the antineoplastic model drug doxorubicin (DOX) carried by cationic SLN. To this end, SLN containing DOX were prepared and characterized according to their medium size, zeta potential and pH. Besides that, identical SLN containing a lipophilic fluorophore BODIPY FSE-8 (BOD), synthesized specifically for this study, has also been obtained and characterized. These fluorescent nanoparticles containing DOX and BOD were used to study the *in vitro* and *in vivo* penetration routes of both DOX and lipophilic compounds present in the SLN, by confocal laser scanning microscopy analysis. The penetration of DOX in the different skin layers was evaluated *in vitro* using vertical diffusion cells and pig skin. *In vivo*, the drug penetration was also measured in the tumor and plasma after 1 hour of iontophoretic and passive application of SLN on squamous cells tumors, previously induced in immunosuppressed mice. The microscopy studies showed that the application of SLN resulted in a more homogeneous distribution of fluorescence in the stratum corneum (SC) compared to the application of solutions containing free fluorophores at the same conditions. Iontophoresis increased fluorescence for all samples tested, leading yet to the presence of fluorescent aggregates below the hair follicles and the formation of localized transport regions at the SC. The *in vitro* quantitative studies showed that anodic iontophoresis (from the positive electrode) of SLN-DOX led to about 39 times higher concentrations of DOX in viable epidermis than all the others formulations, indicating a positive effect of electromigration on the penetration of cationic SLN. In the *in vivo* studies, the amount of DOX accumulated in the skin after anodic iontophoresis of SLN-DOX was also well pronounced. The tendency of SLN accumulation in the skin, reducing the presence of DOX in the blood circulation, was very characteristic. Therefore, it can be concluded that the application of SLN associated with iontophoresis has a great potential for success in the topical treatment of localized skin tumors.

Keywords: Iontophoresis; Solid Lipid Nanoparticles; Doxorubicin; Skin Cancer.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura molecular das antraciclinas: doxorubicina, epirrubicina, daunorrubicina e idarrubicina	4
Figura 2. Estrutura Molecular: monoleína	6
Figura 3. Estrutura molecular do FITC, Peso Molecular de 389	8
Figura 4. Estrutura Molecular do “nile red”. Peso Molecular de 318,37	10
Figura 5. Estrutura molecular do BODIPY (4,4-Difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno)	11
Figura 6: Estrutura Molecular do BODIPY FSE-8	12
Figura 7. Vista frontal e lateral do BODIPY FSE-8 em 3D.	12
Figura 8. Diagrama de Fases representando as concentrações avaliadas de tensoativo, (CTAB:monoleína 2:1), ácido esteárico e água para a formação da microemulsão. Estão destacadas as formulações 25 e 26 que formaram microemulsão nas condições testadas	14
Figura 9. Representação esquemática da análise de Resistividade elétrica da pele de suíno.	22
Figura 10. Representação Esquemática da Célula de Franz	24
Figura 11. (a) Célula de difusão iontoforética, (b) Vista superior do compartimento doador.	25
Figura 12. Representação esquemática do circuito elétrico em série para o preparo do eletrodo positivo (ânodo) através da passagem de uma corrente elétrica de 0,4 mA por 8 horas (Taveira, 2007).	25
Figura 13. Interação molecular entre o ácido esteárico e CTAB levando a formação de ácido bromídrico (HBr).	38
Figura 14. Estudos de liberação das NLS-DOX.	41
Figura 15. Cromatograma da solução receptora do estudo de liberação da DOX a partir das NLS-DOX (A) e de uma solução de DOX padrão (B).	42
Figura 16. Distribuição granulométrica do receptor nos experimentos de liberação após 2 horas de liberação da DOX a partir de uma dispersão de NLS-DOX.	43
Figura 17. Espectro de emissão de fluorescência da Doxorubicina (solução aquosa) quando excitado a 537 nm.	45

- Figura 18. Espectro de Emissão do BODIPY FSE-8 (Etanol:Água 1:1) quando excitado a 512 nm. 46
- Figura 19. MCVL da pele de suíno (corte longitudinal) após 1 hora de permeação passiva com (a) NLS-BOD (metade à esquerda da figura) e (b) NLS-DOX (metade a direita da figura) sob aumento de 20x. As imagens na metade superior da figura apresentam a região de detecção do BODIPY FSE-8 (campo verde). As imagens na metade inferior da figura apresentam o campo de detecção da DOX (campo vermelho). 47
- Figura 20. MCVL da pele de suíno (corte longitudinal) após permeação por 1 hora com solução ácida (pH 2,8) de DOX e BODIPY FSE-8 livres, sob aumento de 20x. Da esquerda para a direita estão demonstrados: Campo verde (BODIPY FSE-8), Campo Claro e Campo Vermelho (DOX). Setas indicam regiões de fluorescência nos sulcos da pele. 48
- Figura 21. MCVL de diferentes cortes óticos da análise de pele de suíno (corte longitudinal) após 1 h de permeação passiva de DOX e BODIPY FSE-8 livres, sob aumento de 40x. Da esquerda para a direita estão demonstrados: campo verde (BODIPY FSE-8), campo claro e campo vermelho (DOX). Z = a) 0 μm ; b) 12 μm ; c) 36 μm ; d) 72 μm ; e) 102 μm). Escala de 50 μm 49
- Figura 22. MCVL de pele de suíno (corte transversal) após permeação por 1 hora com NLS-DOX+BOD, sob aumento de 20x. Da esquerda para a direita estão demonstrados: Campo verde (BODIPY FSE-8), Campo Claro e Campo Vermelho (DOX). Setas indicam sinais intensos de fluorescência em contato com o EC. 50
- Figura 23. MCVL de pele de suíno (corte transversal) após permeação por 1 hora com NLS-DOX+BOD, sob aumento de 20x. Na imagem está representado apenas a fluorescência do BODIPY FSE-8 (Campo verde) para melhor visualização. Setas indicam a distância dos pontos intensos de fluorescência a partir da superfície da pele. 51
- Figura 24. Microscopia Confocal de Varredura a Laser de pele de suíno (corte longitudinal) após permeação por 1 hora com NLS-DOX+BOD, sob aumento de 20x. Da esquerda para a direita estão demonstrados: Campo verde (BODIPY FSE-8), Campo Claro e Campo Vermelho (DOX). Setas indicam sinais intensos e heterogêneos de fluorescência nos sulcos da pele. 52

Círculos vermelhos indicam fluorescência de BODIPY em contato com os corneócitos e círculos brancos indicam fluorescência de DOX localizada próxima aos corneócitos.

Figura 25. MCVL de pele de suíno (corte longitudinal) após permeação por 1 hora com NLS-DOX+BOD, sob aumento de 40x. Da esquerda para a direita estão demonstrados: Campo verde (BODIPY FSE-8), Campo Vermelho (DOX), e a sobreposição das 2 imagens anteriores. Setas e círculos vermelhos apontam exemplos de regiões de aglomerados intensos de fluorescência de DOX e BODIPY FSE-8 claramente colocalizados.

Figura 26. Microscopia Confocal de Varredura a Laser de pele de suíno (corte longitudinal) após permeação por 1 hora com NLS-DOX+BOD, seguida pela remoção do EC, sob aumento de (a) 20x e (b) 40x. Da esquerda para a direita estão demonstrados: Campo verde (BODIPY FSE-8), Campo Claro e Campo Vermelho (DOX).

Figura 27. a) Pele de suíno lavada, retirada da célula de “Franz” modificada, após permeação iontoforética. Setas indicam regiões de transporte localizado de DOX e BODIPY FSE-8; b) e c) MCVL da pele de suíno (corte longitudinal) após permeação iontoforética por 1 hora com solução ácida (pH 2,8) de DOX e BODIPY FSE-8 livres, sob aumento de 20x. Da esquerda para a direita estão demonstrados: Campo verde (BODIPY FSE-8), Campo Claro e Campo Vermelho (DOX). b) região de transporte localizado de permeação iontoforética; c) região sem detecção de transporte localizado de permeação iontoforética. Ambas as análises “b)” e “c)” foram realizadas na mesma amostra de pele. Círculos vermelhos e brancos representam pontos de intensa fluorescência

Figura 28. MCVL da pele de suíno (corte longitudinal) após permeação iontoforética por 1 hora com solução ácida (pH 2,8) de DOX e BODIPY FSE-8 livres, sob aumento de 40x. Da esquerda para a direita estão demonstrados: Campo verde (BODIPY FSE-8), Campo Claro e Campo Vermelho (DOX). Z = a) 0 μ M; b) 6 μ M; c) 12 μ M; d) 18 μ M. A escala é de 50 μ M

Figura 29. MCVL de pele de suíno (corte transversal) após permeação por 1 hora com NLS-DOX+BOD, sob aumento de a) 20x, b) 40x e c) 40x. Em a) e

b) Da esquerda para a direita estão demonstrados: Campo verde (BODIPY FSE-8), Campo Claro e Campo Vermelho (DOX). O círculo destaca a região de permeação localizada das regiões adjacentes. Setas indicam sinais intensos de fluorescência em contanto com o EC. Em c) da esquerda para a direita estão demonstrados: Campo verde (BODIPY FSE-8), Campo Vermelho (DOX) e a sobreposição dos campos anteriores. É possível observar em c) a justaposição da fluorescência dos campos da DOX e do BOD.

Figura 30. MCVL de diferentes cortes óticos da análise de pele de suíno (corte longitudinal) após 1 h de permeação iontoforética de NLS – DOX+BOD sob aumento de 20x. Da esquerda para a direita estão demonstrados: Campo verde (BODIPY FSE-8), Campo Claro e Campo Vermelho (DOX). Z = a) 0 μ m; b) 31 μ m; c) 66 μ m; d) 105 μ m; e) 147 μ m . A escala é de 100 μ M. 58

Figura 31. MCVL de pele de suíno (corte longitudinal) após permeação por 1 hora com NLS-DOX+BOD e posterior remoção do EC por “tape stripping”, sob aumento de a) 20x e b) 40x. Da esquerda para a direita estão demonstrados: Campo verde (BODIPY FSE-8), Campo Claro e Campo Vermelho (DOX). 59

Figura 32. MCVL de pele de suíno (corte longitudinal) após permeação por 1 hora com NLS-DOX+BOD e posterior remoção do EC por “tape stripping”, sob aumento de 40x. Em “a)” da esquerda para a direita estão demonstrados: Campo verde (BODIPY FSE-8), Campo Claro e Campo Vermelho (DOX). “b)” serve para uma melhor análise dos resultados e trata-se da mesma imagem “a)” com um aumento de 50 (em uma escala de 0 a 250) dos sinais verdes e vermelho que compõem a imagem; da esquerda para a direita estão demonstrados: Campo verde (BODIPY FSE-8) e Campo Vermelho (DOX). 60

Figura 33. Análise quantitativa da DOX no estrato córneo (EC) e na epiderme e derme viável (EP+D) após a permeação passiva ou iontoforética (anódica ou catódica) da DOX livre em solução aquosa (pH 2,8) ou encapsulada em NLS. 61

Figura 34. MCVL de “a)” pele de camundongo Nude Balb C (corte 64

longitudinal); “b)” carcinoma de células escamosas (A431) induzido em camundongo Nude Balb C; após permeação por 30 minutos com tampão Hepes (pH 7,4), sob aumento de 20x. Da esquerda para a direita estão demonstrados: Campo verde (BODIPY FSE-8), Campo Claro e Campo Vermelho (DOX).

Figura 35. MCVL de pele de camundongo Nude Balb C (corte longitudinal) após permeação passiva por 30 minutos com solução ácida de DOX e BOD livres, sob aumento de 20x. Da esquerda para a direita estão demonstrados: Campo verde (BODIPY FSE-8), Campo Claro e Campo Vermelho (DOX). De cima para baixo, está representado o mesmo segmento da pele sob diferentes cortes óticos (0, 3, 6 e 11 μm) 66

Figura 36. MCVL de pele de camundongo Nude Balb C (corte longitudinal) após permeação passiva por 30 minutos com NLS-DOX+BOD, sob aumento de 20x. Da esquerda para a direita estão demonstrados: Campo verde (BODIPY FSE-8), Campo Claro e Campo Vermelho (DOX). 68

Figura 37. MCVL de pele de camundongo Nude Balb C (corte longitudinal) após permeação passiva por 30 minutos com NLS-DOX+BOD, sob aumento de 40x. Da esquerda para a direita estão demonstrados: Campo verde (BODIPY FSE-8), Campo Claro e Campo Vermelho (DOX). De cima para baixo, está representado o mesmo segmento da pele sob diferentes cortes óticos: na coluna da esquerda (0, 1,5 e 3 μm) e na coluna da direita (6, 10,5 e 13 μm) 69

Figura 38. Camundongo Nude Balb C após a permeação iontoforética por 30 minutos, da solução ácida DOX e BOD livres. O quadrado vermelho indica a região da permeação. O círculo branco apresenta a região tumoral. RTL = região de transporte localizado; não-RTL = região de transporte não localizado. 70

Figura 39. MCVL de pele de camundongo Nude Balb C (corte longitudinal) após permeação iontoforética por 30 minutos com solução ácida de DOX e BOD livres, sob aumento de 20x. Da esquerda para a direita estão demonstrados: Campo verde (BODIPY FSE-8), Campo Claro e Campo Vermelho (DOX). a) imagem representativa da RTL; b) imagem representativa da não-RTL 71

- Figura 40. MCVL de pele de camundongo Nude Balb C (corte longitudinal) após permeação iontoforética por 30 minutos com NLS-DOX+BOD, sob aumento de 20x. Da esquerda para a direita estão demonstrados: Campo verde (BODIPY FSE-8), Campo Claro e Campo Vermelho (DOX). a) imagem representativa da RTL; b) imagem representativa da não-RTL 72
- Figura 41. MCVL de pele de carcinoma de células escamosas (A439) (corte transversal) após permeação *in vivo* em camundongo Nude Balb C, por 30 minutos sob aumento de 20x. a) permeação passiva de solução ácida de DOX e BOD livres; b) permeação passiva de NLS-DOX+BOD; c) permeação iontoforética de solução ácida de DOX e BOD livres; d) permeação iontoforética de NLS-DOX+BOD. Da esquerda para a direita estão demonstrados: Campo verde (BODIPY FSE-8), Campo Claro e Campo Vermelho (DOX). 73
- Figura 42. Análise quantitativa em quintuplicata da DOX na pele, tumor e plasma sanguíneo após a permeação passiva ou iontoforética (anódica ou catódica) da DOX livre em solução aquosa (pH 2,8) ou encapsulada em NLS. 75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Concentrações de ácido esteárico (fase lipídica), tensoativos (CTAB:monoleína 2:1) e Água Purificada utilizadas para o desenvolvimento da NLS. Os números das formulações correspondem aos números do diagrama de fases (Figura 8).	15
Tabela 2. Resultado da análise de tamanho médio e potencial zeta das NLS preparadas a partir das microemulsões: F25 (ácido esteárico: 40%; Tensoativos: 20%; Água 40%) e F26 (ácido esteárico: 50%; Tensoativos: 20%; Água 30%). O tamanho médio representado é do pico de maior intensidade (Int.) da análise. A proporção de tensoativos é de 2:1 CTAB:Monoleína.	32
Tabela 3. Resultado da análise de tamanho médio e potencial zeta da NLS preparadas a partir da microemulsão: F25 (ácido esteárico: 40%; Tensoativos: 20%; Água 40%), modificando a proporção dos tensoativos na razão de 2:1 para 1:0, 1:1 e 1:2 (CTAB:monoleína). O tamanho médio representado é do pico de maior intensidade (Int.) da análise	33
Tabela 4: Resultado da análise de Tamanho e Potencial Zeta das formulações: F25 1:2 (CTAB:Monoleína). Os valores entre parênteses representam o desvio padrão da amostragem em triplicata	34
Tabela 5: Resultado da análise de Tamanho e Potencial Zeta das NLS preparada a partir da microemulsão F25-1:2 (CTAB:monoleína) obtidas com diferentes concentrações iniciais de DOX. Os valores entre parênteses representam o desvio padrão da amostragem em triplicata. As concentrações de DOX em “%” representam a quantidade relativa de DOX em relação à quantidade de ácido esteárico na microemulsão.	35
Tabela 6: Eficiência de Encapsulação (EE%), Rendimento, Perda e Capacidade de Carga (CC) da NLS preparada a partir da microemulsão F25-1:2 (CTAB:monoleína) obtidas com diferentes concentrações de DOX. As concentrações de DOX em “%” representam a quantidade relativa de DOX em relação à quantidade de ácido esteárico na microemulsão.	36
Tabela 7. Determinação do pH das formulações de NLS-Lecitina, Solução	37

CTAB (3,33 mg/mL) e Emulsão (Ácido Esteárico +CTAB)

Tabela 8: Resultado da análise de Tamanho e Potencial Zeta das formulações: F25 1:2 (CTAB:Monoleína) contendo 4% DOX antes e após passagem pelo homogeneizador de alta pressão 39

Tabela 9: Resultado da análise de Tamanho, Pdl e Potencial Zeta das NLS fluorescentes, utilizando como marcador de fluorescência o BODIPY FSE-8. 40

Tabela 10. Resultado da análise de Tamanho e Potencial Zeta das NLS fluorescentes, utilizando como marcador de fluorescência o BODIPY FSE-8, na presença de DOX encapsulada. Valores utilizados entre parênteses representam o desvio padrão da amostragem em duplicata 40

Tabela 11. Determinação da resistividade (ρ) de pele de suíno após aplicação de solução de CTAB ácida (3,33 mg/mL, pH 2,8) após tempo de permeação (t) de 0, 15, 30 e 60 minutos. O teste foi realizado com 10 amostras de pele (n=10) 43

Tabela 12. Análise quantitativa da DOX na solução receptora após a permeação passiva ou iontoforética (anódica ou catódica) da DOX livre em solução aquosa (pH 2,8) ou encapsulada em NLS. 62

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ρ	Resistividade
BOD	BODIPY FSE-8
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CTAB	Brometo de Cetiltrimetilamônio
CC%	Capacidade de Carga
DOX	Doxorrubicina
EC	Estrato Córneo
EP+D	Epiderme e Derme
EE%	Eficiência de Encapsulação
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FCFRP-USP	Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo
FITC	Isotiocianato de Fluoresceína
INCA	Instituto Nacional do Câncer
MCVL	Microscopia Confocal de Varredura a Laser
NLS	Nanopartícula Lipídica Sólida
PdI	Índice de Polidispersão
PDT	Terapia Fotodinâmica
PLGA	Ácido poli-lático-glicólico
QD	<i>Quantum dots</i>
SOL	Solução
US-LSS	Ultrassom associado a Lauril Sulfato de Sódio
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract	ii
Lista de figuras	iii
Lista de tabelas	ix
Lista de abreviaturas e siglas	xi
1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA.....	1
2. OBJETIVOS.....	12
3. MATERIAIS E MÉTODOS	12
3.1 Material	12
3.2 Desenvolvimento das Nanopartículas Lipídicas Sólidas	12
3.3 Desenvolvimento das Nanopartículas Lipídicas Sólidas contendo Doxorrubicina	16
3.4. Produção das Nanopartículas Lipídicas Sólidas por Homogeneização a Alta Pressão	16
3.5. Desenvolvimento de Nanopartículas Lipídicas Sólidas fluorescentes.....	16
3.5.1. Desenvolvimento de Nanopartículas Lipídicas Sólidas fluorescentes sem Doxorrubicina	17
3.5.2. Desenvolvimento de Nanopartículas Lipídicas Sólidas fluorescentes contendo Doxorrubicina	17
3.6. Caracterização das Nanopartículas Lipídicas Sólidas	17
3.6.1.Tamanho médio e Índice de Polidispersividade.....	18
3.6.2.Potencial Zeta.....	18
3.6.3.Rendimento do processo.....	18
3.6.4.Eficiência de Encapsulação de Doxorrubicina.....	19
3.6.5. Capacidade de Carga de Doxorrubicina ("Loading Capacity")	19
3.6.6. Determinação de pH	19
3.7. Quantificação da Doxorrubicina por Espectroscopia	20
3.8. Estudos <i>in vitro</i> de liberação da DOX a partir das NLS-DOX.....	20
3.9. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	21
3.10. Estudos <i>in vitro</i> de permeação passiva e iontoforética da DOX através da pele	21
3. 10.1. Preparo da pele.....	21
3. 10.2. Validação da Pele para Estudos de Permeação de NLS	21
3. 10.3. Validação da Aplicação de NLS sobre a pele de suíno, por uma hora..	22
3. 10.4. Estudos de Permeação Passiva e Iontoforética da DOX	23
3. 10.4.1. Estudos de permeação passiva	24
3. 10.4.2. Estudos de permeação iontoforética	24
3. 10.5. Estudos da via de permeação – Microscopia Confocal de Varredura a Laser	26
3. 10.5.1. Parâmetros de análise – MCVL.....	26
3. 10.5.2. Preparo das lâminas de microscopia.....	27
3. 10.6. Estudos quantitativos	27
3.11. Estudos <i>in vivo</i> de permeação passiva e iontoforética da DOX	28

3. 11.1. Modelo animal	28
3.11.2. Linhagem celular e indução tumoral.....	29
3.11.3. Estudos <i>in vivo</i> de permeação cutânea e tumoral passiva e iontoforética	30
3.11.4. Tratamento <i>in vivo</i> e preparo das amostras	30
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
4.1. Obtenção de Nanopartículas Lipídicas Sólidas pelo Método de Microemulsão	32
4.2. Nanopartículas Lipídicas Sólidas Contendo Doxorrubicina.....	34
4.2.1. Tamanho da Partícula e Potencial Zeta	34
4.2.2. Eficiência de Encapsulação, Rendimento e Capacidade de Carga.....	36
4.2.3. Determinação do pH	37
4.3. NLS produzidas por Homogeneização a Alta Pressão.....	38
4.4. Nanopartículas Fluorescentes	39
4.5. Estudos de liberação da DOX	40
4.6. Estudos de permeação cutânea passiva e iontoforética <i>in vitro</i>	43
4.6.1. Validação da Aplicação de NLS sobre a pele de suíno, por uma hora.....	43
4.6.2. Padronização dos parâmetros de análise para os estudos de MCVL	44
4.6.2.1. Espectro de emissão: Doxorrubicina	44
4.6.2.2. Espectro de emissão: BODIPY FSE-8	45
4.6.2.3. Validação dos parâmetros de análise – MCVL.....	46
4.6.3. Mecanismo de Permeação <i>in vitro</i>	48
4.6.3.1. Permeação passiva	48
4.6.3.1.1. DOX e BODIPY FSE-8 em solução.....	48
4.6.3.1.2. NLS encapsulada com DOX e BODIPY FSE-8.....	50
4.6.3.2. Permeação Iontoforética	54
4.6.3.2.1. DOX e BODIPY FSE-8 em solução.....	54
4.6.3.2.2. NLS encapsulada com DOX e BODIPY FSE-8	56
4.6.4. Estudos Quantitativos <i>in vitro</i>	61
4.7. Estudos de permeação cutânea passiva e iontoforética <i>in vivo</i>	63
4.7.1. Mecanismo de permeação <i>in vivo</i>	63
4.7.1.1. Permeação passiva - pele	65
4.7.1.1.1. DOX e BODIPY FSE-8 em solução.....	65
4.7.1.1.2. NLS contendo DOX e BODIPY FSE-8	67
4.7.1.2. Permeação Iontoforética – pele.....	69
4.7.1.2.1. Iontoforesse da DOX e BODIPY FSE-8 em solução.....	70
4.7.1.2.2. Iontoforesse da NLS contendo DOX e BODIPY FSE-8.....	71
4.7.1.3. Análise tumoral por MCVL.....	72
4.7.2. Estudos quantitativos	74
5. CONCLUSÃO	76
6. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	78
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	79
ANEXO	86

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

O desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos tem ganhado importância no cenário de descoberta de novos medicamentos durante os últimos anos. Dentre as razões para isso, uma das principais é o fato de que o estudo da síntese de novos fármacos não pode garantir por si só o progresso necessário no desenvolvimento de novos tratamentos para as doenças. Desta forma o desenvolvimento e uso de novos sistemas de liberação se coloca como uma alternativa por permitir o aperfeiçoamento de fármacos previamente estudados de forma eficiente (Mehnert; Mäder, 2001), permitindo o desenvolvimento de novas terapias.

Através da aplicação de sistemas de liberação de fármaco pode-se, por exemplo, modular parâmetros farmacocinéticos de um fármaco como: solubilidade (baixas solubilidades tendem a levar a baixa absorção), metabolização ou eliminação e toxicidade. (Mehnert; Mäder, 2001). Com a melhora das características de um determinado fármaco, tratamentos previamente rejeitados, ou de baixa eficácia, podem ser reaproveitados na farmacoterapia moderna de forma relativamente barata e rápida.

Entretanto o uso de novos sistemas de liberação de fármacos na terapia encontra alguns problemas. Entre eles, o elevado custo de produção, dificuldades de escalonamento industrial, eventuais resíduos de solventes provenientes da produção, toxicidade e instabilidade do fármaco em relação ao sistema de liberação desenvolvido (Mehnert; Mäder, 2001). Neste contexto, as nanopartículas lipídicas sólidas (NLS), um sistema composto por uma mistura de lipídios, sólidos a temperatura ambiente, com tensoativos hidrofílicos e/ou lipofílicos e água, foram desenvolvidas com o objetivo de se tornar uma alternativa aos demais sistemas coloidais de carreamento de fármacos como lipossomas, micro e nanopartículas poliméricas e outros (Müller; Mäder; Gohla, 2000; Mühlen; Schwarz; Mehnert, 1998).

Entre as vantagens da utilização das NLS, pode-se citar: a possibilidade de controle de liberação do fármaco, o aumento da estabilidade do fármaco, o direcionamento do tratamento para alvos específicos (“drug targeting”), a possibilidade de esterilização e fácil escalonamento industrial e, principalmente, o uso de materiais biodegradáveis em sua produção. Entretanto, desvantagens como limitada capacidade de incorporação de fármacos hidrofílicos e instabilidade do sistema durante o armazenamento (relacionada aos processos de agregação das nanopartículas e geleificação da formulação), já foram relatadas na literatura (Mehnert; Mäder, 2001; Shafer-Korting; Mehnert; Korting, 2007).

São muitas áreas da farmacoterapia que podem se beneficiar das qualidades dos sistemas de liberação coloidais como as NLS. Uma que merece especial atenção pelo grande problema de saúde que representa é a quimioterapia para o tratamento de câncer.

No Brasil, o Instituto Nacional do Câncer (INCA) estimou a ocorrência de 518.510 casos novos de câncer para 2012 (e também 2013), com prevalência do câncer de pele tipo não melanoma (134 mil casos), próstata (60 mil), mama feminina (53 mil), cólon e reto (30 mil) e pulmão (27 mil). É interessante ressaltar aqui a prevalência dos casos de câncer de pele tipo não melanoma entre os brasileiros, que sozinho, representa mais do que a soma dos segundo e terceiro colocados em números de casos no nosso país.

O termo “câncer de pele do tipo não melanoma” é usado principalmente para definir os carcinomas de células basais e de células escamosas (Madan; Lear; Szeimies, 2010). O carcinoma de células basais é mais comum na cabeça e pescoço (quase 80% dos casos) e normalmente se apresenta na forma de uma úlcera com bordas duras e centro ulcerado. Entretanto outras formas também são conhecidas como a nodular ou cística (mais comum na cabeça e pescoço), a superficial (mais comum no tronco) e a de células basais pigmentadas. O carcinoma de células escamosas, originado dos queratinócitos, está associado em alguns casos a pré-malignidades (doença de Bowen) ou lesões precursoras como a queratose actínica. Estas condições podem ser usadas como marcadoras para a identificação e tratamento antecipado do carcinoma de células escamosas *in situ*, a fim de se evitar o surgimento de metástases e destruição tecidual, já que este tipo de tumor é normalmente considerado mais invasivo do que o carcinoma de células basais (Madan; Lear; Szeimies, 2010; Ogden; Telfer, 2009).

O tratamento do câncer de pele do tipo não melanoma normalmente é cirúrgico, o que pode levar a cicatrizes, perda de função tecidual e desfiguramento, e desta forma à rejeição do paciente pelo tratamento, principalmente no caso de tumores localizados em regiões esteticamente importantes como o rosto. Além disso, o procedimento cirúrgico pode não ser viável em casos de tumores multifocais, muito extensos ou em locais não passíveis de remoção (Madan; Lear; Szeimies, 2010). Tratamentos não cirúrgicos vêm sendo propostos nas últimas décadas como alternativas para o tratamento do câncer de pele tipo não melanoma. Como exemplos, podemos citar a crioterapia, a terapia fotodinâmica (PDT), a radioterapia, e a quimioterapia.

A crioterapia é um procedimento não cirúrgico baseado na destruição tecidual por aplicação de nitrogênio líquido sobre a lesão. É um procedimento simples, mas que pode necessitar várias reaplicações e sessões de tratamento. Normalmente é indicado para o

tratamento de pré-condições tumorais (queratose actínica, doença de Bowen) e carcinomas menos avançados ou de menos risco como o carcinoma de células basais superficiais, de pequenos nódulos do carcinoma de células basais, ou pequenos carcinomas bem diferenciados de células escamosas (Ermertcan; Hellings; Cingi, 2012).

A PDT baseia-se na destruição tecidual do tumor através de radicais livres liberados de moléculas fotoativas, sendo este composto administrado sistemicamente ou topicamente. Resumidamente, o composto administrado é ativado através da aplicação de luz, de comprimento de onda específico, na região tumoral (Ermertcan; Hellings; Cingi, 2012; Dolmans; Fukumura; Jain, 2003). Experimentos recentes têm demonstrado que a PDT apresenta boa eficácia em células de carcinoma basal, apresentando respostas tumorais superiores a 80%, tanto para administração sistêmica quanto tópica do composto sensibilizante (Soler *et al.*, 2001; Fritsch; Goerz; Ruzicka, 1998, Kalka; Merk; Mukhtar; 2000). Entretanto, alguns inconvenientes foram encontrados na administração sistêmica, como fotossensibilização generalizada, inchaço e dor. Além disso, outros estudos concluíram que apesar da PDT apresentar eficácia satisfatória no tratamento de carcinoma de células escamosas *in situ*, o procedimento não é eficaz no tratamento do carcinoma de células escamosas invasivo, o tipo mais agressivo deste câncer, normalmente apresentado na região da cabeça e pescoço. Sendo que nos casos de cânceres avançados de cabeça e pescoço a PDT é indicada apenas como tratamento adjuvante (Tope; Bhardwaj, 2008; Dilkes *et al.*, 1996).

A radioterapia é baseada na aplicação da radiação ionizante na região tumoral. Em geral, pode ser usada para o tratamento de carcinoma de células escamosas ou basais no qual a cirurgia pode levar a resultado estético ruim ou à perda de função tecidual, ou como tratamento adjuvante pós-cirúrgico, quando as margens de segurança da excisão são ambíguas. Apresenta como principal problema a exposição do paciente ao risco de aparecimento de um segundo tumor na região irradiada, além de internação hospitalar e surgimento de cicatrizes em alguns casos. O NHMRC (“National Health and Medical Research Council’s”) indica a radioterapia somente como segunda linha de tratamento e apenas nos casos de contraindicação cirúrgica ou recusa do paciente, tratamento adjuvante à cirurgia nos casos de recorrência tumoral ou tumores avançados, residuais tumorais não removíveis por cirurgia e manejo de metástases.

Pode-se constatar, portanto, que apesar do avanço na descoberta de alternativas não cirúrgicas para o tratamento do câncer de pele tipo não melanoma, os procedimentos ainda estão aquém do esperado, seja por apresentar efeitos adversos indesejáveis, ou pela ineficácia no tratamento de tumores avançados, como os tumores sólidos de cabeça e pescoço.

Entre os tratamentos quimioterápicos de tumores sólidos em geral, um dos mais utilizados é a administração endovenosa de doxorubicina (DOX). A DOX é uma molécula do grupo das antraciclina (Figura 1) e caracteriza-se pela presença de um anel quinona e um anel aromático rígido e planar ligado por uma ligação glicosídica a um anel de um amino açúcar (Arcamone *et al.*, 1997). Seu mecanismo de ação (assim como das antraciclina em geral) baseia-se na inibição da enzima topoisomerase II α , impedindo a ligação das cadeias do DNA e assim à morte celular (Tewey *et al.*, 1984).

O uso terapêutico da DOX, entretanto, apesar de incluir diferentes tipos de tumores como linfomas de Hodgkins e não Hodgkins, mielomas múltiplos, sarcoma de ovário, pulmão, estômago e seio, além de cânceres no ovário e cervical (Israel *et al.*, 2000), agrega diversos problemas. Como exemplo, pode-se citar a via de administração, que requer a presença do paciente no hospital para a aplicação. Além disso, mesmo com a administração endovenosa, a DOX sofre metabolização de aproximadamente 22% da dose inicial administrada *in vivo* e leva a formação de diferentes metabólitos hidroxilados potencialmente menos eficazes (Arnold *et al.*, 2004, Bandak *et al.*, 1999), além de ser instável frente à luz (Carmichael; Riesz, 1985) o que dificulta seu armazenamento e aplicação em ambiente hospitalar. Ainda, outro grave problema da utilização da DOX na quimioterapia é a elevada cardiotoxicidade relacionada ao grupo quinona das antraciclina utilizadas na terapia (Arcamone *et al.*, 1997).

Figura 1. Estrutura molecular das antraciclina: doxorubicina, epirubicina, daunorubicina e idarubicina (retirado de Taveira, 2009)

A administração tópica da DOX pode, portanto, ser uma alternativa para tratar tumores cutâneos com menos efeitos colaterais sistêmicos. Já foi observado, por exemplo, que promotores de absorção cutânea, como a monoleína, são capazes de aumentar a penetração da DOX no estrato córneo (EC) (principal barreira para a penetração de substâncias na pele) através da desorganização reversível do mesmo (Herai *et al.*, 2007). Entretanto, apesar do aumento da permeação da molécula, a mesma não difundia para as camadas mais profundas da pele devido à forte interação da DOX com o EC (Herai *et al.*, 2007). A influência da iontoforese, um método físico que utiliza uma corrente elétrica de baixa densidade, em soluções contendo DOX também já foi avaliada por Taveira e colaboradores (Taveira *et al.*, 2009). Contudo, apesar da iontoforese ter aumentado significativamente a penetração da DOX quando comparada com o uso do promotor de absorção, uma alta porcentagem de fármaco continuou retida no EC. Como se sabe que a aplicação da iontoforese extrapola a barreira conferida à pele pelo EC, esta retenção inesperada indica interações muito fortes da DOX com esta camada da pele, dificultando sua difusão para camadas mais profundas e até promovendo a degradação do fármaco.

Desta forma, visando diminuir a interação da DOX com o EC, além de protegê-la da degradação, o presente trabalho propôs a encapsulação da DOX em NLS contendo monoleína em sua composição. A monoleína (Figura 2) é um lipídio sólido conhecido pela sua propriedade tensoativa e promotora de absorção além da capacidade de se auto-organizar em diferentes arranjos conformacionais sob diferentes condições (Briggs; Caffrey, 1994; Shah; Sadhale; Chilukuri, 2001; Kulkarni *et al.*, 2011). Essa capacidade reorganizacional poderia favorecer a ação promotora de absorção das NLS, ao se levar em consideração a teoria do mecanismo promotor de absorção das NLS mais aceita atualmente. Segundo esta teoria, a NLS, devido ao seu caráter lipofílico e menor tamanho em relação aos sistemas microparticulados, tem a capacidade de formar um filme coeso e apolar sobre a pele (oclusividade), diminuindo a evaporação da água, levando a hidratação do EC. Essa hidratação pode desorganizar parcialmente o EC, gerando a perda parcial de sua capacidade de barreira, facilitando a difusão de fármacos (Schafer-Korting; Mehnert; Korting, 2007; Pardeike; Hommos; Müller, 2009). Neste caso, NLS baseadas em monoleína poderiam apresentar uma maior capacidade de coesão e auto-organização sobre a pele, levando a formação de um filme mais eficiente na retenção de água, e assim a uma maior hidratação do EC.

Figura 2. Estrutura Molecular: monoleína

Ainda, considerando-se que para o tratamento eficaz de tumores cutâneos a formulação deve liberar a DOX nas camadas mais profundas da pele, objetivou-se verificar a influência da iontoforese na capacidade de permeação da formulação. A iontoforese é uma técnica física promotora de absorção de fármacos baseada no princípio geral da eletricidade, no qual cargas opostas se atraem e cargas iguais se repelem.

Para a aplicação da iontoforese utiliza-se um dispositivo composto por dois compartimentos, um com a formulação aquosa contendo o fármaco e o outro com meio condutor. Em cada compartimento insere-se um eletrodo, um de carga positiva e outro de carga negativa, e aplica-se então uma corrente elétrica de baixa intensidade (menor ou igual a 0,5 mA/cm² de área tratada) a qual é responsável pelo aumento da permeação do fármaco na pele. Os eletrodos normalmente utilizados são os de prata e cloreto de prata para o compartimento positivo e negativo respectivamente. A corrente aplicada, apesar de apresentar baixa voltagem, inferior a da eletrólise da água (evitando mudanças de pH na formulação), é capaz de promover a permeação do fármaco através da pele por 2 mecanismos: a eletromigração e a eletrosmose (Panchagnula *et al.*, 2000; Marro *et al.*, 2001; Kalia *et al.*, 2004; Gratieri; Gelfuso; Lopez, 2008).

A eletromigração baseia-se na repulsão existente entre a formulação (ou o fármaco) e o eletrodo de mesma carga no qual é aplicada a corrente elétrica. Esta repulsão gera um movimento ordenado de cargas em direção oposta ao eletrodo, ou seja, em direção à barreira de permeação do fármaco, fazendo com que ocorra um aumento da permeação do mesmo. A eletrosmose deve-se a condição natural na qual ocorre o fluxo de certo volume do solvente devido à movimentação de cargas quando uma diferença de potencial é aplicada sobre a pele. Em condições fisiológicas a pele se encontra carregada negativamente e o fluxo de cátions é favorecido em relação ao fluxo de ânions, prevalecendo o fluxo de solvente do eletrodo positivo para o eletrodo negativo. Mas em condições de pH abaixo do ponto isoelétrico da pele (pI entre 4 e 4,5) (Merino *et al.* 1997), a pele pode apresentar característica mais positiva, favorecendo o transporte de ânions e prevalecendo o fluxo de solvente do eletrodo negativo para o positivo (Gratieri; Gelfuso; Lopez, 2008).

Devido à fluorescência emitida pela DOX em comprimento de onda em torno de 500 nm, a influência da iontoforese e das NLS na distribuição e via de penetração da DOX na pele pode ser avaliada por microscopia confocal de varredura a laser (MCVL). Esta técnica, cujo princípio consiste na excitação de compostos fluorescentes (fluoróforos) com lasers de diferentes comprimentos de ondas, com subsequente captura da emissão da fluorescência em regiões espectrais específicas para cada substância (Alvarez-Román *et al.*, 2004), é capaz de permitir a visualização da DOX nas diferentes camadas de pele ao se avaliar a emissão de fluorescência característica deste fármaco, em contraste com o meio em que se encontra.

A MCVL é uma técnica que tem ganhado importância nos últimos anos para a obtenção de imagens de alta resolução de amostras de pele (e outras origens), tendo demonstrado potencial para se avaliar inclusive possíveis mecanismos de permeação de diferentes sistemas de liberação na pele. Por exemplo, Verma *et al.* (2003) avaliaram a influência do tamanho de diferentes lipossomas (120-810 nm) carregados com carboxifluoresceína (fluoróforo hidrofílico) ou 1,1'-dioctadecil-3,3,3',3'-tertrametilindocarbocianina perclorato (DiI, fluoróforo lipofílico) na permeação cutânea desses fármacos. Através da relação entre estudos de permeação e de visualização da fluorescência por MCVL, Verma e colaboradores demonstraram que existe uma relação inversa entre a capacidade de permeação e marcação de fluorescência na pele e o tamanho dos lipossomas marcados. Em outro estudo, Lopez *et al.* (2011) comparou a permeação de “quantum dots” (QD), que são partículas metálicas altamente fluorescentes, com diferentes cargas superficiais e tamanho entre 10 e 20 nm, em peles tratadas com ultrassom e lauril sulfato de sódio (US-LSS) através de estudos de permeação e MCVL. Foi observado que a aplicação de US-LSS aumentou de 500% a 1300% a permeação dos QD em relação a pele não tratada, sendo o QD catiônico (potencial zeta: $27,6 \pm 0,8$ mV em pH 5) o de maior permeação. A MCVL permitiu a observação dos QD em camadas profundas das peles tratadas com o US-LSS.

No entanto, para se avaliar a influência da iontoforese ou de qualquer outra estratégia na penetração de NLS, que diferente dos QD não são fluorescentes, é preciso marcar a nanopartícula com um fluoróforo. A fluorescência emitida pelo fluoróforo marcado da NLS deve também ser diferente da fluorescência emitida pelo fármaco que ela carrega para ser possível diferenciar a via de penetração de ambos. Existem diversos estudos envolvendo marcação de NLS na literatura. Uma técnica comumente utilizada para este fim é a ligação química de um componente da NLS a um composto fluorescente. Sandri *et al.* (2010) desenvolveu NLS associada a quitosana para carrear ciclosporina A para dentro das células da córnea. Em seu estudo, além da caracterização físico-química das NLS desenvolvidas,

também foi estudada a captação celular das NLS por MCVL. Para isto, a quitosona foi ligada quimicamente ao FITC (“Fluorescein Isothiocyanate”, Figura 3), um fluoróforo comumente utilizado para a marcação de proteínas, e posteriormente utilizada para a produção das NLS. Apesar do sucesso na visualização de fluorescência em seus estudos na córnea, e na interpretação desta marcação como a própria NLS, já que a fluorescência está “ligada” aos componentes da partícula, é necessário observar que este tipo de técnica apresenta uma limitação para a interpretação de seus resultados. Ao ligar covalentemente um marcador, como a fluoresceína (FITC), por exemplo, em um dos lipídeos que compõe a partícula modifica-se também a própria estrutura química do componente, alterando suas interações intra e intermoleculares, estabilidade, e o próprio tamanho da molécula. Estas modificações podem afetar diretamente a NLS desenvolvida, alterando inclusive mecanismos de permeação ou tempo de liberação do fármaco, quando comparada a NLS produzida sem a utilização de um componente marcado. Portanto, resultados de análises envolvendo sistemas de liberação marcados desta maneira não devem ter seu comportamento comparado ao de outros experimentos envolvendo o mesmo sistema não marcado, como se estes fossem exatamente os mesmos.

Figura 3. Estrutura molecular do FITC, Peso Molecular de 389

Outra técnica comumente utilizada para a marcação de NLS é a adição de um marcador de fluorescência (normalmente lipofílico) diretamente na formulação, para que esta substância faça parte da composição da mesma. Esta técnica, por utilizar uma baixa quantidade de marcador (quando comparada a técnica de marcação por ligação química, na qual se marca todo o componente lipídico da NLS), tende a influenciar muito pouco na matriz do sistema nanoestruturado, além dessa modificação ser facilmente visualizada por análise de parâmetros físico-químicos como tamanho e potencial zeta da partícula, aumentando a confiabilidade na comparação de resultados entre sistemas marcados e não marcados. Entretanto, existe a desvantagem de não se saber exatamente se o marcador se encontra dentro ou ao menos em contato com o sistema de liberação, quando em condições de experimentação. Dentre os marcadores utilizados para este tipo de teste, o “nile red” é um dos

mais utilizados. Vighi *et al.* (2010) realizaram um estudo semelhante ao de Sandri *et al.* (Sandri *et al.*, 2010) no qual demonstraram a internalização de NLS fluorescentes contendo protamina em células COS-I. Para a marcação das NLS, entretanto, foi adicionado uma solução metanólica contendo 200 µL de “nile red” diretamente na fase lipídica. Os autores, posteriormente, avaliaram células incubadas com NLS fluorescentes por 12 horas por MCVL e inferiram seus resultados em função da fluorescência do “nile red”, como parte da própria NLS.

Em outro estudo, desenvolvido por Küchler *et al.* (2009), foi comparada uma formulação controle de uma emulsão de “nile red” com outros dois sistemas nanoestruturados, sendo um de NLS e outro de multinúcleos dendríticos (“dendritic core-multishell” (CMS)), ambos com “nile red” incorporado em sua formulação, quanto a interação destes sistemas com a pele, assim como a sua capacidade de internalização em queratinócitos humanos. Para os estudos com a pele, peles tratadas com as formulações foram cortadas em cortes verticais de 20 µm e levadas para análise em um microscópio de fluorescência invertido. A intensidade de fluorescência emitida pelo EC, epiderme viável e derme, quando as amostras foram excitadas com laser de 546 nm (leitura de emissão em 585 nm) foi avaliada. Para os estudos de internalização, os autores utilizaram um MCVL para analisar queratinócitos tratados com os sistemas nanoestruturados marcados. Novamente, o “nile red” foi utilizado como marcador de fluorescência para a própria NLS e todos os resultados e interpretações partiram do pressuposto de que o marcador estaria dentro da NLS e estável.

Abdel-Mottaleb *et al.* (2011) compararam a permeação de ibuprofeno através da pele quando carregado por diferentes sistemas de liberação lipídicos e poliméricos. Foram estudadas um total de 16 formulações, e destas, selecionadas 4 formulações com características mais próximas entre si para os estudos no MCVL. Destas 4 formulações foram selecionadas uma de NLS (núcleo: Witepsol H15), uma de nanocápsula lipídica (núcleo: Mygliol 812), uma de carreador lipídico nanoestruturado (núcleo: Mygliol 812+ Witepsol H15) e uma de nanopartícula polimérica a base de PLGA. O ibuprofeno foi encapsulado nas nanopartículas e o corante “nile red” adicionado às formulações para ser visualizado na pele por MCVL. Os resultados indicaram que todas as nanopartículas lipídicas aumentaram a permeação e o fluxo do fármaco através da pele em quantidades semelhantes, mas provavelmente por caminhos distintos (Abdel-Mottaleb, *et al.* 2011).

Muitos outros estudos podem ser citados utilizando o “nile red” como marcador de sistemas nanoestruturados (Jore *et al.*, 2005, Roman *et al.*, 2002, Roman *et al.*, 2004, Roman *et al.*, 2005,), da influência de técnicas físicas promotoras de absorção de fármacos como a

iontoforese ou a sonoforese (Guy *et al.*, 1992, Turner *et al.*, 1997, Roman *et al.*, 2003) e da influência de agentes promotores de absorção (Saunders *et al.*, 1999). Entretanto, apesar de bem estabelecida, a utilização do “nile red” como marcador possui algumas limitações. O “nile red” (Figura 4) é uma benzofenoxazona lipofílica conhecida pela forte fluorescência em amplo espectro de emissão quando dissolvida em solventes orgânicos. No entanto, quando disperso em meio aquoso, o composto perde toda sua cor e fluorescência. Além disso, o “nile red” apresenta uma característica conhecida como solvatocromismo, isso é, sua banda de absorção de energia varia em relação à sua forma, posição espectral e intensidade dependendo da natureza do solvente ou do meio onde ele está disperso, como em preparações lipídicas (microemulsões, lipossomas, NLS, CLN). O mesmo ocorre com seu espectro de emissão, tendo uma relação direta com a apolaridade do meio em que o “nile red” se encontra (Jore *et al.*, 2005). Estas características podem atrapalhar a detecção do mesmo e em alguns casos levar a uma interpretação equivocada de resultados.

Outro problema do Nile Red advém de seu amplo espectro de emissão. Em situações onde são utilizados mais de um agente fluorescente em uma mesma formulação para análise, é necessário que estes compostos apresentem emissões em regiões diferentes, o que é mais facilmente alcançado quando ambos componentes apresentam faixas estreitas e distantes de fluorescência. Este é o problema específico que inviabiliza a utilização do “nile red” como marcador para NLS encapsuladas com DOX, pois a região de emissão do corante inclui regiões de emissão da DOX, o que dificulta ou até impossibilita a diferenciação de ambos por MCVL.

Figura 4. Estrutura Molecular do “nile red”. Peso Molecular de 318,37

Desta forma, um marcador “ideal” para as NLS contendo DOX deve ser suficientemente apolar para se dispersar facilmente na fase lipídica da formulação, ter peso molecular próximo ao do FITC e ao do “nile red”, com região de absorção e emissão de fluorescência distintos da DOX e da pele, além de alta intensidade de fluorescência. Dentro destes conceitos de um corante “ideal” para a marcação da NLS carregada com DOX, o laboratório de Química Heterocíclica e Medicinal da FCFRP-USP sob a responsabilidade do professor doutor Flávio da Silva Emery desenvolveu uma série de compostos fluorescentes derivados do 4,4-Difluoro-

4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno (Figura 5). Este composto, mais conhecido pela sua abreviatura BODIPY, se trata de uma pequena molécula apolar (cujo cromóforo se apresenta eletricamente neutro) conhecido como um corante de alta absorção na região do Ultra Violeta (UV) e pela emissão de picos intensos e estreitos de fluorescência com altos rendimentos quânticos em regiões normalmente abaixo de 600 nm (Loudet; Burgess, 2007). Além disso, seus derivados normalmente estão relacionados a características espectrais superiores a corantes tradicionais como a fluoresceína, o “Texas Red” ou a tetrametilrodamina (Ulrich; Ziessel; Harriman, 2008).

Figura 5. Estrutura molecular do BODIPY (4,4-Difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno)

De uma ampla série de compostos desenvolvidos pelo Laboratório de Química Heterocíclica e Medicinal, um composto nomeado BODIPY FSE-8 (Figura 6) foi escolhido como marcador padrão para as NLS fluorescentes deste projeto. Esta molécula foi selecionada como modelo para os primeiros testes de marcação por diversas razões. A começar pela característica fortemente apolar e planar (Figura 7) de seu núcleo, o que estabelece uma maior afinidade do corante pela NLS, além de poder facilitar a sua acomodação no sistema nanoparticulado sem a consequente desestabilização do mesmo. O corante ainda apresentou peso molecular de 330,2, próximo ao do “nile red”, já muito utilizado como marcador fluorescente incorporado em sistemas de liberação. Além disso, apresentou forte estabilidade a temperatura, luz e solventes orgânicos em testes prévios realizados pelo aluno Lucas Rezende, no Laboratório de Química Heterocíclica e Medicinal. Entretanto, entre todas as características, a razão principal para a escolha do BODIPY FSE-8 foi a sua forte emissão de fluorescência em 522 nm, quando excitado em 512 nm, longe dos picos de emissão mais energético da DOX na faixa de 545-555 nm e 596 nm (itens 4.6.2.1. e 4.6.2.2), e suficientemente intenso para poder ser diferenciado da autofluorescência da pele quando analisado por MCVL.

Figura 6: Estrutura Molecular do BODIPY FSE-8

Figura 7. Vista frontal e lateral do BODIPY FSE-8 em 3D.

2. OBJETIVOS

Estudar *in vitro* a distribuição e via de penetração cutânea passiva e iontoforética da DOX livre e encapsulada em NLS fluorescentes contendo monoleína em sua composição e verificar *in vivo*, em carcinoma de células escamosas induzidos em camundongos imunossuprimidos, a influência das NLS e da iontoforese nesta penetração.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material

Para a produção das NLS, a monoleína (Myverol[®] 18-92K) foi doada pelo Kerry Group (Tralee, Co.Kerry, Irlanda), o CTAB (“Cetyl Trimethylammonium Bromide” -

Cetremide[®]) e o ácido esteárico foram obtidos da Vetec (Duque de Caxias, RJ, Brasil). Para a produção das NLS foi utilizado o Ultra-Turrax[®] T-25 Basic, adquirido da Ika (Guangzhou, China) e quando apropriado, o homogeneizador de alta pressão da Avestin[®], modelo Emulsiflex-C3. O filtro utilizado foi o de membrana de celulose, com poro de 0,8 µm e 47 mm de diâmetro, código AAWP04700, da Millipore (Bedford, MA, EUA). Para a marcação das NLS fluorescentes foi utilizado o marcador BODIPY FSE-8 sintetizado pelo laboratório de Química Heterocíclica e Medicinal, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP) sob a responsabilidade do Prof Dr Flávio da Silva Emery. A DOX foi doada pela Zodiac Produtos Farmacêuticos (Pindamonhangaba, SP, Brasil).

Para a caracterização das NLS quanto ao tamanho e carga foi utilizado o equipamento Malvern Zetasizer ZS 90 (Malvern Instruments Ltd., Inglaterra). Além disso, para a determinação da eficiência de encapsulação e rendimento das partículas com fármaco, foi empregado o dispositivo AMICON[®] ultra, ultracel – 50k, (Millipore; Bedford, MA, EUA) e Ultra-centrífuga Megafuge 16R da Thermo Fisher Scientific[®] (Tokio, Japão).

Para análise quantitativa da DOX foi utilizado espectrofotômetro da Agilent[®] Technologies (Santa Clara, Califórnia, EUA), modelo 8453 ou um cromatógrafo líquido de alta eficiência (Shimadzu, modelo LC10-AD), composto por bombas (LC10-AT), injetor automático (modelo 9SIL-10AD), forno (modelo CTO-10SA), coluna Lichrosphere 100 RP-18 (5µm x 125 mm x 4mm) e pré-coluna (5µm x 10 mm x 4mm), acoplado a um detector de fluorescência (modelo RF-10AX) e a um computador equipado com programa de análise cromatográfica CLASS-VP.

Os estudos de microscopia foram realizados utilizando microscópio confocal de varredura a laser Leica TCS SP2. Para o preparo das lâminas foi utilizado meio Tissue Tek[®] e Fluormount[®].

A água purificada utilizada foi tratada por sistema de osmose reversa.

3.2. Desenvolvimento das Nanopartículas Lipídicas Sólidas

As NLS foram obtidas pelo método de microemulsão (Aquilano; Cavalli; Gasco, 1993). O princípio deste método baseia-se em verter uma microemulsão quente em água gelada, sob agitação vigorosa, por um determinado tempo. Para que isto fosse possível, primeiramente foi necessário preparar uma microemulsão quente a partir dos compostos propostos em nosso projeto.

Para o preparo da microemulsão, o processo baseou-se na dispersão da mistura de água e CTAB, pré-aquecidos a 90°C, em fase lipídica, composta por monoleína e ácido

esteárico, também fundidos a 90°C, seguido de agitação magnética por 15 minutos (modelo IKA, C-MAH HS-7). Para a determinação das proporções desses compostos que levaria a formação de uma microemulsão transparente, foi utilizado o método do diagrama de fases, como descrito por Treguier *et al.*, (1975), e Lo *et al.*, (1977). Basicamente, o diagrama de fases é representado no plano como um triângulo equilátero, onde os 3 constituintes são simétricos. Os 3 vértices do triângulo correspondem a 100% dos três constituintes: tensoativos, fase lipídica e fase aquosa. Como representado na Figura 8, o ápice do triângulo representa 100% do tensoativo (CTAB:monoleína 2:1), o da direita, 100% de fase lipídica (ácido esteárico) e o do canto da esquerda, 100% de fase aquosa. Para determinar a concentração de um ou mais componentes, num certo ponto, é necessário desenhar uma paralela ao lado oposto do vértice de 100% do mesmo componente (Bernardi, 2011). As concentrações dos componentes em cada ponto do diagrama estão demonstradas na Tabela 1 e correspondem aos pontos representados na Figura 8.

Das formulações possíveis de serem obtidas a partir do diagrama de fases, foram selecionadas e testadas as concentrações correspondentes aos pontos 11 - 28 da Figura 8. Esses pontos foram selecionados considerando-se que formulações de NLS preparadas a partir do método de microemulsão normalmente são formadas a partir de microemulsões contendo cerca de 25% de tensoativos (Wissing *et al.*, 2000). Desta forma, para o “screening” inicial das microemulsões, padronizou-se testar apenas as formulações com as concentrações de tensoativos superiores a 10% e inferiores a 40%.

Figura 8. Diagrama de Fases representando as concentrações avaliadas de tensoativo, (CTAB:monoleína 2:1), ácido esteárico e água para a formação da microemulsão. Estão destacadas as formulações 25 e 26 que formaram microemulsão nas condições testadas

Tabela 1. Concentrações de ácido esteárico (fase lipídica), tensoativos (CTAB:monoleína 2:1) e Água Purifica utilizadas para o desenvolvimento da NLS. Os números das formulações correspondem aos números do diagrama de fases (Figura 8).

Formulação	Ácido Esteárico (%)	Tensoativo (%)	Água (%)
1	10	80	10
2	10	70	20
3	20	70	10
4	10	60	30
5	20	60	20
6	30	60	10
7	10	50	40
8	20	50	30
9	30	50	20
10	40	50	10
11	10	40	50
12	20	40	40
13	30	40	30
14	40	40	20
15	50	40	10
16	10	30	60
17	20	30	50
18	30	30	40
19	40	30	30
20	50	30	20
21	60	30	10
22	10	20	70
23	20	20	60
24	30	20	50
25	40	20	40
26	50	20	30
27	60	20	20
28	70	20	10
29	10	10	80
30	20	10	70
31	30	10	60
32	40	10	50
33	50	10	40
34	60	10	30
35	70	10	20
36	80	10	10

Através do método de diagrama de fases foram obtidas 2 formulações, que nas condições testadas, formavam uma microemulsão límpida. Estas foram as formulações 25 e 26 representadas na Tabela 1 e destacadas na Figura 8.

Depois de determinado experimentalmente os pontos correspondentes aos de formação de microemulsão, estas foram selecionadas e produzidas para o preparo da NLS. Para isto, a microemulsão, ainda quente, foi dispersa em água gelada (0-5°C) sob agitação vigorosa (Ultra-Turrax®, 20000rpm) usando a proporção de 1:20 (microemulsão:água) por 10 minutos.

Por fim, após o preparo e caracterização das NLS obtidas, a F25 foi selecionada como modelo e então modificada quanto a razão de tensoativos de 2:1 para 1:0, 1:1 e 1:2 (CTAB:monoleína), e posteriormente filtrada, objetivando-se melhorar o tamanho médio e o potencial zeta da NLS.

3.3. Desenvolvimento das Nanopartículas Lipídicas Sólidas contendo Doxorrubicina

A produção de NLS com DOX seguiu o método de produção da melhor NLS branca (sem fármaco) obtida. Esta NLS foi produzida a partir da microemulsão 25 da Tabela 1. Basicamente manteve-se o mesmo método de produção descrito no item 3.2, alterando-se a razão de tensoativos utilizados de 2:1 para 1:2 (CTAB:monoleína). Além disso, a DOX foi adicionada diretamente na fase lipídica após a fusão do ácido esteárico e da monoleína. As concentrações de DOX testadas foram de 1, 2, 3 e 4%, em relação a quantidade total de lipídio (ácido esteárico) na formulação. No final do processo, todas as formulações foram filtradas e levadas para análise.

3.4. Produção das Nanopartículas Lipídicas Sólidas por Homogeneização a Alta Pressão

Para a produção das nanopartículas pelo método de homogeneização a alta pressão, primeiramente foi produzida NLS contendo 4% de DOX pelo método de microemulsão como descrito no item 3.3. Após, a formulação foi homogeneizada no homogeneizador de alta pressão por 10 minutos, ou 4 ciclos, sob 500 bar de pressão, e então retirada e analisada

3.5. Desenvolvimento de Nanopartículas Lipídicas Sólidas fluorescentes

A produção de NLS fluorescentes foi dividida em 2 etapas. Na primeira a partícula foi marcada com fluorescência na ausência de DOX e na segunda etapa, na presença do fármaco.

3.5.1. Desenvolvimento de Nanopartículas Lipídicas Sólidas fluorescentes sem Doxorrubicina

Primeiramente foi desenvolvido a NLS fluorescentes contendo apenas o marcador fluorescente e realizada a avaliação das características físico-químicas das partículas e a eficiência de encapsulação do marcador, de forma a se garantir a viabilidade dos estudos. Para isto seguiu-se o método de produção da melhor NLS branca obtida, seguida pelo processo de homogeneização a alta pressão.

O método de produção baseou-se na microemulsão 25 da Tabela 1, alterando-se a razão de tensoativos de 2:1 para 1:2 (CTAB:monoleína) como descrito no item 3.2. O composto fluorescente BODIPY FSE-8 foi adicionado diretamente na fase lipídica fundida, juntamente com o ácido esteárico e a monoleína, para uma concentração final de 76 µg/mL do marcador fluorescente (0,4% da fase lipídica – ácido esteárico). Após a formação das NLS pelo método de microemulsão, as mesmas foram deixadas em repouso por 1 hora e então homogeneizadas a alta pressão por 10 minutos, ou 4 ciclos, sob 500 bar de pressão, e então analisada.

3.5.2. Desenvolvimento de Nanopartículas Lipídicas Sólidas fluorescentes contendo Doxorrubicina.

O processo de produção descrito no item anterior foi tomado como modelo e modificado para a adição do fármaco. Para isto, além da adição do marcador fluorescente na fase lipídica, também foi adicionado DOX, na proporção de 4% em relação a fase lipídica (ácido esteárico), e somente então adicionado a fase aquosa para a formação da microemulsão. As fases seguintes do processo mantiveram-se as mesmas, incluindo a homogeneização final da formulação no homogeneizador de alta pressão.

3.6. Caracterização das Nanopartículas Lipídicas Sólidas

Todas as NLS brancas produzidas foram caracterizadas em relação ao tamanho médio de partícula e potencial zeta. A formulação desenvolvida com as melhores características para a permeação cutânea foi selecionada para os estudos de encapsulação com a DOX para determinação da eficiência de encapsulação, rendimento e perda do processo, assim como potencial zeta e tamanho médio de partícula. Além disso, partículas fluorescentes sem fármaco também foram avaliadas em relação à eficiência de encapsulação de BODIPY FSE-8, tamanho médio e potencial zeta. Após a adição do fármaco à NLS fluorescente, avaliou-se novamente a Eficiência de Encapsulação da DOX, tamanho médio e potencial zeta.

Também foi determinado o pH da formulação de NLS contendo 4% de DOX na presença e ausência de BODIPY FSE-8

3.6.1. Tamanho médio e Índice de Polidispersividade

O diâmetro médio da partícula e o índice de polidispersividade (PdI) foram determinados por “dynamic light scattering”, usando um Malvern Zetasizer ZS (Malvern Instruments Ltd., Inglaterra). Para a análise, foram utilizados 200 µL de NLS diluída em 2 mL de água purificada. A medida foi feita utilizando ângulo de 90° à 25°C, com um laser de 50 mV.

3.6.2. Potencial Zeta

O potencial zeta das NLS foi determinado usando um Malvern Zetasizer Nano ZS 90 (Malvern Instruments Ltd., Inglaterra). Para a análise, cada amostra foi diluída em água purificada, na proporção de 1:10.

3.6.3. Rendimento do processo

Para o cálculo do rendimento do processo foi utilizado a **Equação I** (Mandawgade; Patravale, 2008), onde o rendimento é igual à razão entre quantidade total do fármaco no final do processo de produção das NLS (Q_{real}) e à quantidade de fármaco adicionado à formulação no início do processo ($Q_{\text{teórica}}$).

$$\text{Rendimento (\%)} = (Q_{\text{real}}/Q_{\text{teórica}}) \times 100 \quad \text{Equação I}$$

A $Q_{\text{teórica}}$ foi obtida com base na quantidade de DOX adicionada a formulação. Este valor variou, de acordo com a formulação produzida, de 1% a 4% de DOX em relação a fase lipídica na formulação (item 3.3.).

Para a determinação da Q_{real} foi feita a quantificação da DOX presente na formulação por espectroscopia. Para isto, uma alíquota de 1 mL da formulação foi diluída em 7 mL de etanol para liberação do fármaco encapsulado para o meio, e posteriormente feita a análise por espectroscopia como detalhado no item 3.7.

O cálculo da perda do processo é representado pela **equação II**, onde a perda expressa em percentagem equivale à diferença entre 100 e o rendimento do processo.

$$\text{Perda (\%)} = 100 - \text{Rendimento (\%)} \quad \text{Equação II}$$

3.6.4. Eficiência de Encapsulação de Doxorrubicina

O processo de determinação da eficiência de encapsulação (EE%) da DOX foi previamente validado por Taveira (2009). O cálculo da eficiência de encapsulação segue a **equação III** (Sousa *et al.*, 2011), na qual a EE% equivale à razão entre a quantidade de fármaco encapsulada ($Q_{\text{encap.}}$) e a quantidade total da DOX na formulação ao fim do processo (Q_{real}), multiplicada por 100. Para a determinação da quantidade de fármaco encapsulada ($Q_{\text{encap.}}$), foi feito cálculo da diferença entre o total de DOX na formulação (Q_{real}) e a quantidade de DOX não encapsulada (Q_{livre}) (**Equação IV**) (Sousa *et al.* 2011)

$$EE\% = (Q_{\text{encap.}}/Q_{\text{real}}) \times 100 \quad \text{Equação III}$$

$$Q_{\text{encap.}} = Q_{\text{real}} - Q_{\text{livre}} \quad \text{Equação IV}$$

O valor de Q_{real} foi calculado como descrito no item 3.6.3.

Já o valor de Q_{livre} foi determinado utilizando o dispositivo de ultrafiltração AMICON® Ultra. Este dispositivo é composto por dois compartimentos separados por uma membrana de 50 Kda. Na parte superior do dispositivo foi adicionado 1 mL da formulação contendo DOX, e então o material foi centrifugado em ultracentrífuga à 6000 rpm (4500 g), por 40 minutos à 25°C. Depois de centrifugado, a solução de DOX no compartimento inferior foi coletada para análise por espectroscopia de UV (Item 3.7), para a determinação da concentração de fármaco livre na formulação.

3.6.5. Capacidade de Carga de Doxorrubicina (“Loading Capacity”)

A “capacidade de carga” (CC%), ou “loading capacity”, do processo representa a quantidade de fármaco encapsulado em função da quantidade de lipídio presente na formulação. Foi calculado segundo a **Equação V** (Sousa *et al.* 2011).

$$CC\% = (Q_{\text{encap.}}/Q_{\text{lipídeos}}) \times 100 \quad \text{Equação V}$$

3.6.6. Determinação de pH

Imediatamente após o término da produção das NLS, 5 mL da formulação foram analisados em pHmetro previamente calibrado no mesmo dia.

3.7. Quantificação da Doxorrubicina por Espectroscopia

Para cálculo da quantidade de DOX presente nas amostras testadas foi utilizado método previamente validado por Taveira (2009) para análise espectroscópica. Resumidamente, para o preparo da curva de calibração, foram preparadas soluções de DOX em água e etanol, a partir de uma solução padrão de 100 µg/mL, nas concentrações de 10, 20, 30, 40 e 60 µg/mL e feita análise no comprimento de onda de 480 nm.

Para análise da amostra, após preparo das amostras de quantificação da Q_{real} e Q_{livre} de DOX como descrito nos itens 3.6.3. e 3.6.4., respectivamente, estas foram submetidas a sucessivas diluições (em etanol pra Q_{real} e em água para Q_{livre}) e posteriormente analisadas no espectrofotômetro, em 480 nm, de forma que o valor de absorvância observado se encontrasse entre os valores determinados para a respectiva curva de calibração de água ou etanol. Após, o valor de absorvância foi analisado na curva analítica para determinação da concentração da amostra.

3.8. Estudos *in vitro* de liberação da DOX a partir das NLS-DOX

Para os estudos de liberação foram utilizadas células de difusão vertical tipo “Franz” pertencentes ao sistema de permeação da Hanson Research (Hanson Research Corporation, modelo sistema Microette Plus® 58-001-801) e membranas de difusão sintéticas hidrofílicas de acetato de celulose (PM 12000 a 40000). Esta célula de difusão é composta por dois compartimentos, um doador e outro receptor. No compartimento doador, na metade superior da célula, foram adicionados 300 µL da formulação de NLS-DOX (área de 1,86 cm²) correspondendo à quantidade teórica de aproximadamente 230 µg de DOX, sendo que a concentração exata da DOX na formulação foi determinada antes de cada estudo de liberação por espectrofotometria UV/VIS (item 3.7). Como solução receptora foi utilizada água destilada, mantida a temperatura de 25° C (± 2,0° C), sob agitação de 300 rpm. Foram coletados 1 mL de amostra deste compartimento de tempos em tempos ao longo de 72 horas de experimento e, o mesmo volume de solução receptora foi retornada para o compartimento em questão após cada coleta. As amostras coletadas foram analisadas por CLAE (item 3.9.).

3.9. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Para os estudos de liberação e permeação cutânea, a quantidade de DOX foi determinada por CLAE. Para isso, utilizou-se um cromatógrafo líquido de alta eficiência (Shimadzu, modelo LC10-AD), composto por bombas (LC10-AT), injetor automático (modelo 9SIL-10AD), forno (modelo CTO-10SA), coluna Lichrosphere 100 RP-18 (5µm x

125 mm x 4mm) e pré-coluna (5 μ m x 10 mm x 4mm), acoplado a um detector de fluorescência (modelo RF-10AX) e a um computador equipado com programa de análise cromatográfica CLASS-VP. A fase móvel foi composta por tampão fosfato (50 mM pH=2), acetonitrila e isopropanol (65:25:2) (v/v), fluxo de 1 mL/min, volume de injeção de 100 μ L, forno a 35°C e intensidade de fluorescência 480/560 nm (excitação/emissão). A curva linear de calibração em água ($r^2 = 0,9982$) foi obtida na faixa de concentração de 50 a 4000 ng/mL de DOX (Taveira,2009).

3.10. Estudos *in vitro* de permeação passiva e iontoforética da DOX através da pele

3.10.1. Preparo da pele

A pele foi obtida de suínos com 100 dias ou 40 Kg. O animal foi abatido no mesmo dia de remoção das peles, dentro de um prazo máximo de 2 horas. Após, a pele da região abdominal e dorsal foi removida e lavada com água purificada para remoção de sangue e sujidades. Posteriormente, a pele foi cortada em tiras de 5 cm de largura, que foram guardadas em freezer a -80°C.

Nos dias de experimento a pele necessária para cada teste foi retirada do freezer e descongelada a temperatura ambiente por 20 minutos. Após, as peles foram dermatomizadas a uma espessura de 700 μ M e utilizadas para experimentação.

3.10.2. Verificação da integridade das peles

Para verificar a integridade e qualidade das peles utilizadas nos experimentos *in vitro* foi feita a medida de sua resistividade elétrica segundo Tang *et al* (2001). Para isto, antes de cada experimento envolvendo a pele, a mesma foi colocada em uma célula de “Franz” e dois eletrodos de Ag/AgCl foram posicionados, um no compartimento doador e outro no compartimento receptor da célula, sendo ambos compartimentos preenchidos com tampão Hepes 7,4 isotônico. Depois, uma voltagem de 100 mV_{rms} AC e 10 Hz foi gerada por um Gerador de Sinal Elétrico (AGILENT® 33220A) e passada através da pele por 5 segundos (Figura 9). A tensão da corrente que atravessa a pele foi medida com ajuda de um multímetro e utilizada para o cálculo da resistência total (R_t) do sistema através da lei de Ohm (**Equação VI**). Após, o mesmo sistema foi montado na ausência da pele, e então determinada a tensão gerada apenas pelo tampão, para o cálculo da resistência do tampão (R_{hepes}), também pela lei de Ohm. Considerando-se que a resistência total do sistema, na presença da pele, é a soma da resistência da pele (R_{pele}) e da resistência do tampão presente, foi calculada a resistência da

pele, através da subtração da resistência total do sistema pela resistência do tampão (**Equação VII**).

Posteriormente, foi calculada a resistividade da pele através da multiplicação da resistência da pele pela área da mesma disponível para permeação na célula de Franz (1,54 cm²) (**Equação VIII**)

$$R = U / I \quad \text{Equação VI}$$

$$R_{\text{pele}} = R_t - R_{\text{hepes}} \quad \text{Equação VII}$$

$$\rho = (R_{\text{pele}}) \cdot \text{Área} \quad \text{Equação VIII}$$

A medida da resistividade da pele foi realizada antes de cada experimento envolvendo a mesma, e somente as peles com resistividade inicial superior a 35 kΩ.cm² foram consideradas adequadas para estudos de permeação (critério este previamente estabelecido e aceito para seleção de peles *in vitro* (Tang *et al.*, 2001; Kasting e Bowman, 1990)).

Figura 9. Representação esquemática da análise de Resistividade elétrica da pele de suíno.

3.10.3. Determinação da resistência da pele após contato com a dispersão ácida de NLS.

Foi necessária avaliar a integridade da pele após contato com as NLS devido à acidez da dispersão de nanopartículas obtidas. Para isto, 10 peles foram separadas e avaliadas quanto

às suas resistividades iniciais conforme descrito no item 3.10.2.. Após, foi adicionado no compartimento doador da célula de “Franz”, uma solução aquosa contendo o CTAB na concentração de 3,33 mg/mL (a mesma concentração do tensoativo hidrofílico utilizada nas NLS) acidificada com HCl (0,1 M) até pH = 2,8. Essa solução foi mantida em contato com a pele, e calculada as resistividades das 10 amostragens, após 15, 30 e 60 min de contato com o meio ácido. Peles, que após o período de testes de 60 minutos, apresentassem resistividade inferior a 35 kΩ.cm², seriam consideradas inadequadas para testes devido a modificações do EC frente ao meio ácido com tensoativos.

3.10.4. Estudos de Permeação Passiva e Iontoforética da DOX

Os estudos de permeação foram divididos em 2 partes: (i) avaliação qualitativa da via de permeação da DOX através da pele, por microscopia confocal de varredura a laser (MCVL) e (ii) avaliação quantitativa da DOX nas diferentes camadas da pele e da DOX permeada através da pele, por CLAE.

Para os estudos de via de permeação foram conduzidos experimentos de permeação passiva e iontoforética da DOX e BODIPY FSE-8 encapsulados na NLS (NLS-DOX+BOD) ou apenas dispersos em solução (SOL-DOX+BOD). Posteriormente foi realizada a análise das peles por MCVL nos parâmetros determinados conforme item 3.10.5.1.

Para a quantificação da DOX nas diferentes camadas da pele, não foi utilizado o BODIPY FSE-8 nos testes. Desta forma, foram analisadas as peles após a permeação passiva e iontoforética apenas da DOX encapsulada na NLS (NLS-DOX) ou dispersa em solução (SOL-DOX). Evitou-se a utilização do BODIPY nestas análises a fim de se evitar possíveis interferências na análise por CLAE (item 3.9).

Para o preparo das soluções aquosas contendo DOX e BODIPY FSE-8 ou apenas DOX, antes da adição destes compostos em água, 3,33 mg/mL de CTAB foram adicionados à solução. Posteriormente foram adicionados 760 µg/mL de DOX e, quando aplicável, 76 µg/mL de BODIPY FSE-8. Após a adição de todos os compostos, a solução foi acidificada até pH 2,8, correspondente ao pH das NLS.

As concentrações dos compostos utilizados na solução correspondem às concentrações da NLS com as melhores características obtidas no desenvolvimento deste projeto, e que, por consequência, foi definida como modelo para todos os estudos de permeação (NLS formada a partir da microemulsão F25, com a proporção de tensoativos CTAB:monoleína de 1:2, contendo 4% de DOX e, quando aplicável, 0,4% de BODIPY FSE-8 em função da fase lipídica da microemulsão).

3.10.4.1. Estudos de permeação passiva

Os estudos de permeação foram realizados com peles dermatomizadas expostas às formulações de NLS (NLS-DOX ou NLS-DOX+BOD) ou à solução aquosa acidificada (SOL-DOX ou SOL-DOX+BOD). Além disso, foram realizados testes com tampão Hepes (pH 7,4) isotônico como controle.

Para os testes de permeação passiva, foram utilizadas Células de “Franz” (Figura 10), contendo tampão Hepes (pH 7,4) isotônico como meio receptor (25°C, agitação de 300 rpm), e 1 mL de formulação de NLS, tampão ou solução aquosa acidificada, como meio doador. As peles foram inseridas entre ambos os compartimentos (doador e receptor) e submetidas à permeação passiva por 1 hora. Após este tempo, a pele foi removida, lavada com água purificada para remoção do excesso de meio doador e utilizada para a preparação das lâminas de microscopia (item 3.10.5.2) ou estudos de quantificação da DOX (item 3.10.6).

Figura 10. Representação Esquemática da Célula de Franz

3.10.4.2. Estudos de permeação iontoforética

Os estudos de permeação iontoforética foram realizados com peles dermatomizadas expostas às formulações de NLS (NLS-DOX ou NLS-DOX+BOD) ou à solução aquosa acidificada (SOL-DOX ou SOL-DOX+BOD). Além disso, foram realizados testes com tampão Hepes (pH 7,4) isotônico como controle.

Para os estudos de permeação iontoforética foram utilizadas células de difusão descritas por Glikfeld *et al.* (1988) (Figura 11). Estas células foram modificadas em relação às clássicas células de difusão de “Franz”, apresentando uma divisão do seu compartimento doador, em 2 compartimentos distintos no qual são inseridos os eletrodos positivo e negativo responsáveis pelo processo de iontoforese (Figura 11, “b”). Este espaço permite que as partes

da pele em contato com os eletrodos fiquem fisicamente e eletricamente separadas entre si (Glikfeld *et al.* 1988).

Figura 11. (a) Célula de difusão iontoforética, (b) Vista superior do compartimento doador. (Taveira, 2009)

Os eletrodos utilizados foram eletrodos de Prata (Ag) e Cloreto de Prata (AgCl) obtidos conforme descrito por Lopez (2000). Resumidamente, para a obtenção do eletrodo negativo (cátodo), um fio de prata (99,9% de pureza) com a ponta dobrada foi imerso em uma pequena quantidade de cloreto de prata fundido em cadinho, e então removido com a extremidade dobrada repleta de cloreto de prata solidificado. Para o preparo do eletrodo positivo (ânodo), foi montado um circuito elétrico em série contendo fios de platina e eletrodos de AgCl mergulhados dentro de uma solução salina de NaCl (5,78 M). Uma corrente de 0,4 mA foi passada pelos eletrodos por 8 horas, saindo do terminal positivo ligado a platina e se ligando ao terminal negativo nos eletrodos de AgCl (Figura 12).

Figura 12. Representação esquemática do circuito elétrico em série para o preparo do eletrodo positivo (ânodo) através da passagem de uma corrente elétrica de 0,4 mA por 8 horas (Taveira, 2007).

Após os eletrodos estarem prontos, as células de iontoforese foram montadas, com a pele de porco separando o compartimento doador e receptor. No receptor foi adicionado meio Hepes (pH 7,4) isotonicado, a 25°C sob agitação constante a 300 rpm. No meio doador, dividido em 2 compartimentos (Figura 11, “b”), foram adicionados 1 mL da formulação contendo DOX de um lado e 1 mL de tampão Hepes (pH 7,4) isotonicado do outro. Para a iontoforese anódica, o eletrodo positivo foi colocado em contato direto com a formulação contendo a DOX e o negativo em contato com o tampão HEPES. Na iontoforese catódica (apenas estudos quantitativos), o eletrodo negativo foi colocado em contato direto com a formulação contendo a DOX e o positivo em contato com o tampão HEPES. Após a montagem de todo o sistema, uma corrente elétrica de 0,5 mA/cm² foi passada constantemente através dos eletrodos, formulação e pele, pelo período de 1h.

Depois da permeação a pele foi removida, lavada com água purificada para remoção do excesso de meio doador e utilizada para a preparação das lâminas de microscopia (item 3.10.5.2) ou estudos de quantificação da DOX (item 3.10.6).

3.10.5. Estudos da via de permeação – Microscopia Confocal de Varredura a Laser

3.10.5.1. Parâmetros de análise – MCVL

A padronização dos parâmetros de análise foi necessária para uma correta visualização dos fluoróforos na pele. Foi necessário padronizar a técnica de visualização por MCVL de forma que a emissão de fluorescência da DOX e do BODIPY FSE-8 fosse captada apenas na região determinada para os mesmos, não havendo sinal de emissão de fluorescência detectável da DOX na região determinada para o BODIPY FSE-8, e do BODIPY FSE-8 na região da DOX.

Primeiramente foi determinado o espectro de fluorescência da DOX e do BODIPY FSE-8. Baseado nestes espectros e através da manipulação dos parâmetros de excitação e emissão do MCVL durante análise de NLS encapsulada apenas com BODIPY FSE-8(NLS-BOD) e somente com DOX (NLS-DOX) foi possível diferenciar ambos os componentes de forma que não houvesse interferência significativa entre ambos.

O parâmetro utilizado foi análise sequencial de fluorescência, começando pela excitação do BODIPY FSE-8 (laser de 514 nm) e captação de sua fluorescência na região de 525 e 535 nm, seguida pela excitação da DOX (laser 543 nm) e detecção de fluorescência em 555-600nm.

3.10.5.2. Preparo das lâminas de microscopia

Após os experimentos de permeação (item 3.10.4.), a pele foi removida e utilizada para a preparação das lâminas de microscopia. Foram preparados 2 tipos de cortes para a visualização nas lâminas de microscopia, o corte transversal para a avaliação da profundidade de permeação de DOX e BODIPY dentro da pele, e o corte longitudinal para a visualização do mecanismo de permeação de ambos componentes através da pele.

Para o preparo do corte transversal, após ser retirada da Célula de “Franz”, a pele foi cortada em pedaços de aproximadamente 1x2 cm, mergulhada completamente em um recipiente retangular de plástico (aproximadamente 3x2x3 cm de comprimento, largura e profundidade) contendo Tissue Tek® a temperatura ambiente. Após, o recipiente foi mergulhado em etanol contendo gelo seco, e deixado resfriar por aproximadamente 5 minutos, até a completa solidificação do Tissue Tek® e fixação da pele em seu interior. Este meio foi então levado até um criostato mantido a -20°C e o Tissue Tek® solidificado foi cortado lateralmente em finas camadas de 30 µm de espessura. As camadas de Tissue Tek® contendo a pele em seu interior foram posicionadas sobre uma lâmina de microscopia, adicionada uma gota de Fluormount® e por fim uma lamínula sobre o material.

Os cortes longitudinais foram preparados cortando-se a pele retirada da célula de difusão em circunferências com aproximadamente 2 cm de diâmetro. Estes pedaços foram acomodados em lâmina de microscopia, e com a ajuda de um apoio de plástico (com altura de 1 mm) colocado ao redor da pele, a lamínula foi devidamente acomodada sobre a pele, sem que causasse nenhum tipo de pressão sobre a mesma que pudesse vir a danificar o material.

Após o preparo da lâmina de microscopia, as mesmas foram analisadas por MCVL no mesmo dia para que se evitasse a perda da fluorescência por degradação do material.

3.10.6. Estudos quantitativos

Os estudos quantitativos foram realizados objetivando-se determinar o perfil de distribuição da DOX, encapsulada ou não, nas diferentes camadas da pele e no meio receptor, após 1 hora de permeação passiva ou iontoforética.

Para a quantificação de DOX na pele, após os experimentos de permeação, a pele foi removida da célula de difusão e o excesso de formulação removido com excesso de água destilada passada suavemente sobre a superfície da pele. A pele foi então presa a uma superfície lisa com o EC voltado para cima. A região da pele em contato com a formulação foi submetida à técnica do “*tape stripping*”. Nessa técnica, o EC é fisicamente retirado

utilizando-se 15 fitas adesivas “coladas” e retiradas sucessivamente sobre a pele. A remoção completa do EC pôde ser confirmada pelo brilho da face exposta da pele (epiderme viável). As 15 fitas contendo partes do EC removido foram então colocadas em um tubo tipo Falcon de 15 mL e o fármaco contido nas fitas foi extraído segundo método padronizado por Heraí *et al.* (2007). Para a extração do fármaco utilizou-se 5 mL de metanol e agitação em vórtex por 3 minutos. Após esse período, a solução foi filtrada em filtro de fluoreto de vinilideno (PVDF) 0,45 µm (Milipore) e analisada por CLAE (item 3.9.) para a determinação de DOX presente no EC.

A pele remanescente (epiderme sem EC+derme) foi picotada, colocada em um tubo tipo Falcon e o fármaco presente na pele remanescente foi extraído com 5 mL de metanol com o auxílio de um homogeneizador de tecidos (Ultra turrax T25) a 3000 rpm por 1 minuto. Logo após, a amostra foi sonicada por 30 minutos com o objetivo de romper a membrana das células e então submetida à centrifugação a 3000 rpm por 10 minutos. As amostras foram filtradas em filtro de PVDF 0,45 µm (Milipore) e a quantidade de fármaco presente na epiderme sem EC + derme foi analisada por CLAE (item 3.9.).

Para avaliar a quantidade de DOX permeada através da pele, o meio receptor das células de difusão foi removido após a permeação, filtrado em filtro de PVDF 0,45 µm (Milipore) e a quantidade de fármaco presente foi analisada por CLAE (item 3.9.).

3.11. Estudos *in vivo* de permeação passiva e iontoforética da DOX

3.11.1. Modelo animal

Os estudos de permeação *in vivo* foram conduzidos em camundongos Nude Balb C imunossuprimidos, fêmeas, de 12 a 16 semanas (20-25g de massa corpórea em média). Os animais foram adquiridos do Biotério de criação do IPEN/CNEN/SP, autarquia associada à Universidade de São Paulo, sendo criados de acordo com as normas éticas estabelecidas pelo CEUA – Comissão de Ética no uso de animais de experimentação. Os animais foram mantidos em ambiente SPF (*Specific Pathogen Free*), em cama de maravalha trocada 2 vezes por semana. Houve controle de temperatura local, a qual foi mantida entre 20 e 24°C, iluminação artificial (12h claro/12h escuro), umidade natural, densidade populacional de 2 animais/454 cm² (dimensões da caixa = 27,5 (L1) x 16,5 (L2) x 12,5 cm (A)) e utilização de exaustor com 20 trocas de ar por hora, água filtrada e ração à vontade.

Todos os protocolos experimentais foram avaliados e autorizados pelo CEUA (Proc. 11.1.1579.53.6)

3.11.2. Linhagem celular e indução tumoral

A indução tumoral nos camundongos foi realizada com células de carcinoma celular escamoso humano (A431) obtidas da Coleção Americana de Cultura de Células (ATCC, American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA). A linhagem foi mantida sob criopreservação no nitrogênio líquido, em solução de congelamento com 10% de dimetilsulfóxido e 90% de SBF inativado. Para realização dos experimentos, as células foram descongeladas e expandidas em frascos de cultura celular, em meio Dulbecco's (pH 7.2 –7.4) suplementado com 10% de soro bovino fetal inativado (SBF), 10.000 U mL^{-1} de penicilina G, 10.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de ciprofloxacina, à temperatura de 37°C, em estufa incubadora umidificada contendo 95% de O_2 e 5% de CO_2 , até crescimento exponencial.

Para a indução tumoral nos animais, frascos de cultura celular com confluência superior a 75% foram selecionados e separados. O meio de cultura celular destes frascos foi removido dos frascos de cultura celular com o auxílio de pipetador automático e substituído por 20 mL de uma solução salina, para a limpeza da garrafa e completa remoção do meio de cultura. Após, a solução salina foi retirada de cada garrafa e em seguida foram adicionados 7 mL de solução salina 0,5% e 3 mL de tripsina em cada garrafa. Os frascos foram então mantidos em estufa a 37°C por 10 minutos, sendo que as garrafas foram agitadas manualmente e vigorosamente por cerca de 1 minuto nos tempos 5 e 10 min para que houvesse a liberação das células aderidas às paredes do frasco de cultura celular. Posteriormente, adicionou-se em cada garrafa 20 mL de meio Dulbecco's completo para neutralizar a ação da tripsina. O conteúdo de cada garrafa foi transferido para tubos falcons de 15 mL e centrifugado a 10°C e 1500 rpm durante 10 minutos. Após este tempo, foi removido o meio de cultura sobrenadante dos tubos falcons e o “pellet” contendo as células foi resuspenso em solução salina (100 μL por garrafa tripsinizada). Realizou-se então a contagem das células em câmara de Neubauer e a diluição do material celular suspenso para $13,3 \cdot 10^6$ células/mL. Por fim, 150 μL ($2 \cdot 10^6$ células) da suspensão de células foram inoculados por injeção subcutânea na região dorsal dos camundongos.

Depois da inoculação das células, o crescimento tumoral foi avaliado a cada 2 dias com a ajuda de um paquímetro. Após o tumor atingir entre 6 e 8 mm (Souza, 2011) os animais foram separados e selecionados para os procedimentos experimentais.

3.11.3. Estudos *in vivo* de permeação cutânea e tumoral passiva e iontoforética

Assim como nos experimentos *in vitro*, os estudos de permeação foram divididos em 2 partes: (i) avaliação qualitativa da via de permeação da DOX através da pele, por microscopia confocal de varredura a laser (MCVL) e (ii) avaliação quantitativa da DOX nas diferentes camadas da pele e da DOX permeada através da pele, por CLAE.

Para a análise do mecanismo de permeação cutânea do fármaco *in vivo* foi realizada a análise qualitativa da distribuição de fluorescência da DOX e do marcador de fluorescência lipofílico BODIPY FSE-8 na pele e no tumor por MCVL. Nestes estudos foram avaliadas a permeação passiva e iontoforética da DOX e BODIPY FSE-8 encapsulados na NLS (NLS-DOX+BOD) ou apenas dispersos em solução aquosa acidificada (SOL-DOX+BOD). Posteriormente foi realizada a análise das peles por MCVL nos parâmetros determinados conforme item 3.10.5.1.

Para o delineamento do perfil de distribuição da DOX, foi realizada a quantificação do fármaco nas diferentes camadas da pele, no tumor e no sangue por CLAE (item 3.9.). Nestes estudos foram avaliadas a permeação passiva e iontoforética apenas da DOX encapsulada na NLS (NLS-DOX) ou dispersa em solução aquosa acidificada (SOL-DOX). Evitou-se a utilização do BODIPY nestas análises a fim de se evitar possíveis interferências na análise por CLAE (item 3.9.).

Para o preparo das soluções aquosas contendo DOX e BODIPY FSE-8 ou apenas DOX, antes da adição destes compostos em água, 3,33 mg/mL de CTAB foram adicionados à solução. Posteriormente foram adicionados 760 µg/mL de DOX e, quando aplicável, 76 µg/mL de BODIPY FSE-8. Após a adição de todos os compostos, a solução foi acidificada até pH 2,8, correspondente ao pH das NLS.

3.11.4. Tratamento *in vivo* e preparo das amostras

Para a realização dos estudos de permeação *in vivo*, os animais foram tratados com as formulações de interesse, na presença e ausência de iontoforese, após o tumor ter atingido o tamanho adequado. Para isto, antes dos experimentos os animais foram anestesiados através de injeção intraperitoneal de Xilazina (10 mg/Kg) e Quetamina (75 mg/Kg). Após a anestesia, a base de uma seringa de 5 mL cortada foi utilizada como compartimento doador para a aplicação de 1 mL de formulação teste sobre o tumor do animal. Foi passado silicone ao redor da base da seringa e a mesma foi suavemente posicionada sobre a região dorsal do animal, fixada com a ajuda de fita adesiva. Nos experimentos de iontoforese, foi adicionado ainda um eletrodo de carga positiva (iontoforese anódica) juntamente com a formulação, dentro da base

da seringa, além de um segundo eletrodo fixado ao redor da cauda do camundongo, com a função de fechar o circuito para a passagem da corrente elétrica da iontoforese ($0,5 \text{ mA/cm}^2$).

Após 1 hora (para os estudos quantitativos) ou 30 minutos (estudos qualitativos) de permeação passiva ou iontoforética, a formulação foi removida com o auxílio de uma pipeta pasteur e a base recipiente removida para a limpeza suave do local de permeação com água purificada e papel higiênico macio, para a remoção do excesso de formulação. No caso dos experimentos de quantificação da DOX, antes da remoção da pele e do tumor, foi removido cerca de $700 \mu\text{L}$ de sangue do animal através de punção cardíaca. Após a retirada do sangue e antes da excisão da pele e do tumor, o animal foi eutanasiado por inalação de vapor de CO_2 . A pele e o tumor foram então removidos com o auxílio de uma tesoura e separados.

Para os experimentos de quantificação da DOX, tanto a pele quanto o tumor foram pesados separadamente e então utilizados como fontes para a extração da DOX seguindo metodologia semelhante à descrita no item 3.10.6.. Resumidamente, a pele ou o tumor removidos foram picotados, colocados em um tubo tipo Falcon e o fármaco remanescente extraído com 5 mL de metanol e homogeneização em um homogeneizador de tecidos (Ultra turrax T25) a 3000 rpm por 1 minuto. Em seguida, a amostra homogeneizada foi sonicada por 30 minutos e então submetida à centrifugação a 3000 rpm por 10 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi filtrado em filtro de PVDF $0,45 \mu\text{m}$ (Milipore) e a quantidade de fármaco presente na amostra (pele ou tumor) foi analisada por CLAE (item 3.9.).

O sangue removido por punção cardíaca foi tratado para a separação do plasma e precipitação de proteínas. Para isto, o sangue foi centrifugado por 15 minutos, a 3000 rpm , 4°C em ultracentrifuga e o plasma sobrenadante removido com a ajuda de uma seringa. Após, $300 \mu\text{L}$ de plasma foi adicionado a um tubo eppendorf de 1 mL contendo $400 \mu\text{L}$ de uma solução metanol – ZnSO_4 40% (1:1). O tubo foi então agitado em vortex por 1 minuto e centrifugado a 1500 rpm por 10 minutos. O material sobrenadante após a centrifugação foi removido e analisado por CLAE (item 3.9.) para a determinação da DOX que atravessou a pele e o tumor.

Nos estudos de MCVL, após a separação da pele e do tumor, os mesmos foram utilizados para a preparação de lâminas de microscopia longitudinais (pele) e transversais (tumor) como descrito no item 3.10.5.2.. Após o preparo das lâminas, as mesmas foram analisadas no mesmo dia por MCVL seguindo a metodologia descrita no item 3.10.5.1.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Obtenção de Nanopartículas Lipídicas Sólidas pelo Método de Microemulsão

A monoleína é um lipídio complexo que pode formar várias estruturas na presença de diferentes concentrações de água (Kulkarni *et al.*, 2011). Nós observamos que em concentrações maiores que 50% em água havia o surgimento de mesofases cristalinas, que impediam a formação de microemulsões. Por outro lado, a microemulsão foi obtida com sucesso em duas formulações da Tabela 1 (F.25 e F.26) nas razões de 40/20/40 (F.25) e 50/20/30 (F.26) de fase lipídica, tensoativos e fase aquosa respectivamente.

Os resultados da análise das NLS preparadas a partir das microemulsões F25 e F26, estão demonstrados na Tabela 2.

Tabela 2. Resultado da análise de tamanho médio e potencial zeta das NLS preparadas a partir das microemulsões: F25 (ácido esteárico: 40%; Tensoativos: 20%; Água 40%) e F26 (ácido esteárico: 50%; Tensoativos: 20%; Água 30%). O tamanho médio representado é do pico de maior intensidade (Int.) da análise. A proporção de tensoativos é de 2:1 CTAB:Monoleína

Formulação	Tamanho Médio (nm)	Int. (%)	PdI	Potencial Zeta (mV)	Desvio de Zeta (mV)
F25	264,1	95,40	0,382	65,14	38,05
F26	408,7	97,69	0,450	74,65	10,95

Como se pode observar, F25 e F26 apresentaram tamanho médio de 264,1 e 408,7 nm respectivamente, O tamanho reduzido das NLS obtidas a partir da microemulsão F25, sugere que a mesma provavelmente apresentaria uma melhor capacidade promotora de absorção cutânea de fármacos do que as NLS obtidas a partir da microemulsão F26 (Mitri *et al.*, 2011). Além disso, o alto potencial de +65 a +75 mV apresentado pelas 2 formulações, pode predizer uma adequada estabilidade de ambas frente ao armazenamento prolongado (Müller *et al.*, 2000).

É importante ressaltar aqui, no entanto, que as NLS obtidas apresentaram distribuição bimodal do tamanho de partículas. Os tamanhos médios apresentados na Tabela 2 são representativos do pico de maior intensidade de cada NLS analisada. Ambas as NLS apresentaram outro pico menos intenso com partículas superiores a 1 μm , sendo que a F25

apresentou um pico com partículas de 4618 nm com intensidade de 4,6% e a F26 um segundo pico com partículas de 4657 nm com intensidade de 2,3%. Ainda em relação à distribuição de tamanho das partículas, ambas as formulações apresentaram elevado PdI, variando de 0,380 a 0,450. De acordo com Gaumet *et al.*, 2008, para uma partícula ser considerada como tendo uma boa distribuição, ela deve possuir um PdI menor que 0,1. Dessa forma pode-se considerar que tanto a formulação F25 como a F26 estavam longe do ideal, e altamente polidispersas (Tabela 2).

Entretanto, quando comparadas entre si, F25 apresentou menor tamanho médio e PdI em relação a F26. Baseado nisto, considerou-se que a formulação F25 teria um potencial maior para o seu estudo como um sistema de transporte e entrega de fármacos através das barreiras biológicas (Mitri *et al.*, 2011). Assim, a F25 foi selecionada e a razão dos tensoativos na formulação foi modificada objetivando melhorar todos os parâmetros da NLS.

Os resultados da modificação da razão de tensoativos de F25 estão representados na Tabela 3.

Tabela 3. Resultado da análise de tamanho médio e potencial zeta da NLS preparadas a partir da microemulsão: F25 (ácido esteárico: 40%; Tensoativos: 20%; Água 40%), modificando a proporção dos tensoativos na razão de 2:1 para 1:0, 1:1 e 1:2 (CTAB:monoleína). O tamanho médio representado é do pico de maior intensidade (Int.) da análise

Formulação	Razão CTAB:monol.	Tamanho médio	Int. (%)	PdI	Potencial zeta (mV)	Desvio de zeta (mV)
F25	1:0	602,2	45,88	0,684	62,20	11,27
F25	1:1	415,7	65,32	0,536	57,41	14,57
F25	1:2	251,6	92,66	0,393	67,29	11,53

Foi observado que quando não se adicionou CTAB à formulação ou mesmo quando se adicionou CTAB na mesma proporção da monoleína, houve uma piora significativa das características das partículas da formulação. No primeiro caso, na ausência de CTAB, a distribuição apresentou 3 picos com diferentes distribuições de tamanho médio: o de maior intensidade (Tabela 3) com 602 nm, outro de 168 nm com intensidade de 39% e outro de 4931 nm com 15% de intensidade. No segundo caso, quando se utilizou a mesma proporção de CTAB e monoleína na formulação, obteve-se 2 picos, um de 415 nm com 65% de intensidade e outro de 122 nm com intensidade de 35%. Além disso, ambas formulações apresentaram um aumento significativo de PdI.

Por outro lado, quando analisada a formulação na proporção de 1:2 (CTAB:monoleína) observou-se que apesar de não se ter conseguido melhorar o tamanho médio ou mesmo a PdI das NLS, estes valores mantiveram-se próximos aos resultados anteriormente obtidos com a NLS preparada a partir das microemulsão F25. Além disso, obteve-se um menor desvio do potencial zeta (Tabela 3). Estas características fizeram com que a formulação com a proporção de tensoativos na razão de 1:2 de CTAB:monoleína (F25-1:2) fosse selecionada e então filtrada para eliminar os agregados maiores e reduzir o PdI.

Os resultados demonstraram que com a filtração o tamanho médio foi reduzido de 265 ± 15 nm para 222 ± 14 nm, o PdI de $0,38 \pm 0,12$ para $0,29 \pm 0,02$ (Tabela 4) e o potencial zeta se manteve elevado, com 61 ± 7 . Este potencial zeta positivo, além de contribuir para a estabilização das partículas dispersas, pode também contribuir para um aumento da capacidade de permeação e “uptake” celular das NLS devido a interação das mesmas com as cargas negativas das membranas celulares (Verma; Stellaci, 2010). Ainda, o caráter positivo poderia contribuir até mesmo para o aumento da eficácia do sistema carreador de fármacos para o tratamento de câncer, já que o “uptake” das partículas seria aumentado devido à interação das mesmas com as células tumorais, de caráter ácido.

Tabela 4. Resultado da análise de Tamanho e Potencial Zeta das formulações: F25 1:2 (CTAB:Monoleína). Os valores entre parênteses representam o desvio padrão da amostragem em triplicata

Formulação	Tamanho médio	PdI
F25-1:2 Sem filtrar	264,66($\pm 15,49$)	0,38($\pm 0,12$)
F25-1:2 Filtrada	222,33($\pm 14,05$)	0,288($\pm 0,023$)

4.2. Nanopartículas Lipídicas Sólidas Contendo Doxorrubicina

4.2.1. Tamanho da Partícula e Potencial Zeta.

Os resultados da avaliação das NLS com DOX em relação ao tamanho médio e potencial zeta estão demonstrados na Tabela 5. A NLS apresentou alta estabilidade em relação às suas características físicas, mesmo quando submetida às maiores concentrações de DOX. Era de se esperar que caso houvesse aumento da concentração de DOX na superfície da partícula, o fármaco, por se tratar de uma molécula carregada positivamente em pH ácido (como o apresentado pela formulação, item 4.2.3.), alterasse a forma como os íons na formulação interagem com a NLS, e dessa forma alterasse o potencial zeta da partícula,

podendo levar a instabilidade e alterações de tamanho, o que de fato não ocorreu. Este resultado indica que a DOX de alguma forma não está presente ou não modifica a superfície da partícula, mesmo quando presente em altas concentrações.

Tabela 5. Resultado da análise de Tamanho e Potencial Zeta das NLS preparada a partir da microemulsão F25-1:2 (CTAB:monoleína) obtidas com diferentes concentrações iniciais de DOX. Os valores entre parênteses representam o desvio padrão da amostragem em triplicata. As concentrações de DOX em “%” representam a quantidade relativa de DOX em relação à quantidade de ácido esteárico na microemulsão.

Concentração de DOX (%)	Tamanho médio (nm)	PdI	Potencial Zeta (mV)	Desvio de Zeta (mV)
1%	240,00(±43,28)	0,368(±0,041)	64,17(±0,84)	12,94(±0,84)
2%	215,86(±20,87)	0,307(±0,063)	63,94(±2,58)	11,33(±0,87)
3%	248,96(±51,60)	0,318(±0,045)	61,93(±8,13)	11,2(±1,56)
4%	230,83(±21,26)	0,287(±0,109)	62,35(±0,77)	11,35(±0,92)

Para explicar a ausência de modificações significativas nas características da NLS após a adição de DOX, algumas hipóteses foram propostas:

- I. A DOX não estaria sendo incorporada à partícula e por isto não ocorreriam alterações das propriedades da partícula.
- II. A NLS estaria saturada com uma pequena quantidade de DOX, não sendo capaz de incorporar mais fármaco nas concentrações testadas.
- III. A DOX estaria de fato distribuída no interior da matriz lipídica e não apenas distribuída ao redor da superfície distribuída ao longo da mesma.
- IV. A DOX estaria em sua forma não ionizada na formulação, não possuindo carga, e desta forma influenciando menos fortemente no potencial zeta da NLS.

Os estudos de eficiência de encapsulação (item 4.2.2) indicam que as hipóteses I e II não são verdadeiras. Os estudos de microscopia confocal (item 4.6.3.) indicaram uma possível modificação no caráter hidrofílico da DOX após o processo de encapsulação. Parece que o processo de alguma forma neutraliza suas cargas positivas, possivelmente por formação de par iônico com o ácido esteárico. As hipóteses III e IV podem, portanto, ser verdadeiras. Isto é, a neutralização das cargas da DOX pode ter propiciado sua maior interação com a matriz lipídica e facilitado sua distribuição na NLS. Entretanto, são necessários mais estudos antes

que se possa confirmar com maior clareza a verdadeira razão pela qual a NLS não passa por modificações bruscas de suas características físico-químicas mesmo após a adição de diversas concentrações de DOX. Estudos futuros de Microscopia Eletrônica de Força Atômica, de Varredura e Transmissão poderão dar mais informações sobre a forma da NLS, composição e comportamento das partículas, ajudando a elucidar esta questão.

4.2.2. Eficiência de Encapsulação, Rendimento e Capacidade de Carga

Os resultados do rendimento do processo, assim como eficiência de encapsulação (EE) e capacidade de carga (CC) são mostrados na Tabela 6.

Tabela 6. Eficiência de Encapsulação (EE%), Rendimento, Perda e Capacidade de Carga (CC) da NLS preparada a partir da microemulsão F25-1:2 (CTAB:monoleína) obtidas com diferentes concentrações de DOX. As concentrações de DOX em “%” representam a quantidade relativa de DOX em relação à quantidade de ácido esteárico na microemulsão.

Conc. DOX (%)	EE (%)	Rendimento (%)	Perda (%)	CC (%)
1%	36,6	65,43	34,57	0,42
2%	48,13	76,01	23,99	0,8
3%	49,73	65,33	34,66	0,99
4%	45,61	74,18	25,82	1,36

Observou-se que com o aumento da concentração da DOX na formulação, ocorreu também um aumento da capacidade de incorporação do fármaco em relação à quantidade total de lipídios da formulação, sendo a formulação contendo 4% de DOX, a de maior CC. Este resultado indica que apesar do aumento da concentração do fármaco, não ocorreu, dentro das concentrações testadas, a saturação da capacidade de incorporação da DOX pela formulação. Caso fossem testadas formulações mais concentradas de DOX, possivelmente observaríamos um aumento da CC até a saturação da formulação ou até a desestabilização da mesma.

Além disso, a partir da formulação contendo 2% de DOX, a eficiência de encapsulação (EE) manteve-se muito próxima, com valores entre 45 e 50%. Entretanto deve-se ressaltar que apesar da EE (%) se manter próxima, o mesmo não ocorre com os valores absolutos de DOX encapsulada. Ou seja, a quantidade de DOX encapsulada na formulação de 4%, é maior que na de 3 e 2% simplesmente por ter sido adicionada maior quantidade de fármaco ao processo de produção da NLS. Sendo assim, é interessante o estudo da formulação

contendo 4% de DOX, por se tratar da formulação capaz de fornecer a maior quantidade possível de fármaco com a menor quantidade de formulação, mantendo ainda as características de tamanho e potencial zeta requeridas.

4.2.3. Determinação do pH

A partícula contendo 4% de DOX foi escolhida como modelo para estudos futuros. A medida de pH desta formulação indicou pH ácido de 2,8. Este resultado foi inesperado já que nenhum componente da partícula apresenta pKa ácido. Um total de 3 formulações diferentes foram desenvolvidas e analisadas quantos aos respectivos pHs (Tabela 7), de forma que fosse possível se investigar a razão pela qual o pH da formulação estaria baixo.

Primeiramente, baseado em estudos prévios realizados por nosso grupo de pesquisa, no qual NLS aniônicas produzidas contendo lecitina apresentaram pH na região de 5,5, foi realizada a substituição da monoleína na NLS por lecitina na mesma concentração (Taveira, 2009). Como se pode observar na Tabela 7, a NLS desenvolvida manteve seu pH ácido indicando que a monoleína não estaria envolvida no processo de acidificação da formulação. Após, foram produzidas uma solução de CTAB e uma emulsão de ácido esteárico e CTAB, ambas utilizando as mesmas concentrações de cada componente empregada nas NLS. A solução de CTAB apresentou um pH de 6,2 mas a emulsão apresentou o pH ácido (2,3) próximo ao exibido pelas NLS, indicando uma possível interação entre o CTAB e o ácido esteárico.

Tabela 7. Determinação do pH das formulações de NLS-Lecitina, Solução CTAB (3,33 mg/mL) e Emulsão (Ácido Esteárico +CTAB)

Formulação	pH
NLS-Lecitina	2,6
Solução CTAB (3,33 mg/mL)	6,2
Emulsão (Ácido Esteárico +CTAB)	2,3

Baseado nestes resultados, o presente estudo sugere que a diminuição do pH do sistema deve-se provavelmente à interação entre um hidrogênio do ácido esteárico com o contra íon brometo presente no CTAB (Figura 13), levando a formação de um ácido forte (ácido bromídrico (HBr)), responsável pelo decaimento do pH.

Figura 13. Interação molecular entre o ácido esteárico e CTAB levando a formação de ácido bromídrico (HBr).

Deve-se ressaltar aqui que nestas condições, a DOX adicionada na NLS (NLS-DOX 4%) apresenta-se ionizada positivamente ($pK_a=8,3$, Subedi *et al.*, 2009), sendo possível a formação de par iônico com o ácido esteárico carregado negativamente, mascarando assim sua carga elétrica e tornando-a mais lipofílica. Essa característica parece facilitar a incorporação e distribuição da DOX no sistema desenvolvido.

4.3. NLS produzidas por Homogeneização a Alta Pressão

O objetivo do estudo envolvendo o processo de homogeneização a alta pressão foi verificar a influência deste método quando aplicado sobre as NLS previamente produzidas pelo processo de microemulsão. Para isto, a NLS contendo 4% de DOX foi selecionada como modelo pelo fato de ter apresentado a maior quantidade de fármaco encapsulada e as características desejáveis para a aplicação tópica da formulação, como tamanho reduzido e potencial zeta positivo.

Os resultados indicam que com o processo de homogeneização ocorreu uma melhora da distribuição das partículas, observada pela diminuição do índice de polidispersão da mesma de $0,287 \pm 0,109$ para $0,218 \pm 0,003$ após a passagem pelo homogeneizador, sem haver necessidade de filtração. Além disso, a partícula manteve todas suas outras características mesmo após a passagem a alta pressão, como pode ser visto na Tabela 8. Por isto, para os estudos de permeação optou-se em utilizar as NLS homogeneizadas.

Tabela 8. Resultado da análise de Tamanho e Potencial Zeta das formulações: F25 1:2 (CTAB:Monoleína) contendo 4% DOX antes e após passagem pelo homogeneizador de alta pressão

NLS-DOX (4%)	Tamanho médio (nm)	PdI	Potencial Zeta (mV)	Desvio de Zeta (mV)
Sem Homogeneizar	230,83(±21,26)	0,287(±0,109)	62,35(±0,77)	11,35(±0,92)
Homogeneizada	253,15±(6,01)	0,218±(0,003)	59,45±(7,00)	10,9±(1,13)

4.4. Nanopartículas Fluorescentes

Para o desenvolvimento das NLS fluorescentes optou-se primeiramente pelo desenvolvimento de NLS sem fármaco. Com isto, objetivou-se determinar apenas a influência da adição de BODIPY FSE-8 dentro da NLS branca, de forma a se identificar possíveis instabilidades ou alterações no sistema de liberação. Como discutido anteriormente, devido às melhores características apresentadas pela formulação F-25 1:2 (CTAB:Monoleína), esta foi escolhida como modelo para os testes. Além disso, as formulações também foram submetidas à homogeneização a alta pressão, a fim de se evitar a necessidade de filtração e possível perda de material no filtro.

A Tabela 9 mostra que a adição de BOD às NLS não alterou suas características físico-químicas, mas foi capaz de tornar as NLS fluorescentes, como esperado (Figura 19, item 4.6.2.3.). Estes resultados, portanto, sugerem uma promissora capacidade da NLS desenvolvida a partir de monoleína de assimilar outros componentes, estejam eles ionizados como a DOX (em pH ácido), ou neutros como o BODIPY FSE-8, sem alteração significativa de seu tamanho e potencial zeta. Em uma continuação desse projeto, pretende-se realizar a adição de outros marcadores fluorescentes e outros fármacos modelos, incluindo moléculas de carga negativa, a estas NLS, além da avaliação da real capacidade de assimilação deste sistema de liberação frente a novas moléculas, assim como o motivo pelo qual a NLS poderia assimilar outros compostos sem a perda das suas propriedades. É possível que modificações conformacionais da monoleína capacitassem o sistema de liberação a incorporação de novas moléculas superior à normalmente encontrado pelas clássicas NLS de núcleo rígido e organizado, colocando o sistema de liberação desenvolvido dentro de uma nova classe de sistemas, entre as NLS e os CLN.

Tabela 9. Resultado da análise de Tamanho, PdI e Potencial Zeta das NLS fluorescentes, utilizando como marcador de fluorescência o BODIPY FSE-8. Valores utilizados entre parênteses representam o desvio padrão da amostragem em duplicata

Conc.	Tamanho	PdI	Potencial	Desvio de Zeta
BODIPY FSE-8	médio (nm)		Zeta (mV)	(mV)
76 µg/mL	194,65(±76,15)	0,294(±0,125)	63,0 (±10,04)	9,83(±0,11)

Após o desenvolvimento completo da formulação F-25 1:2 (CTAB:Monoleína) encapsulado com DOX ou BODIPY separadamente, determinou-se o efeito da adição de ambos componentes em um mesma formulação. Os resultados desta avaliação estão demonstrados na Tabela 10.

Para fins de comparação com a NLS contendo apenas DOX foi determinado o pH da formulação. Novamente não houve nenhuma alteração, tendo a NLS fluorescente contendo DOX e BODIPY apresentado pH ácido de 2,8.

Tabela 10. Resultado da análise de Tamanho e Potencial Zeta das NLS fluorescentes, utilizando como marcador de fluorescência o BODIPY FSE-8, na presença de DOX encapsulada. Valores utilizados entre parênteses representam o desvio padrão da amostragem em duplicata

Conc.	Tamanho	PdI	Potencial	Desvio de Zeta
BODIPY FSE-8/DOX	médio (nm)		Zeta (mV)	(mV)
76 µg/mL (BOD)	196,9(±39,73)	0,258(±0,023)	63,85(±12,37)	10,33(±1,79)
760 µg/mL (DOX)				

4.5. Estudos de liberação da DOX

Os estudos de liberação consistem em avaliar a forma pela qual o fármaco é liberado a partir do veículo (Jensen; Petersson; Nielsen, 2011). Desta forma, para verificar se as NLS sustentam a liberação da DOX foram realizados estudos de liberação, onde a formulação foi colocada em contato com uma membrana hidrofílica de acetato de celulose, com tamanho médio de 4 nm de poro com a função de suporte, separando a formulação do contato direto com o meio aquoso, ou seja, impedindo a passagem das NLS para o compartimento receptor,

permitindo a quantificação apenas da DOX liberada a partir das NLS. Inicialmente, o estudo de liberação foi realizado para a dispersão de NLS-DOX (Figura 14).

Figura 14. Estudos de liberação das NLS-DOX.

A figura demonstra que o perfil de liberação da DOX a partir das NLS se dá em maior grau nas primeiras 4 horas de experimento, sendo que o pico de liberação ocorre no tempo de 4 horas, com $5045,75(\pm 1670,12)$ ng/cm² de DOX liberada. Após este tempo, ocorre um decaimento expressivo da taxa de liberação do fármaco até 12 horas de experimento. Depois de 12 horas a liberação de DOX ainda ocorre, mas de forma mais lenta e estável.

No total, após 72 horas de experimento, cerca de 12,5 % da DOX, foi quantificada por CLAE no receptor. Isto indica que a DOX interage fortemente com o sistema nanoparticulado, havendo baixa liberação do fármaco ao longo do tempo. Esta forte retenção (interação) é de certa forma inesperada devido às características hidrofílicas da DOX e lipofílicas da NLS. Entretanto, sabe-se que a DOX interage fortemente com membranas lipídicas e com lipídeos aniônicos (Herai *et al.*, 2007). Desta forma, acredita-se que a DOX esteja de alguma forma interagindo com o ácido esteárico e desta forma restringindo a liberação do fármaco.

Ainda, a análise por CLAE do meio receptor a partir da liberação de DOX da NLS indicou a presença de um segundo pico, com tempo de retenção (*tr*) de 7,4 minutos, além do pico de detecção característico da DOX (*tr* = 4,3 min) (Figura 15) (Herai *et al.*, 2007, Taveira, 2009). Acredita-se que este segundo pico seja decorrente da interação da DOX com o ácido esteárico, formando um par iônico, sendo este permeado através da membrana em conjunto com a DOX livre. Como a interação da DOX com o lipídeo diminui a polaridade do fármaco, o par iônico demora mais a ser eluído da coluna cromatográfica (C 18), saindo em um tempo de retenção maior do que a DOX livre.

Figura 15. Cromatograma da solução receptora do estudo de liberação da DOX a partir das NLS-DOX (A) e de uma solução de DOX padrão (B).

A solução receptora dos experimentos de liberação também foi analisada por PCS com o intuito de verificar se as NLS estavam atravessando a membrana hidrofílica. Apesar de terem sido encontrados agregados na solução receptora (Figura 16), estes eram muito maiores do que o tamanho médio das NLS (tamanho médio dos agregados: ~ 1300 nm, PdI de 0,6). Isto sugere que lipídeos que fazem parte da composição das NLS (ácido esteárico e monoleína) podem mesmo estar difundindo pela membrana e formando agregados no receptor junto com a DOX. Desta forma, quando a solução receptora é analisada no CLAE, a DOX que está interagindo com esses lipídeos (que não absorvem em $\lambda = 560$ nm, usado para detecção da DOX por CLAE) aparece em tempo de retenção maior do que o da DOX livre.

Figura 16. Distribuição granulométrica do receptor nos experimentos de liberação após 2 horas de liberação da DOX a partir de uma dispersão de NLS-DOX.

4.6. Estudos de permeação cutânea passiva e iontoforética *in vitro*

4.6.1. Avaliação da integridade da pele após 1 h de contato com as NLS

Devido ao caráter ácido apresentado pelas NLS contendo DOX, na presença e na ausência de BODIPY FSE-8, foi necessária a verificação da resistência da pele frente às condições ácidas das formulações pelo tempo estipulado para os testes de permeação passiva e iontoforética. Para isto foi utilizada uma solução aquosa de CTAB na mesma concentração utilizada pelas NLS estudadas (3,33 mg/mL) acidificada até pH 2,8. Optou-se por não se utilizar os componentes lipídicos da NLS nesse experimento, pois os mesmos eram insolúveis em água e caso fossem dispersos na solução, poderiam sedimentar sobre a pele, mascarando o efeito da acidez da formulação no EC. Os resultados da resistividade (ρ) da pele após 0, 15, 30 e 60 minutos de contato com a formulação ácida estão mostrados na Tabela 11.

Tabela 11. Determinação da resistividade (ρ) de pele de suíno após aplicação de solução de CTAB ácida (3,33 mg/mL, pH 2,8) após tempo de permeação (t) de 0, 15, 30 e 60 minutos. O teste foi realizado com 10 amostras de pele (n=10)

Tempo de permeação (minutos)	ρ (k Ω .cm ²)									
	n.1	n.2	n.3	n.4	n=5	n.6	n.7	n.8	n.9	n.10
t=0	93,3	253,7	151,0	253,7	253,7	125,4	74,0	82,6	74,0	82,6
t=15	87,6	217,0	137,0	253,7	217,0	99,7	67,0	61,2	61,2	74,0
t=30	82,6	189,5	125,4	217,0	217,0	93,3	61,2	54,1	48,4	70,4
t=60	70,4	168,2	125,4	189,5	189,5	74,0	54,1	42,3	39,8	64,0

O teste *t* pareado entre as resistividades obtidas para cada amostra de pele demonstrou diferença significativa ($P < 0,05$) para o decaimento da resistividade entre o momento da adição da solução de CTAB ácido (3,33mg/mL, $t=0$) e após 60 minutos. Este decaimento indica que, de fato, a pele é afetada pela presença do meio ácido com CTAB, provavelmente devido à desestruturação parcial do EC. Entretanto, segundo Tang *et al.* (2001), a pele pode ser considerada adequada para análise experimental caso possua resistividade superior a 35 k Ω .cm². Nenhuma das peles testadas alcançou resistividade inferior a este valor mesmo após 1 hora de testes, podendo-se considerar que procedimentos experimentais envolvendo a formulação ácida de NLS (pH 2.8) por até 1 h, não serão comprometidos pela acidez do meio, podendo ser considerados seguros quanto a avaliação da influência do sistema de liberação em seus resultados.

4.6.2. Padronização dos parâmetros de análise para os estudos de MCVL

Para a escolha dos parâmetros a serem utilizados nas análises de NLS marcadas simultaneamente com DOX e BODIPY FSE-8, foram selecionados comprimentos de onda de excitação e filtros de captura de emissão dos compostos baseados na disponibilidade de lasers do equipamento (MCVL Leica TCS SP2) e na comparação dos espectros de emissão de cada molécula.

4.6.2.1. Espectro de emissão: Doxorrubicina

O espectro de emissão de fluorescência da DOX está representado na Figura 17. A DOX apresentou um amplo espectro de emissão de fluorescência, com pico máximo de emissão em 596 nm quando excitada a 537 nm. Entretanto ainda apresentou alta emissão de fluorescência em toda a região de 540 a 670 nm (Figura 17). Não foram analisados valores inferiores a 537 nm por serem inferiores à região de excitação utilizada para a molécula.

Figura 17. Espectro de emissão de fluorescência da Doxorubicina (solução aquosa) quando excitado a 537 nm.

4.6.2.2. Espectro de emissão: BODIPY FSE-8

O espectro de emissão de fluorescência do BODIPY FSE-8 está representado na Figura 18. O BODIPY FSE-8 apresentou um pico de emissão em 522 nm quando excitado a 512 nm. Esta proximidade entre excitação e emissão já era esperada por se tratar de uma característica comum entre os compostos derivados do BODIPY (Loudet; Burgess, 2007). Entretanto, o BODIPY FSE-8 ainda apresentou razoável emissão de fluorescência na região também emitida pela DOX, de 540 a 555 nm. Isto poderia indicar um problema nas análises de MCVL, por interferência de fluorescência entre ambos componentes, mas como demonstrado no item 4.7.2.3., este problema pôde ser contornado pela escolha adequada de filtros de emissão para a DOX.

Figura 18. Espectro de Emissão do BODIPY FSE-8 (Etanol:Água 1:1) quando excitado a 512 nm.

4.6.2.3. Validação dos parâmetros de análise – MCVL

Baseado nos espectros de emissão de cada componente e levando-se em consideração a disponibilidade dos lasers de excitação do MCVL (modelo Leica TCS SP2) utilizado neste trabalho, foi feita a análise sequencial de fluorescência, começando pela excitação do BODIPY FSE-8 (laser de 514 nm) e captação de sua fluorescência na região de 525 e 535 nm, seguida pela excitação da DOX (Laser 543nm) e detecção de fluorescência em 555-600nm. Feito isso, foram analisadas cortes verticais e horizontais de permeação da NLS contendo apenas DOX ou apenas BOD para se verificar se a metodologia conseguia de fato diferenciar os compostos.

Tanto os cortes transversais quanto os cortes horizontais (Figura 19, “a”) dos experimentos de permeação da NLS contendo BODIPY apresentaram alta fluorescência na pele na região de detecção do BODIPY (indicada em verde nas figuras). Houve, entretanto, um pequeno sinal de interferência no campo de detecção da DOX (indicada em vermelho), devido à região de emissão do BODIPY entre 540 e 555 nm, que cai em parte dentro da região de detecção da DOX no MCVL. Não foi possível remover esta interferência sem que houvesse prejuízos para a detecção da DOX como marcador de fluorescência, devido às características inerentes de emissão de fluorescência de ambos os compostos. Além disso, a

DOX apresenta intensidade de fluorescência muito menor que os corantes habituais utilizados neste tipo de teste, sendo difícil alcançar os sinais e o contraste adequados sem que ocorra o aparecimento de interferências decorrentes do aumento da sensibilidade do equipamento.

De qualquer forma, esta interferência não inviabilizou as análises. Como se pode observar na Figura 19, “b)”), quando aplicada as NLS contendo apenas DOX, o sinal vermelho é muito mais intenso, superando largamente a interferência causada pelo BODIPY FSE-8, permitindo assim, a fácil identificação do fármaco e consequente interpretação dos resultados. Além disso, não houve nenhum sinal de interferência da DOX da região de detecção do BODIPY FSE-8.

Figura 19. MCVL da pele de suíno (corte longitudinal) após 1 hora de permeação passiva com (a) NLS-BOD (metade à esquerda da figura) e (b) NLS-DOX (metade a direita da figura) sob aumento de 20x. As imagens na metade superior da figura apresentam a região de detecção do BODIPY FSE-8 (campo verde). As imagens na metade inferior da figura apresentam o campo de detecção da DOX (campo vermelho).

4.6.3. Mecanismo de Permeação *in vitro*

4.6.3.1. Permeação passiva

4.6.3.1.1. DOX e BODIPY FSE-8 em solução

Os estudos de permeação passiva com a DOX e BODIPY FSE-8 livres em solução aquosa acidificada (pH 2,8) foram realizados para que fosse possível se verificar a influência da encapsulação de ambos os componentes na NLS desenvolvida. Os resultados (Figura 20) indicaram que o BODIPY FSE-8 apresentou ampla distribuição por todo o EC, se acumulando especialmente nos sulcos da pele, onde é possível observar regiões mais intensas de fluorescência (Figura 20, setas vermelhas). Isto pode ser explicado pela característica lipofílica tanto do BODIPY FSE-8 quanto do EC, o que possibilita a dispersão do fluoróforo por toda a extensão da superfície da pele. A DOX por outro lado, ionizada no pH ácido da solução testada, apresentando característica mais hidrofílica e, como esperado, não se distribuiu uniformemente pelo EC, concentrando-se apenas nos sulcos mais amplos da pele (Figura 20, setas brancas).

Figura 20. MCVL da pele de suíno (corte longitudinal) após permeação por 1 hora com solução ácida (pH 2,8) de DOX e BODIPY FSE-8 livres, sob aumento de 20x. Da esquerda para a direita estão demonstrados: Campo verde (BODIPY FSE-8), Campo Claro e Campo Vermelho (DOX). Setas indicam regiões de fluorescência nos sulcos da pele.

Uma análise mais detalhada da permeação, sob aumento de 40x e em diferentes secções óticas, indicou a presença de fluorescência de BODIPY FSE-8 ao redor dos corneócitos (Figura 21, “a”) e “b”), círculos vermelhos). Esta fluorescência pode ser notada a

medida que aumentamos as secções óticas até 12 μm de profundidade. Após, pode-se observar apenas o acúmulo de BODIPY nos sulcos da pele por até 102 μm (Figura 21, “e”), flecha vermelha). A DOX, entretanto não apresentou sinais visíveis de fluorescência ao redor dos corneócitos, ficando restrita apenas nos sulcos da pele, perdendo a maior parte de seu sinal após 36 μm de profundidade (Figura 21, “c”).

Figura 21. MCVL de diferentes cortes óticos da análise de pele de suíno (corte longitudinal) após 1 h de permeação passiva de DOX e BODIPY FSE-8 livres, sob aumento de 40x. Da esquerda para a direita estão demonstrados: campo verde (BODIPY FSE-8), campo claro e

campo vermelho (DOX). Z = a) 0 μm ; b) 12 μm ; c) 36 μm ; d) 72 μm ; e) 102 μm). Escala de 50 μm

4.6.3.1.2. NLS encapsulada com DOX e BODIDY FSE-8

Após 1 hora de permeação passiva da formulação de NLS encapsulada tanto com DOX quanto com BOD foi observado um aumento da heterogeneidade na distribuição da fluorescência através da pele. As setas vermelhas (Figura 22) apontam regiões específicas de maior fluorescência no EC, sinais de permeação heterogênea dos fluoróforos. Além disso, é possível observar pontos intensos de fluorescência em aproximadamente 190 μm e 130 μm abaixo da superfície da pele (Figura 23), profundidade na qual podem ser encontrados alguns tumores cutâneos (Ericson *et al.*, 2008). Os sinais obtidos para a DOX nos cortes transversais é pouco intenso, entretanto isto pode ter sido ocasionado pela baixa espessura dos cortes (30 μm) aliado à baixa intensidade de fluorescência característica deste fármaco.

Figura 22. MCVL de pele de suíno (corte transversal) após permeação por 1 hora com NLS-DOX+BOD, sob aumento de 20x. Da esquerda para a direita estão demonstrados: Campo verde (BODIPY FSE-8), Campo Claro e Campo Vermelho (DOX). Setas indicam sinais intensos de fluorescência em contanto com o EC.

Figura 23. MCVL de pele de suíno (corte transversal) após permeação por 1 hora com NLS-DOX+BOD, sob aumento de 20x. Na imagem está representado apenas a fluorescência do BODIPY FSE-8 (Campo verde) para melhor visualização. Setas indicam a distância dos pontos intensos de fluorescência a partir da superfície da pele.

Os cortes longitudinais permitiram uma melhor identificação da distribuição tanto da DOX como do BODIPY FSE-8 através do tecido. Foi possível observar a presença de sinais de fluorescência de DOX (Figura 24, círculos brancos) e BODIPY FSE-8 (Figura 24, círculos vermelhos) entre os corneócitos. Estes sinais indicam que o encapsulamento favoreceu a distribuição do BODIPY (apolar) e da DOX (polar) na matriz lipídica da pele. Deve-se lembrar que a distribuição da fluorescência da DOX na pele foi muito menos intensa após a aplicação da solução ácida de DOX e BODIPY FSE-8 livres, reforçando a ideia de que a encapsulação é a responsável pela melhor interação da DOX com a superfície da pele.

Figura 24. Microscopia Confocal de Varredura a Laser de pele de suíno (corte longitudinal) após permeação por 1 hora com NLS-DOX+BOD, sob aumento de 20x. Da esquerda para a direita estão demonstrados: Campo verde (BODIPY FSE-8), Campo Claro e Campo Vermelho (DOX). Setas indicam sinais intensos e heterogêneos de fluorescência nos sulcos da pele. Círculos vermelhos indicam fluorescência de BODIPY em contato com os corneócitos e círculos brancos indicam fluorescência de DOX localizada próxima aos corneócitos.

De qualquer forma, assim como a solução ácida de BODIPY FSE-8 e DOX livres, ocorreu uma prevalência da fluorescência nos sulcos da pele. Entretanto, com o encapsulamento dos fluoróforos, foram observados aglomerados de fluorescência de DOX e BODIPY nestes sulcos (Figura 24, setas vermelhas), que não haviam sido observados anteriormente. Além disso, a fluorescência apresentada tanto no campo do BOD quanto no campo da DOX se sobrepõem perfeitamente sobre a pele em várias regiões da imagem (Figura 25). Esta justaposição pode indicar que ambos os compostos estão de fato localizados na mesma região sobre a pele. Considerando-se que a DOX e o BOD apresentam características de polaridade opostas, e por isto não se espera que estejam colocados, esta observação indica que a encapsulação levou à sobreposição de sinais. Sugere-se, portanto, que as NLS seriam as prováveis responsáveis por manter ambos compostos sobre a mesma região da pele ao manter os compostos encapsulados momentaneamente “presos”, até que possam ser liberados e permeados. Neste caso, as NLS poderiam servir como um reservatório do fármaco, liberando a DOX aos poucos na superfície cutânea.

Além disso, apesar de atualmente aceitar-se que as NLS apresentam a capacidade de formar de um filme oclusivo por toda a superfície da pele, levando ao aumento da hidratação do EC e consequente perda parcial de suas propriedades de barreira (Schafer-Korting; Mehnert; Korting, 2007; Pardeike; Hommos; Müller, 2009), não foi possível confirmar a

formação desse filme através da visualização da fluorescência dos cortes longitudinais com aumento de 20x (Figura 24) ou 40x (Figura 25).

Figura 25. MCVL de pele de suíno (corte longitudinal) após permeação por 1 hora com NLS-DOX+BOD, sob aumento de 40x. Da esquerda para a direita estão demonstrados: Campo verde (BODIPY FSE-8), Campo Vermelho (DOX), e a sobreposição das 2 imagens anteriores. Setas e círculos vermelhos apontam exemplos de regiões de aglomerados intensos de fluorescência de DOX e BODIPY FSE-8 claramente colocalizados.

Para verificar se a encapsulação estava facilitando a difusão da DOX para camadas mais profundas da pele, além do EC, novos testes de permeação foram então realizados. Nestes testes, após a permeação da formulação de NLS por 1 hora, o EC foi removido da pele por “tape stripping”, para que fosse possível uma melhor visualização da fluorescência na epiderme viável. Os resultados apontaram, entretanto, a quase completa ausência de sinais de fluorescência de ambos os fluoróforos, indicando que apesar da encapsulação, nem o BOD nem a DOX, foram capazes de permear através do EC em quantidade suficiente para a captação de fluorescência na epiderme viável, após uma hora de permeação passiva (Figura 26).

Figura 26. Microscopia Confocal de Varredura a Laser de pele de suíno (corte longitudinal) após permeação por 1 hora com NLS-DOX+BOD, seguida pela remoção do EC, sob aumento de (a) 20x e (b) 40x. Da esquerda para a direita estão demonstrados: Campo verde (BODIPY FSE-8), Campo Claro e Campo Vermelho (DOX).

4.6.3.2. Permeação Iontoforética

4.6.3.2.1. DOX e BODIPY FSE-8 em solução

Tanto a permeação iontoforética da solução ácida de DOX e BODIPY FSE-8 livre como de NLS contendo DOX e BODIPY FSE-8 apresentaram regiões de transporte localizados (RTL) visíveis macroscopicamente (Figura 27, “a”). Estas regiões também puderam ser visualizadas por MCVL, após busca ativa por essas regiões de interesse. Como observado na Figura 16, a região de transporte localizado (Figura 27, “b”) apresentou sinais de fluorescência de BODIPY FSE-8 e especialmente de DOX muito mais intensos do que outras regiões da mesma pele onde não foi detectado este transporte (Figura 27, “c”), sendo a fluorescência visualizada nestas últimas muito parecidas com as de transporte passivo da solução ácida de fluoróforos livres (Figura 20).

Observa-se também nas regiões de transporte localizado a existência de diversos pontos de intensa fluorescência ao longo de toda a superfície da pele (figura 27, “b”), círculos brancos e vermelhos). Além disso, a análise da superfície cutânea não apresentou os mesmos

sinais de forte fluorescência nos sulcos da pele encontrados na permeação passiva. Contudo, através de análise de secções óticas mais profundas da pele foi possível notar a presença da fluorescência nestes sulcos a partir de 12 μm (Figura 28, setas vermelhas e brancas).

Figura 27. a) Pele de suíno lavada, retirada da célula de “Franz” modificada, após permeação iontoforética. Setas indicam regiões de transporte localizado de DOX e BODIPY FSE-8; b) e c) MCVL da pele de suíno (corte longitudinal) após permeação iontoforética por 1 hora com solução ácida (pH 2,8) de DOX e BODIPY FSE-8 livres, sob aumento de 20x. Da esquerda para a direita estão demonstrados: Campo verde (BODIPY FSE-8), Campo Claro e Campo Vermelho (DOX). b) região de transporte localizado de permeação iontoforética; c) região sem detecção de transporte localizado de permeação iontoforética. Ambas as análises “b)” e “c)” foram realizadas na mesma amostra de pele. Círculos vermelhos e brancos representam pontos de intensa fluorescência

Figura 28. MCVL da pele de suíno (corte longitudinal) após permeação iontoforética por 1 hora com solução ácida (pH 2,8) de DOX e BODIPY FSE-8 livres, sob aumento de 40x. Da esquerda para a direita estão demonstrados: Campo verde (BODIPY FSE-8), Campo Claro e Campo Vermelho (DOX). Z = a) 0 μ M; b) 6 μ M; c) 12 μ M; d) 18 μ M. A escala é de 50 μ M

4.6.3.2.2. NLS encapsulada com DOX e BODIPY FSE-8

As análises da permeação iontoforética de NLS contendo DOX e BODIPY FSE-8 apresentou regiões de transporte localizado visíveis macroscopicamente (Figura 27, “a”), assim como a solução ácida de DOX e BODIPY FSE-8 livres. Essa região pôde ser visualizada nitidamente através da análise do corte transversal da pele de suíno após a permeação iontoforética (Figura 29, “a”) e “b”). Nesta imagem é possível visualizar uma região onde a fluorescência é muito maior que nas regiões adjacentes (Figura 29, “a”), círculo branco). Além disso, há um grande acúmulo de pontos intensos de fluorescência, em sua maioria colocalizados (Figura 29, “c”), logo abaixo de folículo piloso, o que pode ser indício de aglomerados de NLS nestas regiões (Figura 29, “b”), setas brancas e vermelhas). É possível que estas NLS tenham apresentado o transporte facilitado pelo folículo piloso, indicando o transporte via apêndices cutâneos como uma importante via de permeação das NLS quando sob influência da iontoforese. Além disso, é notável a quantidade de fluorescência observada nas camadas mais profundas da pele, sendo estas muito mais intensas que as obtidas pela permeação passiva de NLS.

Figura 29. MCVL de pele de suíno (corte transversal) após permeação por 1 hora com NLS-DOX+BOD, sob aumento de a) 20x, b) 40x e c) 40x. Em a) e b) Da esquerda para a direita estão demonstrados: Campo verde (BODIPY FSE-8), Campo Claro e Campo Vermelho (DOX). O círculo destaca a região de permeação localizada das regiões adjacentes. Setas indicam sinais intensos de fluorescência em contato com o EC. Em c) da esquerda para a direita estão demonstrados: Campo verde (BODIPY FSE-8), Campo Vermelho (DOX) e a sobreposição dos campos anteriores. É possível observar em c) a justaposição da fluorescência dos campos da DOX e do BOD.

A análise dos cortes longitudinais das amostras de pele de suíno após a permeação iontoforética de NLS fluorescentes apresentou novas informações a respeito de como a iontoforese afeta a permeação de fármacos nelas encapsulados. A Figura 30 evidencia o fato

que quando observada apenas a superfície cutânea, a distribuição da fluorescência não se apresenta junto aos sulcos da pele, da mesma forma que observado na permeação iontoforética da solução ácida dos fluoróforos livres. Entretanto, quando analisadas regiões mais profundas da pele (Figura 30, “c)”, “d)”, “e)”), pode-se notar a presença do acúmulo de fluorescência nestes sulcos, indicando que a iontoforese estaria “empurrando” os compostos para as camadas mais internas da pele. Além disso, nota-se que a fluorescência se apresenta na forma de pequenos “grânulos” de alta intensidade (Figura 30, “e)”, setas brancas e vermelhas), a partir de 66 μm (Figura 30, “c)”).

É interessante observar que estes grânulos de fluorescência, em boa parte colocalizados, foram encontrados apenas com a permeação passiva e iontoforética das NLS. Esta constatação reforça a ideia, previamente discutida (item 4.7.3.1.2.) de que as NLS estariam se acumulando nessas regiões, levando consigo os fluoróforos encapsulados..

Figura 30. MCVL de diferentes cortes óticos da análise de pele de suíno (corte longitudinal) após 1 h de permeação iontoforética de NLS –DOX+BOD sob aumento de 20x. Da esquerda para a direita estão demonstrados: Campo verde (BODIPY FSE-8), Campo Claro e Campo Vermelho (DOX). Z = a) 0 μm ; b) 31 μm ; c) 66 μm ; d) 105 μm ; e) 147 μm . A escala é de 100 μm .

Por fim, para visualizar se a iontoforese das NLS leva os fluoróforos para as camadas mais profundas da pele, um novo teste foi realizado, removendo o estrato córneo após os experimentos de permeação. Os resultados (Figura 31) apontaram que mesmo após a remoção do EC da pele permeada, foi possível identificar sinais de fluorescência relativa ao BOD (verde). Estes sinais, mesmo que mais fracos do que os observados no EC, indicam que apesar de grande parte do BOD ainda estar retido nas camadas mais superficiais da pele após 1 hora de permeação iontoforética, quantidade suficiente do mesmo foi capaz de permear a ponto de ser visualizado por MCVL na epiderme viável. É interessante lembrar que o mesmo resultado não foi observado nos experimentos de permeação passiva de NLS, indicando que a iontoforese foi capaz de forçar a passagem ao menos deste fluoróforo através da pele.

Figura 31. MCVL de pele de suíno (corte longitudinal) após permeação por 1 hora com NLS-DOX+BOD e posterior remoção do EC por “tape stripping”, sob aumento de a) 20x e b) 40x. Da esquerda para a direita estão demonstrados: Campo verde (BODIPY FSE-8), Campo Claro e Campo Vermelho (DOX).

Deve-se ressaltar, no entanto que apesar de não ter sido possível a identificação de sinais de fluorescência no campo vermelho, relativa a DOX, isto não necessariamente indica a ausência de DOX na epiderme viável. A DOX é naturalmente muito menos fluorescente do

que o BODIPY e levando em consideração que mesmo o BODIPY apresentou sinal mais fraco de fluorescência na epiderme viável, é natural que a DOX apresentasse um sinal ainda mais fraco, possivelmente imperceptível, visto a limitação da técnica utilizada. Quando a análise é direcionada para o folículo piloso (Figura 32), no entanto, verifica-se um aumento significativo da fluorescência do BOD e a detecção de um sinal fraco de fluorescência da DOX, exatamente na região central do folículo piloso. Este resultado reforça a ideia já discutida anteriormente de que a iontoforese aumenta a permeação dos fluoróforos pelos apêndices cutâneos, especialmente o folículo piloso.

Figura 32. MCVL de pele de suíno (corte longitudinal) após permeação por 1 hora com NLS-DOX+BOD e posterior remoção do EC por “tape stripping”, sob aumento de 40x. Em “a)” da esquerda para a direita estão demonstrados: Campo verde (BODIPY FSE-8), Campo Claro e Campo Vermelho (DOX). “b)” serve para uma melhor análise dos resultados e trata-se da mesma imagem “a)” com um aumento de 50 (em uma escala de 0 a 250) dos sinais verdes e vermelho que compõem a imagem; da esquerda para a direita estão demonstrados: Campo verde (BODIPY FSE-8) e Campo Vermelho (DOX).

Devido às limitações de sensibilidade das análises qualitativas no MCVL, experimentos de permeação passiva e iontoforética foram realizados para quantificar a DOX no EC, na epiderme viável e na solução receptora (através da pele), separadamente, após 1 h de experimento, como descrito nos próximos itens.

4.6.4. Estudos Quantitativos *in vitro*

As análises quantitativas foram realizadas de forma a se complementar as informações previamente obtidas por MCVL. Foram realizadas análises do EC, epiderme e derme (EP+D), e meio receptor composto por tampão HEPES (pH 7,4), após a permeação passiva e iontoforética da NLS-DOX e da solução ácida de DOX livre. Com o objetivo de se avaliar o mecanismo promotor de absorção da iontoforese no sistema proposto, foram avaliadas a iontoforese anódica (mecanismo proposto: eletromigração) e catódica (eletrosmose)

As análises da DOX nas diferentes camadas da pele estão apresentadas na Figura 33. Para a análise e discussão dos resultados foi realizada a análise estatística do tipo “one-way ANOVA” paramétrico seguido do teste de Turkey ($p < 0,05$) das diferentes formulações em cada camada da pele.

Figura 33. Análise quantitativa da DOX no estrato córneo (EC) e na epiderme e derme viável (EP+D) após a permeação passiva ou iontoforética (anódica ou catódica) da DOX livre em solução aquosa (pH 2,8) ou encapsulada em NLS.

Observando-se a Figura 33 é possível notar uma clara vantagem da NLS-DOX associada à iontoforese anódica como o sistema de maior capacidade promotora de absorção da DOX *in vitro*. A análise estatística da concentração de DOX tanto no EC quanto na EP+D

apontou que apenas a NLS-DOX associada à iontoforese anódica apresentou diferença significativa de permeação em relação a todos os outros sistemas promotores de absorção, sendo que estes não demonstraram diferença significativa entre si.

Vale ressaltar que a melhor capacidade promotora de absorção da iontoforese anódica em relação à catódica indica que dentro das condições analisadas, o mecanismo de eletromigração é o principal responsável pela permeação iontoforética da DOX nas NLS. Essa conclusão advém do fato de que dentro das condições das formulações testadas ($\text{pH} < 3$), a NLS e a pele (ponto isoeletrico 4-4,5) encontram-se temporariamente ionizadas positivamente (Kalia *et al.*, 2003). Nessa situação, a iontoforese anódica (eletrodo positivo em contato com a formulação) favorece a permeação do fármaco pelo processo de eletromigração (o eletrodo positivo repele a NLS positiva em direção à pele), mas é desfavorecida pelo processo eletrosmótico que se dá do eletrodo negativo (cátodo) para o positivo (ânodo), ou seja, em sentido contrário à permeação do fármaco. Por outro lado, a permeação catódica, na qual a formulação está em contato com o eletrodo negativo, utiliza-se do processo eletrosmótico para favorecer a permeação do fármaco. Desta forma, baseado nos resultados encontrados (iontoforese anódica > catódica), o fluxo eletromigratório é o principal mecanismo envolvido na permeação iontoforética da DOX a partir das NLS.

A Tabela 11 mostra a quantidade de DOX encontrada na solução receptora dos experimentos de permeação para cada amostra de pele estudada.

Tabela 12. Análise quantitativa da DOX na solução receptora após a permeação passiva ou iontoforética (anódica ou catódica) da DOX livre em solução aquosa ($\text{pH} 2,8$) ou encapsulada em NLS.

Formulação contendo DOX	DOX (ng/cm^2) encontrada na solução receptora de cada experimento					
	1	2	3	4	5	6
Solução Passiva	77,69	59,92	59,38	36,85	27,64	
Solução Iontoforeses anódica	44,72	40,86	3,23	20,6	0	0
Solução Iontoforeses catódica	651,46	74,46	36,92	389,68	178,19	109,96
NLS passiva	0	0	0	0	0	0
NLS iontoforeses anódica	0	0	0	1964,2	0	0
NLS iontoforeses catódica	0	0	0	0	0	0

Pode-se observar na Tabela 11 que dentre as formulações que continham as NLS, apenas um experimento resultou na quantificação de DOX na solução receptora. Já nos

experimentos com as soluções, a grande maioria das amostras possibilitou a quantificação da DOX, em maior ou menor grau. Devido a grande variação entre as amostras, não houve diferença significativa entre as concentrações de DOX encontradas na solução receptora dos experimentos realizados com as várias formulações. Isto provavelmente ocorreu devido à baixa concentração de fármaco permeada, ao grande volume de meio receptor utilizado e ao baixo tempo de permeação, o que levou a uma alta diluição do fármaco permeado, dificultado as análises por CLAE. Mas eles indicam claramente que as NLS aumentaram a penetração da DOX na pele e dificultaram sua difusão para a solução receptora, o que é interessante para um tratamento tópico, localizado.

4.7. Estudos de permeação cutânea passiva e iontoforética *in vivo*

4.7.1. Mecanismo de permeação *in vivo*

A análise por MCVL das amostras de pele e tumor obtidas da permeação *in vivo* da NLS-DOX+BOD e da solução ácida de DOX e BOD livres seguiu a mesma metodologia padronizada para as análises *in vitro*. Entretanto, para confirmar a ausência de sinais de autofluorescência do tumor e da pele de camundongo Nude Balb C que pudessem interferir nas leituras por MCVL, foi realizada a análise de um controle de pele e de tumor após a permeação com tampão Hepes isotônico (pH 7,4) por 30 minutos. Os resultados demonstraram que dentro das condições de análise (excitação do BODIPY FSE-8: laser de 514 nm e detecção na região de 525 a 535 nm; excitação da DOX: laser 543 nm e detecção na região de 555 a 600 nm) não houve nenhum sinal de interferência da pele ou do tumor nos campos de detecção da DOX ou do BOD (Figura 34).

Figura 34. MCVL de “a)” pele de camundongo Nude Balb C (corte longitudinal); “b)” carcinoma de células escamosas (A431) induzido em camundongo Nude Balb C; após permeação por 30 minutos com tampão Hepes (pH 7,4), sob aumento de 20x. Da esquerda para a direita estão demonstrados: Campo verde (BODIPY FSE-8), Campo Claro e Campo Vermelho (DOX).

Deve-se ressaltar que as análises *in vivo* tanto da pele quanto do tumor impuseram alguns desafios devido à origem do material testado. A pele, removida dos camundongos Nude Balb C, é consideravelmente mais flexível e frágil do que a pele de porco utilizada nas análises *in vitro*. Isto dificultou a obtenção de cortes transversais da pele e inviabilizou a análise por MCVL deste tipo de corte. O tumor, por outro lado, era muito espesso para que pudesse ser acomodado em uma lâmina de microscopia sem que fosse cortado, o que inviabilizou as análises longitudinais.

Além disso, o modelo de indução tumoral utilizado neste projeto refere-se ao modelo de carcinomas sólidos de câncer de pele de pescoço e cabeça, que aparecem abaixo da pele. Este tipo de tumor é o mais difícil de ser tratado, seja por quimioterapia sistêmica ou injeções intratumorais, devido às dificuldades do quimioterápico em penetrar as células tumorais e ser absorvido. A terapia tópica é sem dúvidas também um grande desafio. Para alcançar o tumor que se desenvolve abaixo da pele, o fármaco deve atravessar todas as camadas da pele, chegar ao tumor em altas concentrações e ainda difundir entre as células tumorais para ser absorvido.

Com base nos estudos *in vitro*, já se pode estimar que a quantidade de DOX que chega às camadas mais profundas da pele não é suficiente para ser detectada na MCVL. Além disso, como a penetração por iontoforese é heterogênea, a análise da fluorescência depende da região do tumor analisada, pois dentro do tempo de análise (30 minutos) a difusão dos marcadores de fluorescência pode não ser completa e igual por todo o tumor. Dessa forma, pode-se esperar que a região superior do tumor, mais próxima da pele, apresente maior concentração de fluoróforos que a região inferior, caso os marcadores consigam permear através da pele.

4.7.1.1. Permeação passiva - pele

4.7.1.1.1. DOX e BODIPY FSE-8 em solução

A análise do corte longitudinal da pele que recobre o tumor após a permeação *in vivo* passiva da solução acidificada de DOX e BOD livres está demonstrada na Figura 35. Pode-se notar que assim como observado nas análises *in vitro*, ocorre a prevalência de sinais intensos de fluorescência nos sulcos da pele. A perda da fluorescência nos sulcos se dá quase por completo a partir de 6 μm de profundidade para o BODIPY e 3 μm para a DOX, indicando, como esperado, retenção de altas concentrações dos fluoróforos nas camadas mais superficiais da pele, com acúmulo dos mesmos nos sulcos.

Figura 35. MCVL de pele de camundongo Nude Balb C (corte longitudinal) após permeação passiva por 30 minutos com solução ácida de DOX e BOD livres, sob aumento de 20x. Da esquerda para a direita estão demonstrados: Campo verde (BODIPY FSE-8), Campo Claro e Campo Vermelho (DOX). De cima para baixo, está representado o mesmo segmento da pele sob diferentes cortes óticos (0, 3, 6 e 11 μm)

Observa-se ainda na Figura 35, a presença de sinais de permeação circulares com cerca de 50 μm de diâmetro, que se repetem ao longo da pele. Essas regiões parecem ser cistos e utrículos dermais preenchidos com queratina (Massironi *et al.*, 2005). Em trabalho desenvolvido por Massironi *et al.* (2005) no departamento de patologia da USP, foi observado que a mutação genética que leva a queda do pelo nos camundongos tipo Nude Balb C estudados (tipo hr^{USP}) também gerava modificações no fenótipo da pele ao longo da vida do camundongo. A partir do 18º dia de vida dos camundongos sem pelo, a pele passava por um processo moderado de hiperqueratose, discreta invaginação da epiderme e formação de cistos e utrículos dermais restritos à camada superior da pele. Ainda, estes cistos e utrículos acabavam sendo preenchidos com lamelas de queratina, e alguns chegavam a apresentar restos de pelo. Além disso, foi comum a observação de glândulas sebáceas próximas aos cistos e utrículos dermais. Segundo os autores, essas modificações se agravavam ao longo da vida do camundongo, sendo que animais com 3 meses de vida, como os estudados por MCVL no presente estudo, chegavam a apresentar, além de cistos dermais aumentados e frequentes, folículos pilosos dilatados e em alguns casos atrofiados.

A ideia de que as estruturas encontradas na verdade se tratem das modificações descritas por Massironi *et al.* (2005) ajuda a explicar o porquê de essas regiões apresentarem uma prevalência do sinal de fluorescência do BOD (sinal verde) e não de DOX (sinal vermelho). Como se pode observar na Figura 35, algumas estruturas marcadas com sinais de fluorescência no campo verde (Figura 35, setas vermelhas), não apresentam sinais colocalizados, ou de intensidade semelhante no campo vermelho (Figura 35, setas brancas), mesmo no corte ótico de 0 μm . Isto pode ser consequência da maior interação de moléculas lipofílicas, como o BOD, com a queratina que estaria preenchendo os cistos dermais na pele.

4.7.1.1.2. NLS contendo DOX e BODIPY FSE-8

As Figuras 36 e 37 mostram a pele de camundongo Nude Balb C após a permeação *in vivo* passiva de NLS contendo DOX e BOD por 30 minutos. Pode-se observar na Figura 36 que a fluorescência apresenta-se preferencialmente nos sulcos da superfície da pele, mas encontra-se mais homogeneamente distribuída do que a observada na permeação de DOX e BOD não encapsulados, não apresentando grandes variações de intensidade das regiões coradas. Além disso, tanto a DOX quanto o BOD apresentaram sinais menos intensos de fluorescência do que os observados na permeação da solução ácida de fluoróforos livres, sendo que os sinais de DOX estão claramente mais fracos. Isto pode ter ocorrido devido à

distribuição mais homogênea dos fluoróforos na pele. Essa distribuição teria contribuído para que a “quantidade total” de fluoróforos na pele, ao se espalhar pela pele semelhantemente, não gerasse sinais nem tão intensos nem tão fracos quanto aos observados na permeação mais heterogênea da solução de DOX e BOD livres, distribuído ao longo de toda a pele.

Regiões circulares de permeação, muito semelhantes às observadas na permeação da solução de DOX e BOD livres foram novamente encontradas. É provável que se tratem das mesmas estruturas discutidas no item 4.8.1.1.1. Entretanto, é notável que os sinais fluorescentes exibidos neste caso, apresentam menor diâmetro e intensidade que o observado anteriormente. Isto possivelmente deve-se a uma menor interação dos fluoróforos com essas estruturas, provavelmente devido à influência da encapsulação dos mesmos nas NLS.

Figura 36. MCVL de pele de camundongo Nude Balb C (corte longitudinal) após permeação passiva por 30 minutos com NLS-DOX+BOD, sob aumento de 20x. Da esquerda para a direita estão demonstrados: Campo verde (BODIPY FSE-8), Campo Claro e Campo Vermelho (DOX).

É interessante observar também que na permeação passiva *in vivo* das NLS (sob aumento de 40x), ao contrário do que ocorreu nos estudos *in vitro*, foi observada a formação de uma espécie de “filme” fluorescente homogêneo de BOD ao longo de toda a pele (Figura 37 – 0 µm). Esse “filme” não está tão bem formado no campo vermelho da DOX quanto no do BOD, mas isso pode ser consequência da expulsão de parte da DOX da NLS em condições *in vivo*. É possível que o sistema nanoparticulado tenha sido parcialmente ou completamente desestabilizado ou fundido em contato com a pele dos camundongos testados, *in vivo*. Neste caso o sistema lipídico (apolar), íntegro ou não, distribuído sobre o EC (de caráter lipídico também) manteria a distribuição do BOD (apolar) mais homogênea que a de DOX (hidrofílica), por interações do tipo dipolo. Deve-se ressaltar que caso as partícula estejam

íntegras, esta constatação colaboraria a favor da teoria sobre a capacidade promotora de absorção das NLS, baseada na formação de um filme oclusivo e coeso sobre a pele (Schafer-Korting; Mehnert; Korting, 2007; Pardeike; Hommos; Müller, 2009). Vale lembrar que o delineamento do sistema nanoparticulado desenvolvido neste projeto levou em consideração esta teoria e a capacidade auto-organizacional da monoleína para delinear um sistema liberador de fármacos potencialmente mais eficaz.

Figura 37. MCVL de pele de camundongo Nude Balb C (corte longitudinal) após permeação passiva por 30 minutos com NLS-DOX+BOD, sob aumento de 40x. Da esquerda para a direita estão demonstrados: Campo verde (BODIPY FSE-8), Campo Claro e Campo Vermelho (DOX). De cima para baixo, está representado o mesmo segmento da pele sob diferentes cortes óticos: na coluna da esquerda (0, 1,5 e 3 μm) e na coluna da direita (6, 10,5 e 13 μm)

4.7.1.2. Permeação Iontoforética – pele

Tanto a permeação iontoforética da solução ácida de fluoróforos livres quanto a de NLS contendo DOX e BOD apresentaram regiões de transporte localizado (RTL) nos estudos *in vivo*. A Figura 38 é um exemplo típico das imagens de pele obtidas após a permeação iontoforética da solução de DOX e BOD livres por 30 minutos. A região destacada apresenta o local do tumor induzido (círculo branco) após o tratamento e a limpeza com água purificada em excesso. Podem-se notar regiões avermelhadas correspondentes às RTL e regiões não “marcadas” pela formulação correspondentes às “regiões de transporte não-localizado” (não-RTL). Tanto as RTL quanto as não-RTL puderam ser visualizadas através da busca ativa no MCVL e estão discutidas nos tópicos abaixo.

Figura 38. Camundongo Nude Balb C após a permeação iontoforética por 30 minutos, da solução ácida de DOX e BOD livres. O quadrado vermelho indica a região da permeação. O círculo branco apresenta a região tumoral. RTL = região de transporte localizado; não-RTL = região de transporte não localizado.

4.7.1.2.1. Iontoforese da DOX e BODIPY FSE-8 em solução

A análise da pele por MCVL após a permeação iontoforética da solução ácida de DOX e BOD livres está representada na Figura 39. Nesta figura podem ser visualizadas duas regiões diferentes de permeação na mesma pele, uma RTL (Figura 39, “a”) e uma não-RTL (Figura 39, “b”). Pode-se observar que a não-RTL apresenta um perfil de permeação muito próximo ao observado na permeação passiva da solução ácida de DOX e BOD livres. Nota-se a prevalência da fluorescência nos sulcos da pele e a existência de regiões de permeação circulares já discutidas anteriormente.

A imagem representativa da RTL (Figura 39, “a”) tem como principal objetivo demonstrar o aumento da permeação de fluoróforos gerado pela aplicação da iontoforese. É possível notar um claro aumento na intensidade da fluorescência tanto do BOD quanto da DOX nestas regiões, quando comparadas com as não-RTL ou com as permeações passivas. A intensidade da fluorescência é tão grande que é difícil definir estruturas na imagem e analisar

o mecanismo de permeação dos fluoróforos. Entretanto é possível observar que a fluorescência se mantém preferencialmente nos sulcos da pele, mas com sinais ao redor de alguns corneócitos, o que sugere a existência de permeação transcelular em algum grau.

Figura 39. MCVL de pele de camundongo Nude Balb C (corte longitudinal) após permeação iontoforética por 30 minutos com solução acida de DOX e BOD livres, sob aumento de 20x. Da esquerda para a direita estão demonstrados: Campo verde (BODIPY FSE-8), Campo Claro e Campo Vermelho (DOX). a) imagem representativa da RTL; b) imagem representativa da não-RTL

4.7.1.2.2. Iontoforese da NLS contendo DOX e BODIPY FSE-8

A análise da pele após a permeação iontoforética da NLS contendo DOX e BOD encapsulados está representada na Figura 40. Assim como na permeação iontoforética da solução de fluoróforos livres, é facilmente notável a diferença na intensidade de fluorescência nas RTL (Figura 40, “a”) em relação às não-RTL (figura 40, “b”), indicando um favorecimento à permeação nas RTL.

Observa-se que a não-RTL apresenta um perfil de permeação muito próximo ao observado na permeação passiva da NLS-DOX+BOD. É característica comum em ambas as permeações: a prevalência da fluorescência nos sulcos da pele, a existência de regiões de

permeação circulares distribuídas sobre a pele e a homogeneidade na distribuição da fluorescência tanto da DOX quanto do BOD.

A homogeneidade no padrão de distribuição da fluorescência também é notável no campo de detecção do BOD na RTL, onde apesar da intensa fluorescência, é possível notar que a mesma se distribui intensamente e igualmente por quase toda área de análise. Além disso, a DOX apresentou sinal mais intenso que o observado nas outras formulações.

Em relação à permeação dos fluoróforos nas RTL após a iontoforese *in vivo* da NLS-DOX+BOD, pode-se afirmar que alta concentração de fármaco e de BOD estão presentes nessas regiões após a iontoforese, mas é difícil definir ou especular qualquer mecanismo devido à intensidade dos sinais.

Figura 40. MCVL de pele de camundongo Nude Balb C (corte longitudinal) após permeação iontoforética por 30 minutos com NLS-DOX+BOD, sob aumento de 20x. Da esquerda para a direita estão demonstrados: Campo verde (BODIPY FSE-8), Campo Claro e Campo Vermelho (DOX). a) imagem representativa da RTL; b) imagem representativa da não-RTL

4.7.1.3. Análise tumoral por MCVL

As análises dos tumores após a permeação passiva ou iontoforética da NLS-DOX+BOD ou da solução dos fluoróforos livres estão representadas na Figura 41. Em geral não foram identificados sinais significativos de fluorescência nos tumores, mesmo após a permeação iontoforética. É possível notar, no entanto, um fraco sinal de fluorescência

distribuído por todo o tumor nos campos da DOX e BOD após a permeação passiva (Figura 41, “b”) e iontoforética (Figura 41, “c”) da NLS-DOX+BOD, além de algumas estruturas fluorescentes (campo verde) na forma de círculos na parte mais externa do corte transversal do tumor da permeação iontoforética NLS-DOX+BOD.

Figura 41. MCVL de pele de carcinoma de células escamosas (A439) (corte transversal) após permeação *in vivo* em camundongo Nude Balb C, por 30 minutos sob aumento de 20x. a) permeação passiva de solução ácida de DOX e BOD livres; b) permeação passiva de NLS-DOX+BOD; c) permeação iontoforética de solução ácida de DOX e BOD livres; d) permeação iontoforética de NLS-DOX+BOD. Da esquerda para a direita estão demonstrados: Campo verde (BODIPY FSE-8), Campo Claro e Campo Vermelho (DOX).

Os resultados da MCVL sugerem que houve uma maior capacidade de permeação dos fluoróforos a partir das NLS do que da solução. Entretanto, estes resultados devem ser analisados com cuidado devido à limitação da técnica utilizada. Como já discutido anteriormente, não foi possível a análise do tumor sem que o mesmo fosse cortado. No caso específico dos tumores removidos após a permeação *in vivo*, o congelamento dos mesmos em meio “tissue tek[®]” e posterior corte em criostato para o preparo das lâminas levava a uma perda da orientação dos materiais em relação a sua posição original, abaixo da pele do camundongo, durante a permeação dos fluoróforos. Levando em consideração o tempo de permeação de 30 minutos nos estudos de MCVL, é possível que algumas regiões dos tumores não tenham sido suficientemente permeadas pelos fluoróforos a ponto de apresentarem sinais detectáveis no MCVL. Desta forma, a variação de fluorescência entre as análises tumorais pode ser decorrente da região do tumor analisada e não da permeação utilizada.

Desta forma foram realizadas análises quantitativas da DOX no tumor e na pele, a fim de se definir mais facilmente a capacidade de permeação dos sistemas utilizados.

4.7.2. Estudos quantitativos

A Figura 42 mostra a quantidade de DOX recuperada da pele, do tumor e do plasma após 1 h de permeação passiva e iontoforética da solução ácida de DOX e da NLS contendo DOX.

Figura 42. Análise quantitativa em quintuplicata da DOX na pele, tumor e plasma sanguíneo após a permeação passiva ou iontoforética (anódica ou catódica) da DOX livre em solução aquosa (pH 2,8) ou encapsulada em NLS.

Os dados representados na Figura 42 são os resultados na íntegra das avaliações em quintuplicata de cada formulação para facilitar a discussão dos mesmos. Optou-se por apresentar os dados dessa forma, e não em função da média e desvio padrão, devido a alta variabilidade amostral, comum em experimentos *in vivo*, que poderia levar a interpretação errônea dos resultados.

A análise da permeação e quantificação da DOX na pele (Figura 42, “a”) indicou que a NLS-DOX associada à iontoforese anódica foi a formulação que mais aumentou a penetração da DOX. A análise estatística tipo “one-way ANOVA” seguido da análise de Tukey ($p < 0,05$) indicou diferença significativa apenas da formulação de NLS-DOX associada à iontoforese anódica em relação às outras formulações, sendo que estas não apresentaram variação significativa entre si. Este resultado confirma os anteriormente observados tanto para

a MCVL *in vivo* e *in vitro*, nos quais os sinais mais intensos de fluorescência da DOX estavam relacionados ao sistema nanoparticulado associado à iontoforese, quanto à quantificação *in vitro*, que também apontou diferença significativa na capacidade promotora de absorção da formulação contendo DOX nanoencapsulada.

A análise estatística tipo “one-way ANOVA” seguido da análise de Tukey ($p < 0,05$) da DOX presente no tumor (Figura 42, “b”) e no plasma (Figura 42, “c”) não apresentou diferença estatística significativa entre as formulações testadas. Isso provavelmente ocorreu devido a grande variabilidade amostral encontrada, sendo que um n maior de animais seria necessário para a confirmação do resultado. Entretanto é possível observar que 3 dos animais testados com a NLS-DOX associada a iontoforese ($n = 1, 2$ e 4), apresentaram concentrações de DOX no tumor muito elevadas, sendo que dois destes ($n=1$ e 2) demonstraram concentrações 3 a 4 vezes superiores que as maiores concentração observadas nas outras formulações de NLS (permeação passiva) e solução ácida de DOX livre (permeação iontoforética).

5. CONCLUSÃO

Neste projeto foram desenvolvidos estudos *in vitro* e *in vivo* para se verificar a influência da iontoforese e da encapsulação da DOX em NLS na permeação do fármaco através da pele.

Os estudos demonstraram que foi possível desenvolver NLS (contendo monoleína em sua composição), adequadas para tratamento tópico cutâneo, a partir do método de microemulsão associado à homogeneização de alta pressão. As NLS apresentaram tamanho médio na faixa de 200 nm, potencial zeta por volta de 60 a 70 mV e PDI próximo à 0,2 e pH ácido. Foi possível, ainda, encapsular DOX nas NLS com uma taxa de eficiência de encapsulação de 50%. Os estudos de integridade da pele frente ao pH ácido, indicaram que a acidez não levou a modificações do EC que inviabilizassem os estudos, dentro das condições testadas (1 hora de permeação passiva ou iontoforética). Além disso, a fim de se considerar o efeito da acidez na interpretação dos resultados, os estudos de encapsulação em NLS e de iontoforese, foram realizados tendo como padrão de comparação, uma solução aquosa, contendo os principais componentes do sistema nanoparticulado, acidificada até o pH 2,8.

Os estudos de permeação passiva e iontoforética das NLS fluorescentes indicaram que tanto a aplicação da NLS, quanto da iontoforese, levaram a uma melhora no perfil de distribuição e permeação da DOX na pele. Esse efeito pôde ser percebido tanto com a

aplicação isolada quanto conjunta de cada técnica, mas foi consideravelmente maior com a associação das mesmas, indicando um efeito sinérgico entre elas.

Tanto os experimentos *in vitro*, quanto *in vivo*, demonstraram que a administração da DOX nas NLS aumentou a homogeneidade de distribuição do fármaco na superfície da pele. Além disso, ocorreram modificações na distribuição da DOX nas camadas mais profundas da pele, que apontaram a presença de aglomerados de fluorescência de DOX e BOD, colocalizados. Essas regiões indicam que a encapsulação favorece o acúmulo da DOX (a partir de NLS) em regiões mais profundas da pele, levando possivelmente a uma liberação sustentada do fármaco por um maior período de tempo.

A aplicação da iontoforese também afetou a distribuição do fármaco, levando a regiões de transporte localizadas na superfície da pele, com grande acúmulo de DOX nessas regiões. Aparentemente, a iontoforese aumentou a permeação da DOX nessas regiões, principalmente por favorecer a entrada do fármaco pelos apêndices cutâneos (folículos pilosos), apesar de algum grau de permeação transcelular ter sido observado na iontoforese das NLS. Foi observado ainda que o principal mecanismo promotor de absorção da iontoforese, quando a mesma é aplicada com as NLS positivas ou com a DOX ionizada na solução ácida, é a eletromigração. Além disso, as regiões de transporte não-localizado observadas após administração da solução de DOX e BOD e da NLS, também apresentaram sinais de fluorescência, mas com um perfil de distribuição e intensidade muito semelhantes aos seus correspondentes na permeação passiva. As análises quantitativas tanto *in vitro*, quanto *in vivo*, indicaram que apesar da DOX ter apresentado algum nível de permeação no EC e epiderme viável em todas as formulações testadas, a permeação iontoforética das NLS foi capaz de aumentar significativamente a permeação do fármaco até as camadas mais profundas da pele. Este resultado reforça a ideia de que a associação da NLS e da iontoforese apresenta efeito “sinérgico” e benéfico, em relação a aplicação isolado de cada técnica.

Por fim, pode-se concluir que o sistema desenvolvido neste projeto, aliando a encapsulação da DOX em NLS e a aplicação da iontoforese, apresentou resultados promissores como um futuro tratamento tópico para o câncer de pele. Foi possível aumentar significativamente a distribuição do fármaco nas diferentes camadas da pele, sem que o mesmo atingisse a corrente sanguínea. Isto aumenta a possibilidade de sucesso do tratamento tópico, ao mesmo tempo em que reduz os efeitos adversos sistêmicos graves da quimioterapia com a DOX.

6. PERSPECTIVAS FUTURAS

Como experimentos futuros, se propõe o teste do sistema desenvolvido neste projeto em outros modelos tumorais de câncer de pele e avaliação da eficácia do tratamento *in vivo* comparando o modelo de tumores sólidos, com outros modelos, a fim de se verificar o melhor tipo de tratamento para cada forma de tumor.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVAREZ-CEDRÓN, L.; SAYALERO, M.L.; LANA O, J.M. High-performance liquid chromatographic validated assay of doxorubicin in rat plasma and tissues **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v.22; p.271-278, 1999.

ALVAREZ-ROMÁN, R.; NAIK, A.; KALIA, Y.N.; FESSI, H.; GUY, R.H. Enhanced dermal delivery from poly(1-caprolactone) nanospheres: an evaluation by confocal laser scanning microscopy, **AAPS**, 2002.

ALVAREZ-ROMÁN, R.; MERINO, G.; KALIA, Y.N.; GUY, R.H. Skin permeability enhancement by low frequency sonophoresis: lipid extraction and transport pathways. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.92, p.1138–1146, 2003.

ALVAREZ-ROMÁN, R.; NAIK, A.; KALIA, Y.N.; GUY, R.H.; FESSI, H. Enhancement to topical delivery from biodegradable nanoparticle, **Pharmaceutical Research**, v.10, p.1818-1825, 2004.

ALVAREZ-ROMÁN, R.; NAIK, A.; KALIA, Y.N.; FESSI, H.; GUY, R.H. Visualization of skin penetration using confocal laser scanning microscopy. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.58, p.301-316, 2004.

AQUILANO, D.; CAVALLI, R.; GASCO, M.R. Solid lipospheres obtained from hot microemulsions in the presence of different concentrations of cosurfactant: the crystallization of stearic acid polymorphs. **Thermochimica Acta**, v.230, p.29-37, 1993

ARCAMONE, F.; FRANCESCHI, G.; PENCO, S.; SELVA, A. Adriamycin (14-hydroxydaunomycin), a novel antitumor antibiotic. **Tetrahedron Letters**, v.13, p.1007-1010, 1969.

ARNOLD, R. D.; SLACK, J. E.; STRAUBINGER, R. M. Quantification of Doxorubicin and metabolites in rat plasma and small volume tissue samples by liquid chromatography/electrospray tandem mass spectroscopy. **Journal of Chromatography B. Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v.808, n.2, p.141-152, 2004.

BANDAK, S.; RAMU, A.; BARENHOLZ, Y.; GABIZON, A. Reduced UV-induced degradation of doxorubicin encapsulated in polyethyleneglycol-coated liposomes. **Pharmaceutical Research**, v.16, n.6, p.841-846, 1999.

BERNARDI, S, D. **Desenvolvimento de nanoemulsão de óleo de arroz como adjuvante no tratamento de dermatite atópica e psoríase**. Ribeirão Preto, 131p. **Dissertação** (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. 2011.

BRIGGS, J.; CAFFREY, M. The Temperature-Composition Phase Diagram and Mesophase Structure Characterization of Monopentadecenoin in Water. **Biophysical Journal**. V. 67, p.1594-1602, 1994

CARMICHAEL, A. J.; RIESZ, P. Photoinduced reactions of anthraquinone antitumor agents with peptides and nucleic acid bases: an electron spin resonance and spin trapping study. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.237, n.2, p.433-444, 1985.

CULLANDER, C.; GUY, R.H. Visualization of iontophoretic pathway with confocal microscopy and the vibrating probe electrode. **Solid State Ionics** v. 53–56, p.197–206, 1992.

DILKES MG, DEJODE ML, ROWNTREE-TAYLOR A.; MCGILLIGAN, J. A.; KENYON, G. S.; MCKELVIE, P. m-THPC photodynamic therapy for head and neck cancer. **Lasers in Medical Science**, v.11, p.23–29, 1996.

DOLMANS, D.E.J.G.J.; FUKUMURA, D.; JAIN, R.K. Photodynamic therapy for cancer. Nature Publishing Group, v.3, p.380-387, 2003

ERICSON, M. B.; SIMONSSON, C.; GULDBRAND, S.; LJUNGBLAD, C.; PAOLI, J.; SMEDH, M. Two-photon laser-scanning fluorescence microscopy applied for studies of human skin. **Journal of Biophotonics**, v.1, p.320–330, 2008.

ERMERTCAN, A.T.; HELLINGS, P.W.; CINGI, C. Nonmelanoma Skin Cancer of the Head and Neck Nonsurgical Treatment. *Facial Plastic Surgery Clinics of North America*, v.20, p.445–454, 2012.

FRITSCH, C.; GOERZ, G.; RUZICKA, T. Photodynamic therapy in dermatology. **Archives of Dermatology**, v.134, p.207–214, 1998.

GAUMET, M.; VARGAS, A.; GURNY, R.; DELIE, F. Nanoparticles for drug delivery: The need for precision in reporting particle size parameters. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. V. 69, p.1–9, 2008

GLIKFELD, P.; CULLANDER, C.; HINZ, R. S.; GUY, R. H. A new system for *in vitro* studies of iontophoresis. **Pharmaceutical Research**, v.5, n.7, p.443-446, 1988.

GRATIERI, T.; GELFUSO, G.M.; , LOPEZ, R.F.V. Basic principles and applications of iontophoresis for cutaneous application of drugs. **Quimica Nova**, v.31, p.1490-1498, 2008.

HERAI, H.; GRATIERI, T.; THOMAZINI, J.A.; BENTLEY, M.V.L.B.; LOPEZ, R.F.V. Doxorubicin skin penetration from monoolein-containing propylene glycol formulations. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 329, p. 88 – 93, 2007.

ISRAEL, V. P.; GARCIA, A. A.; ROMAN, L.; MUDERSPACH, L.; BURNETT, A.; JEFFERS, S.; MUGGIA, F. M. Phase II study of liposomal doxorubicin in advanced gynecologic cancers. **Gynecologic Oncology**, v.78, n.2, p.143-147, 2000.

JENSEN, L.B.; PETERSSON, K.; NIELSEN, H.M. *In vitro* penetration properties of solid lipid nanoparticles in intact and barrier-impaired skin. **Pharmaceuticals and Biopharmaceutics**. v.79, p.68-75, 2011

KALIA, Y.N.; NAIK, A.; GARRISON, J.; GUY, R. H. Iontophoretic drug delivery. . **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.56, p.619-658, 2004.

KALKA, K.; MERK, H.; MUKHTAR, H. Photodynamic therapy in dermatology. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v.42, p.389–413, 2000.

KASTING G, B.; BOWMAN, L, A. DC electrical properties of frozen, excised human skin. **Pharmaceutical Research** v.7, p.134-143, 1990

KULKARNI, C.V.; WACHTER, W.; IGLESIAS-SALTO, G.; ENGELSKIRCHEN, S.; AHUALLI, S. Monoolein: a magic lipid?. **Physical Chemistry Chemical Physics**. V. 13, p.3004–3021, 2011

LO, I.; FLORENCE, A.T.; TREGUIER, J.P.; SEILLER, M.; PUISIEUX, F. The influence of surfactant HLB and the nature of the oil phase on the diagrams of nonionic surfactant-oil-water systems. **Journal Colloid and Interface Science**. V. 59, p.319-327, 1977

LOPEZ, R. F. V. Estudo de um sistema de liberação para o ácido 5-aminolevulínico por iontoforese para aplicação na terapia fotodinâmica de câncer de pele. Ribeirão Preto: Dissertação (Doutorado) Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, 2000

LOPEZ, R.F.V.; SETO, J. E.; BLANKSCHTEIN, D.; LANGER, R. Enhancing the transdermal delivery of rigid nanoparticles using the simultaneous application of ultrasound and sodium lauryl sulfate. **Biomaterials**, v. 32, p. 933-941, 2011.

LOUDET, A.; BURGESS, K. BODIPY Dyes and Their Derivatives: Syntheses and Spectroscopic Properties. **Chemical Reviews**, v.107, p.4891–4932, 2007

MANDAWGADE, S. D.; PATRAVALE, V. B. Development of SLNs from natural lipids: application to topical delivery of tretinoin. **International Journal of Pharmaceutics**, v.363, n.1-2, p.132-138,2008.

MARRO, D.; KALIA, Y. N.; DELGADO-CHARRO, M. B.; GUY, R. H. Contributions of electromigration and electroosmosis to iontophoretic drug delivery. **Pharmaceutical Research**, v.18, p.1701-1708, 2001.

MASSIRONI, S.M.; GIACÓIA, M.R.; MAIORKA, P.C.; KIPNIS, T.L.; DAGLI, M.L. Skin morphology of the mutant hairless USP mouse. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v.38, p.33-39, 2005

MARQUELE-OLIVEIRA, F.; SANTANA, D. C.; TAVEIRA S. F.; VERMEULEN D. M.; DE OLIVEIRA, A.R.; DA SILVA R.S.; LOPEZ, R. F. Development of nitrosyl ruthenium complex-loaded lipid carriers for topical administration: improvement in skin stability and in nitric oxide release by visible light irradiation. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 53, p. 843-851, 2010.

MEHNERT, W.; MÄDER, K. Solid lipid nanoparticles Production, characterization and applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, V 47, p.165–196, 2001.

MERINO, V.; KALIA, Y.N.; GUY, R. H. Transdermal therapy and diagnosis by iontophoresis. **Trends in Biotechnology**, v.15, p.288-290, 1997 .

MINISTÉRIO DA SAÚDE/SAS/INCA/COMPREV. **Estimativas 2012. Incidência de Câncer no Brasil**. INCA: Rio de Janeiro,2009

MITRI K.; SHEGOKAR, R.; GOHLA, S.; ANSELM, C.; MÜLLER, R.H. Lipid nanocarriers for dermal delivery of lutein: Preparation, Characterization, Stability and Performance. **International Journal of Pharmaceutics**. V. 414, p.267-275, 2011

MÜHLEN, A.; SCHWARZ, C.; MEHNERT, W. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery - Drug release and release mechanism. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. v. 45, p. 149–155, 1998

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**. v. 50, p.161-177, 2000

PANCHAGNULA, R.; PILLAI, O.; NAIR, V. B.; RAMARAO, P. Transdermal iontophoresis revisited. **Current Opinion in Chemical Biology**, v.4, p.468-473, 2000.

PARDEIKE, J.; HOMMOSS, A.; MÜLLER, R. H. Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 366 p.170–184, 2009.

SANDRI, G.; BONFERONI¹, M, C.; GÖKÇE, E, H.; FERRARI, F.; ROSSI, S.; PATRINI, M.; CARAMELLA, C. Chitosan-associated SLN: *in vitro* and *ex vivo* characterization of cyclosporine A loaded ophthalmic systems. **Journal of Microencapsulation**, v.27(8), p.735–746, 2010.

SAUNDERS, J.; DAVIS, H.; COETZEE, L.; BOTHA, S.; KRUGER, A.; GROBLER, A. A novel skin penetration enhancer: evaluation by membrane diffusion and confocal microscopy, **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.2, p.99–107, 1999.

SCHÄFER-KORTING, M.; MEHNERT, W.; KORTING, H. Lipid nanoparticles for improved topical application of drugs for skin diseases. **Advanced Drug Delivery Reviews** v.59, p.427 – 443, 2007.

SHAH, J.C.; SADHALE, Y.; CHILUKURI, D.M. Cubic phase gels as drug delivery systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**. V. 47, p. 229–250, 2001

SOLER, A.M.; WARLOE, T.; BERNER, A.; GIERCKSKY, K.E. A follow up study of recurrence and cosmesis in completely responding superficial and nodular basal cell carcinomas treated with methyl 5-aminolevulinate-based photodynamic therapy alone and with prior curettage. **British Journal of Dermatology**, v.145, p.467–471, 2001.

SOUZA, J. G. Iontoforese *in vitro* e *in vivo* de uma ftalocianina de zinco aniônica em tecidos saudáveis e tumores induzidos para a terapia fotodinâmica de tumores cutâneos. 2010. Tese (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

SUBEDI, R.K.; KANG, K.W.; CHOI, H.K. Preparation and characterization of solid lipid nanoparticles loaded with Doxorubicin. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 37, p. 508-513, 2009.

TANG, H.; MITRAGOTRI, S.; BLANKSCHTEIN, D.; LANGER, R. Theoretical Description of Transdermal Transport of Hydrophilic Permeants: Application to Low-Frequency Sonophoresis. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.90, n.5, p. 531–666, 2001

TAVEIRA, S.F.; NOMIZO, A.; LOPEZ, R.F. Effect of the iontophoresis of a chitosan gel on doxorubicin skin penetration and cytotoxicity. **Journal of Controlled Release**, v. 134, p.35-40, 2008

TAVEIRA, S. F. **Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLS) como carreadores de fármacos para o tratamento tópico de câncer de pele**. Ribeirão Preto, Dissertação (Doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2009

TEWEY, K. M.; ROWE, T. C.; YANG, L.; HALLIGAN, B. D.; LIU, L. F. Adriamycin-induced DNA damage mediated by mammalian DNA topoisomerase II. **Science**, v.226, n.4673, p.466-468, 1984.

TOPE, W.D.; BHARDWAJ, S.S. Photodynamic therapy. Bologna JL, Jorizzo JL, Papini RP, editors. **Dermatology**. 2nd edition. St. Louis: Elsevier Ltd; p. 2071–87, 2008.

TREGUIER, J.P.; LO, I.; SEILLER, M.; PUISIEUX, F. Emulsions and water-surfactant-oil diagrams. A system of water-Brij 92 and 96-oil of Vaseline. Effect of surfactant hydrophilicity. **Pharmaceutica Acta Helvetiae**. V. 50, p. 421-431, 1975

TURNER, N.G.; GUY, R.H. Iontophoretic transport pathways: dependence on penetrant physicochemical properties. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.86, p.1385–1389, 1997.

ULRICH, G.; ZIESSEL, R.; HARRIMAN, A. The chemistry of fluorescent bodipy dyes: versatility unsurpassed. **Angewandte Chemie International Edition**, Inglaterra, v.47, p.1184-1201, 2008

VERMA, A.; STELLACI, F. Effect of Surface Properties on Nanoparticle–Cell Interactions. **Small** v. 6, p.12–21, 2010

VERMA, D.D.; VERMA, S.; BLUME, G.; FAHR, A. Particle size of liposomes influences dermal delivery of substances into skin. **International Journal of Pharmaceutics**, v.258, p. 141–151, 2003.

VIGHI, E.; MONTANARI, M.; RUOZI, B.; TOSI, G.; MAGLI, A.; LEO, E. Nuclear localization of cationic solid lipid nanoparticles containing Protamine as transfection promoter. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 76, p.384–393, 2010.

WISSING, S. A.; MULLER, R. H. Cosmetic applications for solid lipid nanoparticles (SLN). **International Journal of Pharmaceutics**, v.254, n.1, p.65-68, 2003.

WISSING, S. A.; KAYSER, O.; MULLER, R. H. Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.56, n.9, p.1257-1272, 2004.

ANEXO

1. Certificado: Comissão de Ética no Uso de Animais

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

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho (Protocolo nº 11.1.1579.53.6), intitulado: "Influência da Iontoforese na Penetração de Nanopartículas Lipídicas Sólidas em Tumores Cutâneos", de autoria de **Renata Fonseca Vianna Lopez**, por estar de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotado pela **Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)** do *Campus* de Ribeirão Preto – USP foi aprovado em reunião da CEUA de 06.08.2012.

Colaboradores: Lucas de Andrade Huber
Robert Langer
Daniel Blankschtein
Auro Nomizo

This is to certify that the work (Protocol number 11.1.1579.53.6), entitled: "Influência da Iontoforese na Penetração de Nanopartículas Lipídicas Sólidas em Tumores Cutâneos", by **Renata Fonseca Vianna Lopez**, is in accordance with the Ethic Principles in Animal Experimentation adopted by Ethic Commission for the Use of Animals (CEUA) of the *Campus* of Ribeirão Preto – USP, and was approved in the meeting, August, 6 2012.

Ribeirão Preto, 27 de agosto de 2012.

Presidente da CEUA
Profa. Dra. Claudia Maria Padovan

Secretária da CEUA
Maria Angélica Depiro