

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Nanodispersões de cristais líquidos como sistemas de liberação de
fotossensibilizadores na terapia fotodinâmica do câncer de pele:
avaliação *in vitro* e *in vivo* da permeação e retenção cutâneas**

Fábia Cristina Rossetti

**Ribeirão Preto
2010**

RESUMO

ROSSETTI, F. C. **Nanodispersões de cristais líquidos como sistemas de liberação de fotossensibilizadores na terapia fotodinâmica do câncer de pele: avaliação *in vitro* e *in vivo* da permeação e retenção cutâneas.** 133f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

A Terapia Fotodinâmica (TFD) é uma modalidade de tratamento de câncer relativamente nova e promissora. Baseia-se na utilização de uma substância fotossensibilizante e luz para provocar um dano seletivo ao tecido alvo, sendo que a seletividade ao órgão/tecido deve ser reconhecida como uma das vantagens no tratamento do câncer. Atualmente, o desenvolvimento de sistemas de liberação e promotores de absorção visando a otimização da liberação tópica de fotossensibilizadores, apresenta-se como um promissor e inexplorado campo de pesquisa na TFD do câncer de pele. Sistemas de liberação compostos por monoleína, um lipídeo polar biocompatível, e água são capazes de aumentar a permeação de fármacos na pele, além de serem capazes de controlar a liberação dos mesmos. No presente estudo foram desenvolvidas e caracterizadas nanodispersões de cristais líquidos como sistemas de liberação para os fotossensibilizadores Protoporfirina IX (PpIX) e Ftalocianinas de Zinco (ZnPc) e Cloro Alumínio (CIAIPc), objetivando otimizar a penetração cutânea destes na epiderme. As nanodispersões foram avaliadas em relação a sua eficiência de encapsulação, estabilidade física e química dos fotossensibilizadores veiculados, bem como a permeação e retenção cutânea *in vitro* e *in vivo* por microscopia de fluorescência. Estudos de pré-tratamento foram realizados, objetivando-se verificar o efeito promotor de absorção cutânea das nanodispersões desenvolvidas. Os experimentos de eficiência de encapsulação e estabilidade mostraram que as nanodispersões são um sistema de liberação adequado a aplicação tópica de fotossensibilizadores. Os experimentos *in vitro* mostraram que as nanodispersões aumentaram a penetração cutânea da PpIX e CIAIPc no estrato córneo em, respectivamente, 3,4 e 11,7 vezes, quando comparadas a formulação controle. Na epiderme mais derme sem estrato córneo, os aumentos promovidos pelas nanodispersões foram de 6,5 e 9,7 vezes para a PpIX e CIAIPc. No experimento *in vivo* as nanodispersões aumentaram a penetração cutânea da PpIX e CIAIPc no estrato córneo em, respectivamente, 13,7 e 7,0 vezes, quando comparadas ao controle, sendo que na epiderme mais derme sem estrato córneo somente as nanodispersões foram capazes de promover a penetração cutânea destes fotossensibilizadores nestas camadas da pele. A visualização da penetração cutânea dos fotossensibilizadores por microscopia de fluorescência confirmou os resultados obtidos nos experimentos *in vivo* de que as nanodispersões foram superiores ao controle em aumentar a penetração cutânea da PpIX e CIAIPc em camadas mais profundas da pele. Os resultados obtidos mostraram que as nanodispersões desenvolvidas são sistemas de liberação promissores para a PpIX e CIAIPc no tratamento do câncer de pele na TFD uma vez que aumentaram *in vitro* e *in vivo* a penetração cutânea destes na epiderme.

Palavras chave: Terapia Fotodinâmica, Câncer de pele, Nanodispersões de Cristais Líquidos, Ftalocianinas, Protoporfirina IX

1- INTRODUÇÃO

1.1 Estrutura da pele

A pele é o maior órgão do corpo humano, podendo ser considerado o mais complexo, devido à presença de pelo menos cinco diferentes tipos celulares responsáveis pela sua estrutura e outros tipos de células do sistema circulatório e imune residentes temporariamente. Este é um órgão com diversas funções sendo a proteção a sua principal função. Ela envolve a proteção física, química, imune, contra a radiação UV, patógenos e radicais livres. Outra função importante é a sua participação na termo-regulação, sensorial e endócrina (síntese de vitamina D, por exemplo) (MENON, 2002).

A sua espessura média é de 0,5 mm e é constituída por quatro principais camadas: o estrato córneo (EC), a epiderme viável, a derme e o tecido subcutâneo. A **Figura 1** representa a estrutura da pele.

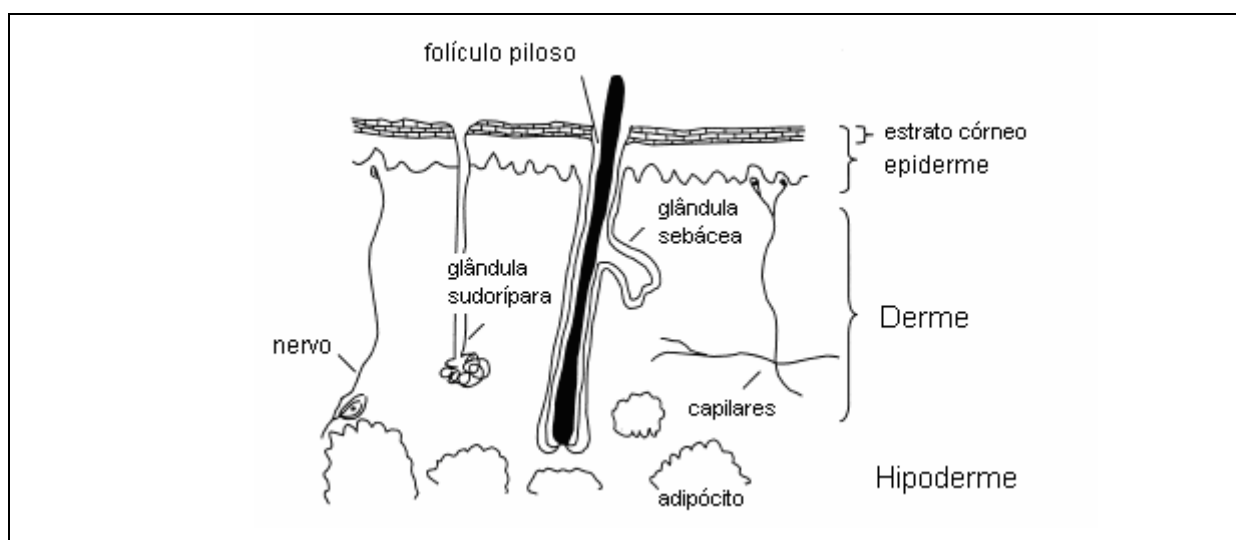


Figura 1: Estrutura da pele. Fonte: Adaptado de MENON, 2002.

Estrato Córneo

O EC (**Figura 2**), camada mais externa, constitui a principal barreira à passagem de substâncias através da pele devido a sua estrutura altamente organizada. A sua espessura varia de 10-20 μm e sua estrutura pode ser comparada à estrutura de um muro de tijolos. Os tijolos são representados por células anucleadas denominadas corneócitos. Estas células são achatadas e encontram-se densamente compactadas formando de 10 a 20 camadas. São compostas principalmente por queratina insolúvel e revestidas por um envelope celular

estabilizado por lipídeos covalentemente ligados e proteínas “cross-linked”. Os corneodesmosomos são responsáveis pela adesão mecânica dos corneócitos, mantendo as camadas do EC bastante coesas (ASBILL; MICHNIAK, 2000).

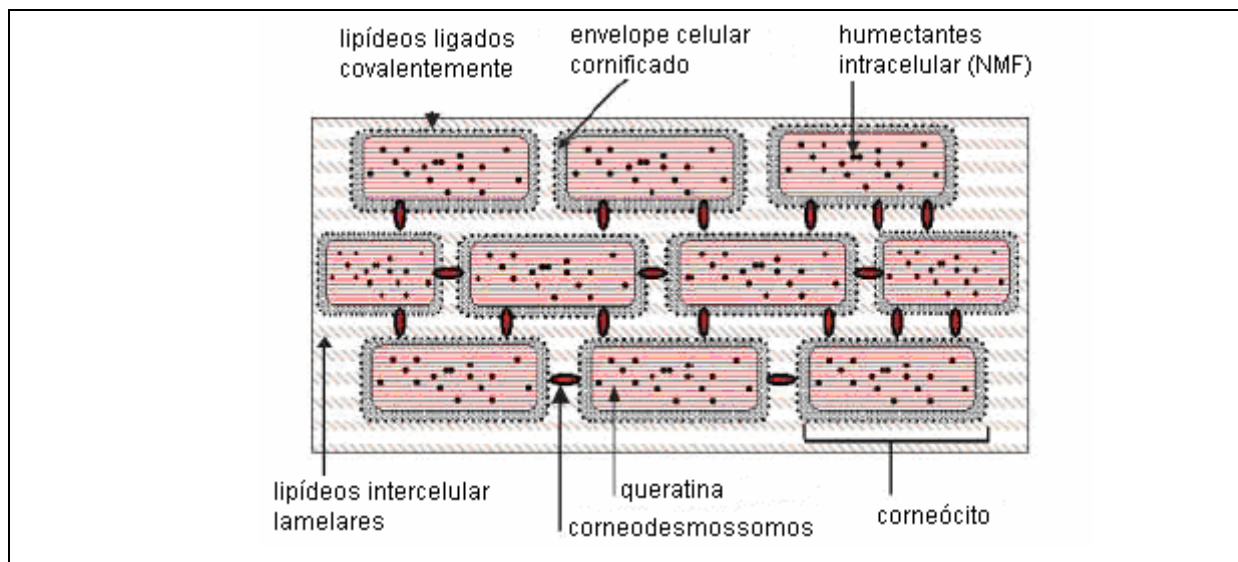


Figura 2: Representação esquemática da estrutura e componentes funcionais do estrato córneo. Adaptado de HARDING, 2004.

O cimento que segura os tijolos é representado por uma matriz lipídica na forma de bicamadas composta por ceramidas (41%), ácidos graxos (9%), colesterol (27%), ésteres de colesterol (10%) e pequena quantidade de colesterol sulfato (2%). Estudos de microscopia eletrônica de crio-fratura revelaram que os lipídeos estão organizados em lamelas localizados intercelularmente no EC. Estudos de difração de raios-X verificaram que os lipídeos no EC humano e porcino estão organizados em duas fases lamelares com periodicidades de aproximadamente 13 e 6 nm. A fase de 13 nm, denominada fase de longa periodicidade, é considerada crucial para a função barreira da pele, pois é amplamente encontrada em todas as espécies estudadas (SUHONEN; BOUWSTRA; URTTI, 1999). A velocidade e extensão da absorção de fármacos nesta camada dependem da capacidade que estes possuem em interagir com os lipídeos da matriz lipídica (FOLDVARI, 2000).

Epiderme viável

Ela é composta por diversas camadas de queratinócitos em diferentes estágios de diferenciação, desde a camada basal (mais interna) até a superfície da

pele. A epiderme estratificada, aproximadamente 100 a 150 μm , é dividida em quatro camadas distintas: o estrato basal, estrato espinhoso, estrato granuloso e estrato córneo. O estrato basal é uma camada única de células basais colunares que permanecem aderidas à membrana basal através de hemidesmossomos. Ele é composto por células tronco epidermais que originam as demais. O estrato espinhoso é abundante em desmossomos, sendo caracterizado histologicamente por células de aparência espinhosa. É nesta camada onde surgem os corpos lamelares ricos em lipídeos. O estrato granuloso é a camada onde estão presentes os grânulos de queratohialina responsáveis pela síntese de queratina e também onde os corpos lamelares liberam as substâncias precursoras da bicamada lipídica. É nesta camada onde ocorre o processo de transição de células granulares para cornificadas (MENON, 2002).

As seguintes células estão localizadas na epiderme viável: melanócitos, células de Langerhans, células T dendríticas, linfócitos epidermotróficos e células de Merkel. É também nesta camada onde se encontram enzimas catabólicas, tais como: esterases, lípases, proteases, fosfatases e nucleotidasas (FOLDVARI, 2000).

Segundo Shah (1994), a epiderme viável é caracterizada como sendo um gel aquoso e não se apresenta, na maioria das vezes, como uma barreira importante à penetração de substâncias. Seu papel na função barreira da pele está principalmente relacionado aos caminhos lipídicos intercelulares e a diversos fenômenos de partição. Dependendo da solubilidade do fármaco, este pode se particionar de camada a camada, após difusão pelo EC (FOLDVARI, 2000).

Derme

A derme é rica em capilares, nervos, folículos pilosos, glândulas sebáceas e sudoríparas. A sua elasticidade está relacionada à presença de uma rede de fibras protéicas que incluem o colágeno (tipo I e II) e a elastina, embebidos em uma substância amorfa denominada glicosaminoglicana. Contém também fibroblastos, leucócitos, macrófagos e mastócitos (FOLDVARI, 2000).

No desenvolvimento de formulações tópicas e transdérmicas é importante que se conheça a estrutura da pele e o modo como substâncias podem penetrá-la. De maneira geral, a absorção de fármacos através da pele ocorre passivamente. A absorção transepidérmica envolve a difusão do fármaco através do EC e camadas

de células da epiderme viável até as camadas superiores da derme, atingindo a microcirculação (SCHEUPLEIN; BLANK, 1971).

Existem três principais rotas pelas quais as substâncias podem penetrar o EC, são elas: a rota intercelular (entre os corneócitos, através da matriz lipídica), a transcelular (através dos corneócitos) e a paracelular (pelos apêndices cutâneos). Sendo que a maioria das substâncias penetra a pele através da rota intercelular, ou seja, através da matriz lipídica (BARRY, 2001). A **Figura 3** apresenta de maneira esquemática os mecanismos de penetração de substâncias através do estrato córneo.

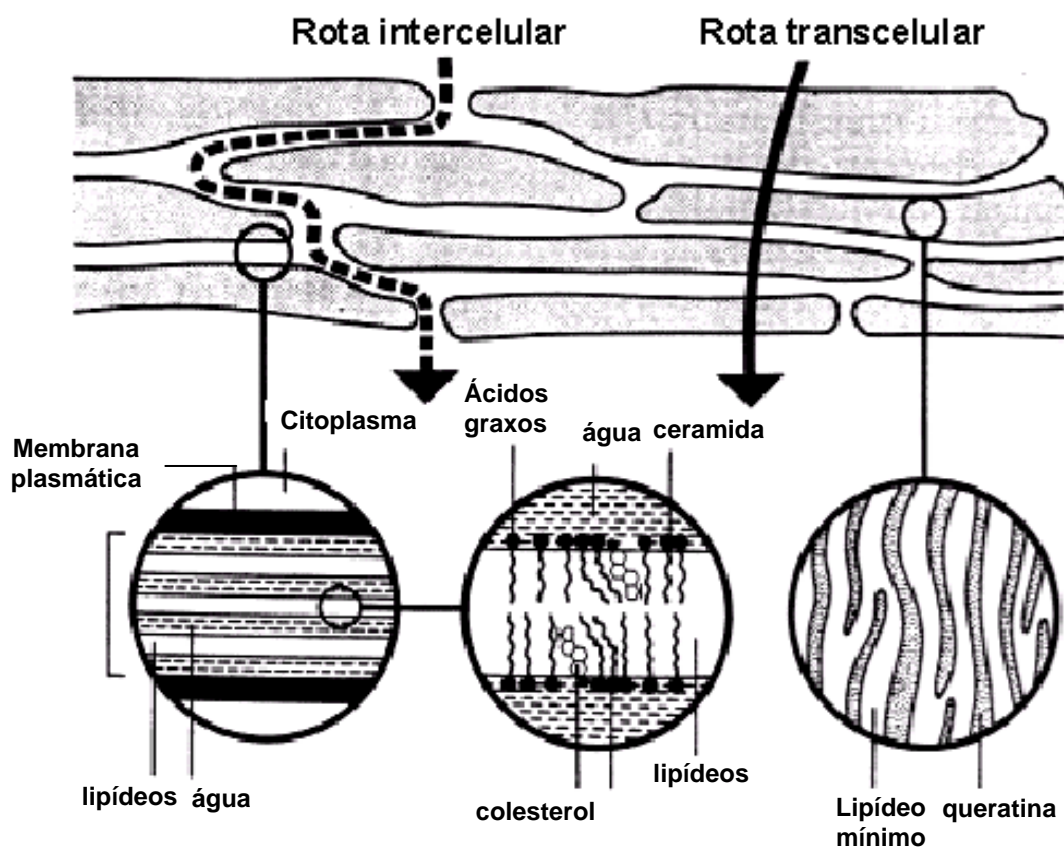


Figura 3: Representação esquemática dos mecanismos de penetração de substâncias através do estrato córneo. Fonte: adaptado de BARRY, 2001.

1.2 Câncer de pele

Os três tipos mais comuns de câncer de pele são: câncer tipo basocelular e espinocelular (câncer do tipo não-melanoma) e melanoma cutâneo maligno (melanoma) (ARMSTRONG; KRICKER, 2001).

O câncer de pele do tipo não-melanoma representa o neoplasma maligno mais comum em humanos (BASTIAENS *et al.*, 1998), sendo o tipo basocelular mais incidente, quando comparado ao espinocelular. A incidência de ambos tem crescido, sobrecarregando o sistema de saúde do mundo inteiro (LAUTH; UNDEN; TOFTGARD, 2004). É o câncer mais frequente no Brasil e corresponde a 25% de todos os tumores malignos registrados no país. Apresenta altos percentuais de cura, se for detectado precocemente. Possui um bom prognóstico, porém deixa seqüelas na maioria das vezes, o que onera os serviços de saúde. O número de casos novos estimados para o Brasil no ano de 2010 será de 53.410 entre homens e de 60.440 nas mulheres. Esses valores correspondem a um risco estimado de 56 casos novos a cada 100 mil homens e de 61 para cada 100 mil mulheres (INCA/MS, 2010).

O risco estimado por sexo e região para este tipo de câncer, segundo o INCA/MS para 2010 será o seguinte: Homens - 85/100.000 na região Sul, 55/100.000 na região Nordeste, 53/100.000 na região Sudeste e 25/100.000 na região Norte; enquanto, na região Centro-Oeste (44/100.000), é o segundo mais freqüente. Mulheres – é o mais freqüente nas regiões Sul (87/100.000), Centro-Oeste (66/100.000), Nordeste (61/100.000) e Norte (28/100.000); enquanto que na região Sudeste (56/100.000) o mesmo é o segundo.

A incidência do câncer tipo melanoma aumentou abruptamente nos últimos 50 anos, atingindo principalmente populações de pele branca (AUTIER, 2004). No Brasil é o tipo de câncer de pele menos freqüente, sua letalidade é elevada, porém sua incidência é baixa (2.960 casos novos em homens e 2.970 casos novos em mulheres). As maiores taxas estimadas em homens e mulheres encontram-se na região Sul do país (INCA/MS, 2010).

1.2.1 Carcinoma basocelular

O carcinoma basocelular (**Figura 4**) é originário da epiderme e dos apêndices cutâneos acima da camada basal, como os pêlos, por exemplo (LAUTH; UNDEN; TOFTGARD, 2004). É um tumor que raramente entra em metástase, acomete, principalmente, a região da cabeça e pescoço e está relacionado à intensa

exposição solar (SHELTON, 2001; LAUTH; UNDEN; TOFTGARD, 2004). Embora não seja letal, pode ocasionar desfiguração e morbidade devido à destruição do tecido local ou como resultado de tratamento cirúrgico (HOWELL *et al.*, 2005). É o tipo de câncer mais comum em adultos, acima dos 40 anos, porém não são raros os casos de pessoas com menos de 30 anos. Acomete principalmente pessoas de pele clara, que se queimam facilmente e apresentam sardas (HUMPHREYS, 2001).



Figura 4: Carcinoma tipo basocelular: (a) forma plano-superficial e (b) forma nódulo-ulcerativa. Fonte: INCA/MS –2009.

1.2.2 Carcinoma espinocelular

O carcinoma espinocelular (**Figura 5**) tem origem no queratinócio da epiderme, podendo também surgir no epitélio escamoso das mucosas (LAUTH; UNDEN; TOFTGARD, 2004). É um tipo de tumor que, diferentemente do basocelular, pode ser agressivo e entrar em metástase. As regiões mais afetadas são o pescoço e a cabeça, sendo que os indivíduos de cor branca e a exposição solar excessiva são os fatores de risco (SHELTON, 2001; LAUTH; UNDEN; TOFTGARD, 2004).

Este tipo de câncer desenvolve mais rapidamente que o basocelular em indivíduos com pele danificada cronicamente pelo sol, sendo mais comum que este em indivíduos não-brancos. Ocorre predominantemente em homens acima dos 40 anos e seu surgimento está relacionado com histórico de queratose actínica, lentigo solar e elastose (HUMPHREYS, 2001).



Figura 5: Câncer de pele tipo espinocelular. Fonte: www.dermatologia.net, obtida em março de 2006.

1.2.3 Melanoma

O melanoma cutâneo (**Figura 6**) é um tipo de câncer que tem origem nos melanócitos (células produtoras de melanina, substância que determina a cor da pele). Embora só represente 4% dos tipos de câncer de pele, o melanoma é o mais grave devido à sua alta possibilidade de metástase (INCA/MS, 2010).

Este tipo de câncer possui alto potencial de mortalidade e sua incidência aumentou muito nas últimas décadas. Ocorre principalmente entre 40 e 60 anos, porém 20% dos pacientes possuem menos de 40 anos. Acomete principalmente o tronco e as pernas nos homens e mulheres, respectivamente (BRUCE; BRODLAND, 2000).



Figura 6: Câncer de pele tipo melanoma. Fonte: www.sunsmart.com.au, obtida em março de 2006.

1.2.4 Etiologia

A excessiva exposição solar da população durante a segunda metade do século passado é a principal causa do aumento na prevalência do câncer de pele (URBACH, 1991; ARMSTRONG; KRICKER, 2001). Dados epidemiológicos confirmam uma maior incidência de câncer de pele em pessoas de pele clara, sensíveis ao sol, do que em pessoas de pele escura (ARMSTRONG; KRICKER, 2001). Pessoas que vivem em países tropicais, como Brasil e Austrália (país com o maior registro de câncer de pele no mundo) estão mais expostas a esse tipo de doença (URBACH, 1997; GREEN *et al.*, 1996).

1.2.5 Tratamento e Prevenção

Os cânceres de pele do tipo não-melanoma são tratados através de cirurgia, eletrodissecação, criocirurgia, aplicação tópica de podofilina e 5-fluorouracil e radioterapia. Estas terapias possuem alto custo e provocam cicatrizes do tipo hipo ou hiperpigmentação e efeitos colaterais, tais como, dor, inflamação aguda, irritação e ferida que podem durar por semanas (PENG *et al.*, 1995; STENDER; WULF, 1996; SZEIMIES; KARRER, 1996; WENNBERG *et al.*, 1996).

A prevenção do câncer de pele, inclusive os melanomas, inclui ações de prevenção primária por meio de proteção contra luz solar, que são efetivas e de baixo custo (CARDINEZ *et al.*, 2004; AFAQ; ADHAMI; MUKHTAR, 2004). A prevenção secundária, através de exame dermatológico cuidadoso, também é indicada, tendo a vantagem adicional de permitir o diagnóstico precoce de melanoma de pele em sua fase inicial, reduzindo a morbidade e mortalidade desta doença (MANNE *et al.*, 2004; HUMPHREYS, 2001).

1.3 Terapia Fotodinâmica

A terapia fotodinâmica (TFD) tornou-se a primeira opção de terapia para diversas doenças cutâneas, devido à busca de tratamentos mais aceitáveis para os pacientes (ORTEL *et al.*, 1996) e que não tivessem os inconvenientes dos tratamentos usuais para o câncer de pele.

A TFD é realizada mediante a presença de três componentes básicos: (i) o agente fotossensibilizante, (ii) o oxigênio molecular e (iii) a luz (CASTANO; DEMIDOVA; HAMBLIN; 2004; OSCHNER, 1997b; SHARMAN; VAN LIER; ALLEN, 2004). Os agentes fotossensibilizantes são compostos que absorvem energia da luz

visível em um comprimento de onda específico e são capazes de utilizar essa energia para induzir reações em outras moléculas, como o oxigênio molecular intracelular.

Clinicamente, a TFD ocorre através da administração de um fotossensibilizador (FS) ou seu precursor por diferentes vias (tópica, oral, intravascular, ou injeção local intra-tumoral), seguida por um intervalo de tempo que permita a distribuição, localização e acúmulo do FS nos tumores. As lesões malignas são, então, expostas à luz de comprimento de onda apropriado à absorção por esta molécula e sua fotoativação resulta na formação de espécies reativas de oxigênio, sendo o oxigênio singlete a principal espécie responsável pela citotoxicidade (GIBSON *et al.*, 1999).

O mecanismo de ação da TFD envolve reações fotofísicas e fotoquímicas, as quais estão ilustradas na **Figura 7**. Resumidamente, o FS no seu estado fundamental, o qual é um estado singlete (1PS), possui uma configuração eletrônica estável, ou seja, possui dois elétrons com spins opostos. Após a absorção de um fóton de luz de um comprimento de onda específico, o FS é elevado ao seu estado excitado ($^1FS^*$), o qual também é um estado singlete e de tempo de vida curto entre 10^{-8} e 10^{-9} segundos. Neste estado excitado, o FS pode retornar ao estado fundamental através da emissão de um fóton como energia luminosa (fluorescência) ou através da conversão interna com perda de energia eletrônica na forma de calor. Alternativamente, o FS pode ser convertido ao estado triplete ($^3FS^*$) através do cruzamento intersistema, envolvendo uma mudança no spin de um elétron (spins paralelos). O estado triplete do FS possui menor energia que o estado singlete, porém tempo de vida mais longo. O FS no estado excitado triplete pode retornar ao seu estado fundamental singlete através da emissão de luz (fosforescência) sem sofrer alteração química e, neste caso, repetir diversas vezes o processo de transferência de energia, ou sofrer dois tipos de reações (reações do tipo I e II). Na reação do tipo I, o FS reage diretamente com um substrato, podendo ser uma membrana celular ou molécula, e transferir um elétron ou próton formando um ânion ou cátion radical, respectivamente. Estes, por sua vez, podem reagir com o oxigênio produzindo espécies reativas de oxigênio (EROs). Na reação do tipo II, o FS transfere sua energia diretamente ao oxigênio molecular (em seu estado fundamental triplete - 3O_2), formando o oxigênio singlete (1O_2) no seu estado excitado altamente reativo. As EROs e o oxigênio singlete são responsáveis pelo

efeito citotóxico do FS, ocasionando a morte celular por apoptose ou necrose (DONNELLY, MCCARRON, TUNNEY; 2008; OSCHNER, 1997b).

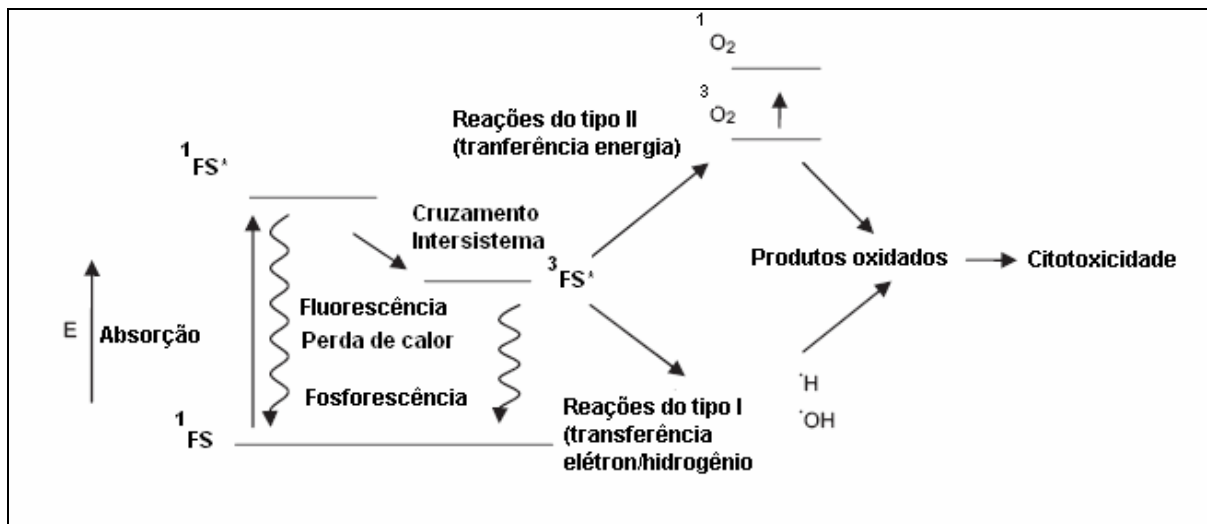


Figura 7: Mecanismo de ação da terapia fotodinâmica. Adaptado de DONNELLY, MCCARRON, TUNNEY; 2008.

As vantagens da TFD incluem o tratamento simultâneo de tumores múltiplos, boa aceitação pelo paciente, tempo de cura relativamente curto e bons resultados estéticos. Seu custo também é considerado efetivo e pode ser útil em pacientes que recusam cirurgias ou que não podem se submeter às mesmas (ZEITOUNI; OSEROFF; SHIEH, 2003).

A utilização tópica do FS permite altas concentrações no tecido local em comparação a outras vias, sendo que a maioria dos FSs não são detectados no plasma. Esse tipo de aplicação torna seu custo menor quando comparado a outros métodos de administração e também ocasiona menos reações adversas sistêmicas (WONG *et al.*, 2003).

É necessário que a região a ser tratada pela TFD seja totalmente iluminada com uma dose adequada de luz para que o tratamento tenha bons resultados. Portanto, um dos fatores que garantem o sucesso no tratamento de tumores de pele pela TFD (**Figura 8**) é o fácil acesso da luz às lesões cancerosas, pois sendo planas e superficiais na sua maioria, apresentam uma superfície livre à iluminação (BAGNATO *et al.*, 2005).



Figura 8: Exemplo de um carcinoma basocelular tratado com TFD no Brasil. Aqui temos o aspecto inicial da lesão; 30 dias e 12 meses após o tratamento. Este paciente foi monitorado por 30 meses, sem recorrência da lesão. Fonte: BAGNATO *et al.*, 2005.

Na TFD tópica podem ser utilizadas diversas fontes de luz (**Figura 9**), tais como, laser e fonte de luz não convergente (BROWN; BROWN; WALKER, 2004; DE ROSA; BENTLEY, 2000; IBBOTSON *et al.*, 2004). A fonte de luz utilizada deve exibir um espectro de característica adequada, que coincida com o comprimento de onda de máxima absorção do FS aplicado (DE ROSA; BENTLEY, 2000). Fotossensibilizadores com bandas de absorção acima de 600 nm são normalmente alvos para uso na TFD, pois comprimentos de onda maiores penetram mais profundamente o tecido (IBBOTSON *et al.*, 2004).



Figura 9: Dispositivo LED desenvolvido no Brasil que permite a iluminação de grandes áreas com intensidades de luz usuais de 150 mW/cm^2 . Fonte: BAGNATO *et al.*, 2005.

Atualmente, a TFD mostrou-se eficaz no tratamento de condições dermatológicas: queratose actínica, doença de Bowen, carcinoma espinocelular *in situ* e

cacinoma basocelular (SZEIMIES *et al.*, 2005). Outras condições não-oncológicas passíveis de serem tratadas pela TFD estão sendo estudadas, por exemplo: acne, psoríase, sarcoidosis, condiloma, verrugas e envelhecimento cutâneo (KORMEILI; YAMAUCHI; LOWE, 2004). O uso da TFD para o tratamento de melanoma ainda não foi substancialmente pesquisado em nenhum estudo, em parte devido a dificuldade em se alcançar boa penetração da luz em lesões pigmentadas e também devido a considerações éticas sobre a natureza agressiva da doença (BROWN; BROWN; WALKER, 2004).

Dougherty (1989) foi o primeiro a reportar o uso clínico da TFD com o FS derivado da hematoporfirina (HpD) para o tratamento de diversos tumores, incluindo o câncer de pele. Este foi o primeiro FS a ser aprovado pelo FDA para o tratamento do câncer através da TFD com o nome comercial de Photofrin[®]. As desvantagens da sua utilização incluem: a fotossensibilidade prolongada da pele, não permitindo a exposição do paciente à luz; baixa seletividade tumoral; baixa penetração tecidual da luz na região do máximo de absorção do Photofrin[®] e também pelo fato deste FS ser uma mistura complexa de vários tipos de estruturas não identificadas (CASTANO; DEMIDOVA; HAMBLIN, 2004; LOPEZ *et al.*, 2004).

A hematoporfirina e seus derivados são considerados FS de primeira geração e possuem em comum, além das desvantagens citadas acima, um núcleo tetrapirrol cíclico, como demonstrado na **Figura 10**:

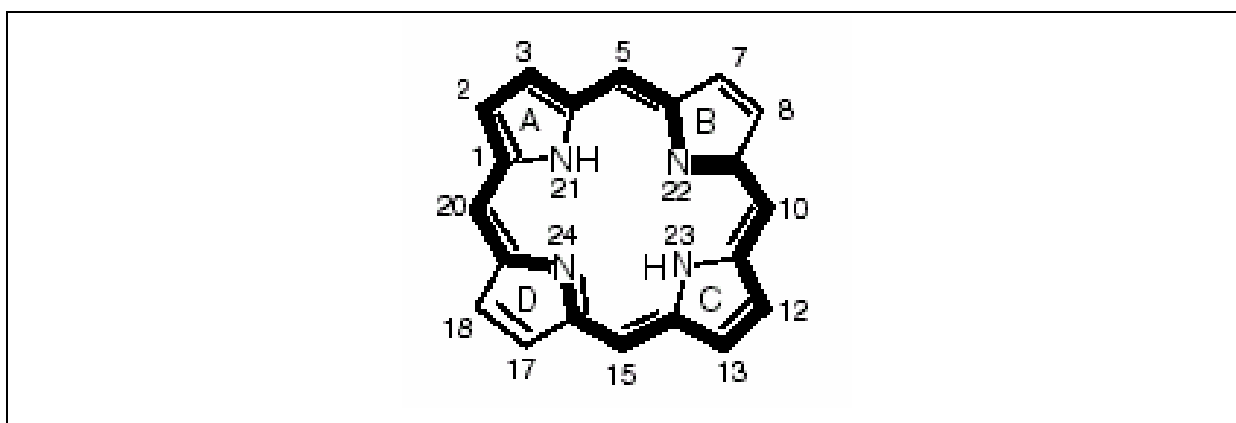


Figura 10: Estrutura química da Porfirina. Fonte: NYMAN; HYNINEN, 2004.

Entre 1999 e 2001, os precursores de protoporfirina IX (PpIX): o ácido 5-aminolevulínico (5-ALA) e seu éster metil 5-aminolevulinato foram aprovados nos

EUA e Europa, respectivamente, para o tratamento de queratose actínica e carcinoma basocelular superficial ou não (BROWN; BROWN; WALKER, 2004).

Existem diversas características para que um FS seja considerado ideal, porém, até o momento, não existe um FS que atenda a todas elas. A seguir, citamos a maioria das características ideais: (i) o FS não deve ser tóxico nas doses clínicas utilizadas, quando não exposto a luz; (ii) deve ter maior afinidade por tecidos malignos do que tecidos normais, promovendo maior concentração no tumor *versus* tecido normal; (iii) causar baixa incidência de reações adversas, tais como, hipotensão, reações alérgicas e dor; (iv) não ser mutagênico e carcinogênico; (v) possuir rápida farmacocinética de eliminação, evitando acúmulo na pele durante semanas ou meses, o que impediria a exposição do paciente à luz; (vi) absorver eficientemente a luz em comprimentos de onda na região do vermelho (630-780 nm) onde a penetração tecidual da luz é maior; (vii) possuir alta absorvidade molar ($> 20.000-30.000 \text{ L.M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) possibilitando a redução da dose a ser administrada; (viii) possuir alto rendimento quântico na produção de oxigênio singlete e outras espécies EROs; (ix) ter baixo custo e ser fácil de ser sintetizado; (x) ser hidrossolúvel ou solúvel em solventes biocompatíveis; (xi) poder ser administrado por diversas vias (oral, tópica, intravascular, inalação) dependendo da situação clínica; e (xii) permitir o tratamento do paciente sem a necessidade de internação, reduzindo o custo do tratamento (ALLISON *et al.*, 2004).

Procurando encontrar o FS ideal, diversos vem sendo avaliados, tais como os de segunda e terceira geração, respectivamente, ftalocianinas e clorofila-a (BONNETT, 1999; STERNBERG; DOLPHIN; BRUCKNER, 1998; WAINWRIGHT, 2008).

1.4 Protoporfirina IX (PpIX)

A utilização sistêmica do derivado da hematoporfirina (HpD) e do seu derivado purificado (Porfirina sódica) no tratamento de câncer de pele ou metástases cutâneas ocasiona o inconveniente da fotossensibilização prolongada da pele. A aplicação tópica destes FS não impediria a exposição total do paciente à luz, pois estes seriam aplicados localmente no tumor. Porém, a HpD e a porfirina sódica são moléculas de alta massa molecular (compostas por anéis tetrapirrol) que não penetram na pele, reduzindo a eficácia do tratamento (KENNEDY; POTTIER; PROSS, 1990; SZEIMIES *et al.*, 2005).

Em tratamentos de tumores com TFD, a hematoporfirina, considerada um FS externo, pode ser substituído por uma porfirina endógena, a Protoporfirina IX (**Figura 11**). A PpIX possui hidrogênios substituídos por grupos metila, vinila e grupos propionatos e sua nomenclatura oficial é ácido 1,3,5,8-tetrametil-2,4-divinilporfina-6,7-dipropiônio (KRAMMER; UBERRIEGLER, 1996).

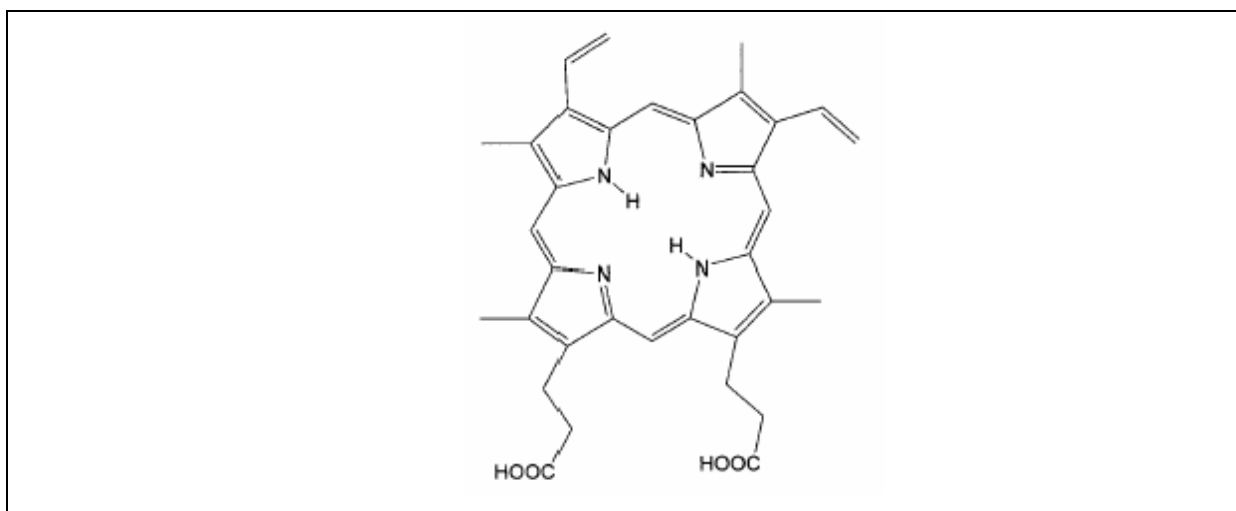


Figura 11: Estrutura química da Protoporfirina IX. Fonte: SCOLARO *et al.*, 2002.

A PpIX é induzida endogenamente pelo 5-ALA e pode ser usada para destruir fotodinamicamente células tumorais. Sendo que, os efeitos colaterais em pacientes tratados com PpIX são reduzidos se comparado ao uso de FSs exógenos devido a sua rápida degradação em tecidos normais, levando a um curto período de sensibilização (KENNEDY; POTTIER; PROSS, 1990).

Ela é gerada na mitocôndria, a partir da biossíntese do grupo heme, cuja reação é controlada por um mecanismo de feedback; após a síntese ela migra para o citoplasma e membrana nuclear (KENNEDY; POTTIER; PROSS, 1990; KENNEDY; POTTIER, 1992). Ela é caracterizada pela intensa absorção em 408 nm (banda Soret), juntamente com quatro bandas Q fracas em 506, 542, 577 e 630 nm (SCOLARO *et al.*, 2002)

A utilização do 5-ALA como pró-fármaco vem sendo bastante estudada no tratamento de queratose actínica e câncer de pele superficial. Nestes estudos o grau de sucesso no tratamento variou de 50 a aproximadamente 100%. Esta grande variação pode ser em parte explicada pelas diferenças nas condições de tratamento,

tais como, tempo de administração, veículos para o 5-ALA, condições de irradiação e critérios na seleção do paciente (DE ROSA; BENTLEY, 2000). Porém, através do controle adequado desses parâmetros é possível a obtenção de altas taxas de remissão no tratamento de lesões superficiais. Atualmente, foi aprovado nos EUA o tratamento tópico da queratose actínica através do 5-ALA (Levulan Kerastick®). Já na Europa, o seu derivado metil-ALA (Metvix®) foi aprovado para o tratamento tópico da queratose actínica, carcinoma basocelular e doença de Bowen (BRAATHEN *et al.*, 2007).

O caráter hidrofílico/hidrofóbico de um FS influi diretamente no seu estado de agregação e também no seu transporte e incorporação pelas células. Tem sido observado que quanto mais hidrofóbico for o FS, maior sua incorporação pelas células tumorais e melhor o efeito da TFD (BONNET, 1995).

Este é um dos grandes problemas na utilização tópica do 5-ALA, uma molécula hidrofílica e carregada, cuja eficácia na TFD depende de vários parâmetros, como por exemplo: sua concentração na pele, permeabilidade do fármaco e taxa de conversão do 5-ALA em PpIX (SVAASAND *et al.*, 1996). Apesar de estudos demonstrarem *in vitro* que o 5-ALA penetra o EC quando aplicado topicamente, parece que sua limitada penetração mais profunda na pele, assim como em tumores nodulares *in vivo*, são grandes limitações da aplicação tópica desta molécula na TFD (DE ROSA; BENTLEY, 2000).

A proposição do emprego de sistemas de liberação de fármacos que proporcionem um aumento na penetração e, conseqüentemente, na concentração de pró-fármacos e FS nos tecidos tumorais, constitui uma maneira de otimizar a terapia, uma vez que a atividade do FS é dependente da sua concentração no tecido alvo (JUZENAS *et al.*, 1999).

O FS PpIX possui um caráter anfifílico o qual permitiria uma melhor penetração cutânea deste, quando comparado a moléculas hidrofílicas e carregadas, sendo que o emprego de sistemas de liberação para a sua veiculação tópica garantiria a sua eficácia na TFD do câncer de pele.

1.5 Ftalocianinas

As ftalocianinas utilizadas na TFD, FSs de segunda geração, contêm um íon metálico diamagnético e demonstraram alta eficiência fotodinâmica no tratamento de tumores animais, assim como efeitos colaterais fototóxicos reduzidos (OSCHNER,

1997a; DE ROSA; BENTLEY, 2000). São hidrofóbicas e caracterizadas pela sua eficiência na absorção de luz com comprimentos de onda na faixa terapêutica, especialmente entre 650 e 800 nm (VALDUGA *et al.*, 1998).

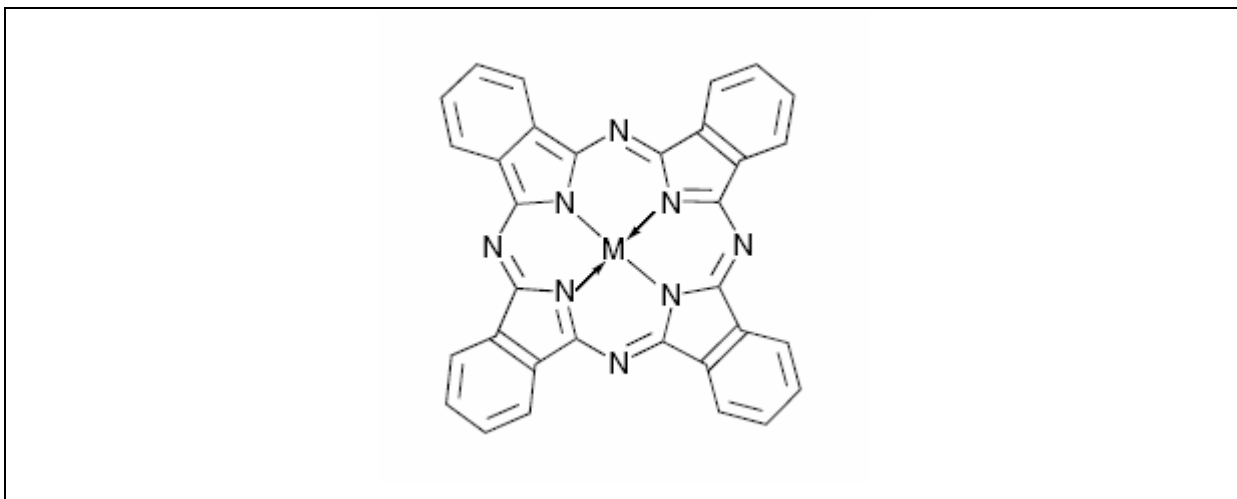


Figura 12: Estrutura química típica da ftalocianina onde M é o íon metálico central (Al, Zn).
Fonte: SIBATA; TEDESCO; MARCHETTI, 2004.

As propriedades fotofísicas das ftalocianinas são fortemente dependentes do íon metálico central. Dentre as ftalocianinas, complexos de Zn (II) e Al (III) (ftalocianina de zinco e ftalocianina de cloro e alumínio) (**Figura 12**) possuem as propriedades fotofísicas mais favoráveis para aplicação na TFD, isto é, tempo de vida longo no estado singlete (cerca de 3-8 ns) e triplete excitados, os quais são produzidos com alto rendimento quântico. Além disso, apresentam boa fotoestabilidade; podem ser seletivamente acumuladas e eliminadas mais eficientemente do tecido alvo, com quase nenhuma fluorescência observada em células após 24 h da sua administração; são preparadas por métodos sintéticos clássicos com bom rendimento; são produzidas em larga escala e de fácil purificação; além de possuir vantagens sobre as porfirinas devido a sua absorção ocorrer numa faixa de comprimento de onda maior (entre 600-650 nm), onde a penetração cutânea é favorecida (HOWE; ZHANG, 1998, LIU *et al.*, 2005; LOVE; ZANDEN; TAYLOR, 1997; NUNES; SGUILLA; TEDESCO, 2004; ODA, OGURA; OKURA, 2000; SCULLY *et al.*, 1998).

Como desvantagem, as ftalocianinas tendem a formar agregados, uma associação intermolecular, em meios aquosos que reduz o rendimento quântico de

fluorescência e encurta o tempo de vida triplete excitado (OZOEMENA; KUZNETSOVA; NYOKONG, 2001) e, conseqüentemente, afeta a sua eficácia fotossensibilizadora (SPIKES; VAN LIER; BOMMER, 1995). O rendimento quântico de fluorescência das ftalocianinas é afetado pela natureza do meio (VALDUGA; REDDI; JORI, 1987), sendo que alguns ambientes heterogêneos, tais como, vesículas, nucleoproteínas e albumina de soro bovino e humano usualmente previnem a sua agregação (LI *et al.*, 2000). Porém, a eficácia fotossensibilizante irá depender também da localização final da molécula no organismo e esta, por sua vez, irá depender também do tipo de célula cancerosa, do sistema de liberação utilizado, do ambiente e das propriedades físico-químicas do FS (DHAMI; PHILLIPS, 1996). Devido à presença de vários fatores que irão afetar o seu estado de agregação e atividade, é essencial a administração das ftalocianinas na sua forma monomérica (VALDUGA; REDDI; JORI, 1987). Outra desvantagem das ftalocianinas inclui a dificuldade da penetração tópica através do EC, por serem estes FSS derivados tetrazaisoindol de alta massa molecular (BOEHNCKE, 2001). Portanto, para garantir a eficácia fotossensibilizadora destes na TFD do câncer de pele é ideal o emprego de um sistema de liberação que garanta a sua desagregação e também permita uma maior penetração cutânea.

São vários os trabalhos que abordam as propriedades fotofísicas (DHAMI; PHILLIPS, 1996; GROFSIK *et al.*, 2004; HOWE; ZANG, 1997; OZOEMENA; KUZNETSOVA; NYOKONG, 2001; OWENS *et al.*, 1998; SPIKES; VAN LIER; BOMMER, 1995; VALDUGA; REDDI; JORI, 1987) e fotodinâmicas *in vitro* (BALL *et al.*, 1998; FABRIS *et al.*, 2006; HAYWOOD-SMALL *et al.*, 2006; HOWE; ZANG, 1998; LIU *et al.*, 2005; ODA; OGURA; OKURA, 2000; SCULLY *et al.*, 1998; VALDUGA *et al.*, 1998) e *in vivo* (CUBEDDU *et al.*, 2001; GRIFFITH *et al.*, 1994; LOVE *et al.*, 1996; VISONA *et al.*, 2000) das ftalocianinas e seus derivados. Porém, foram encontrados poucos estudos que abordam a utilização tópica destas no tratamento do câncer de pele, indicando que é recente o estudo da sua potencialidade para este tipo de tratamento. Atualmente, o uso clínico de ftalocianinas ainda não está aprovado, sendo que um derivado denominado *silicon phthalocyanine* (Pc 4) encontra-se em estudo clínico de Fase I (MILER *et al.*, 2007).

Kassab *et al.* (2000), Fabris *et al.* (2005) e Kyriazi *et al.* (2008) verificaram uma boa penetração cutânea através da aplicação tópica de derivados de ftalocianina em camundongos *hairless* e Balb/c. Sendo que, somente um estudo

realizado em humanos verificou a penetração tópica na epiderme de um derivado de ftalocianina (Pc 4) utilizando uma formulação a base de etanol e propilenoglicol (MILLER *et al.*, 2007).

1.6 Sistemas de Liberação compostos por Monoleína e Ácido oléico

Os principais componentes utilizados nos sistemas de liberação desenvolvidos são a monoleína, o ácido oléico e o poloxamer, conforme ilustrados na **Figura 13** abaixo.

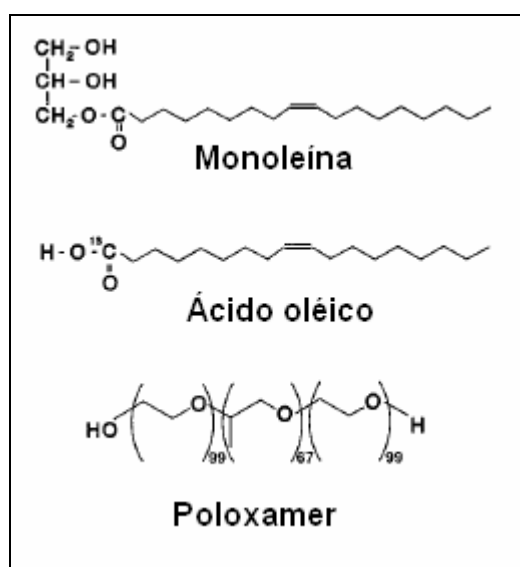


Figura 13: Estrutura molecular da monoleína, ácido oléico e poloxamer. Fonte: Adaptado de NAKANO *et al.*, 2001.

A auto-reorganização de moléculas anfífilicas em estruturas complexas é um vasto campo de pesquisa. A interação interfacial entre a cauda apolar do lipídeo e as moléculas polares de água é entalpicamente desfavorável e, com isso, induz a parte hidrofóbica do lipídeo a se agregar com outras partes também hidrofóbicas de outros lipídeos, enquanto que a cabeça polar permanece exposta ao meio aquoso. Assim, estruturas do tipo reversas são formadas (MARDER; ARMITAGE; YANG, 2004).

O monoleato de glicerila, também conhecido como monoleína (MO), é um lipídeo polar biodegradável conhecido por formar vários tipos de fases líquido-cristalinas na presença de água. As fases mais comumente observadas (**Figura 14**) são as fases lamelar, hexagonal e cúbica (SINGH, 2000; TYLE, 1989, ALFONS;

ENGSTRÖM, 1998). A formação de cada tipo de fase irá depender da temperatura e conteúdo de água, sendo a fase lamelar formada em baixas temperaturas ($< 50^{\circ}\text{C}$) e conteúdo de água ($< 20\%$); a fase cúbica em temperaturas variadas ($< 90^{\circ}\text{C}$) e conteúdo de água entre 20 e 40%; e a fase hexagonal em altas temperaturas ($> 90^{\circ}\text{C}$) e conteúdo de água semelhante a da fase cúbica (SHAH; SADHALE; CHILUKURI, 2001).

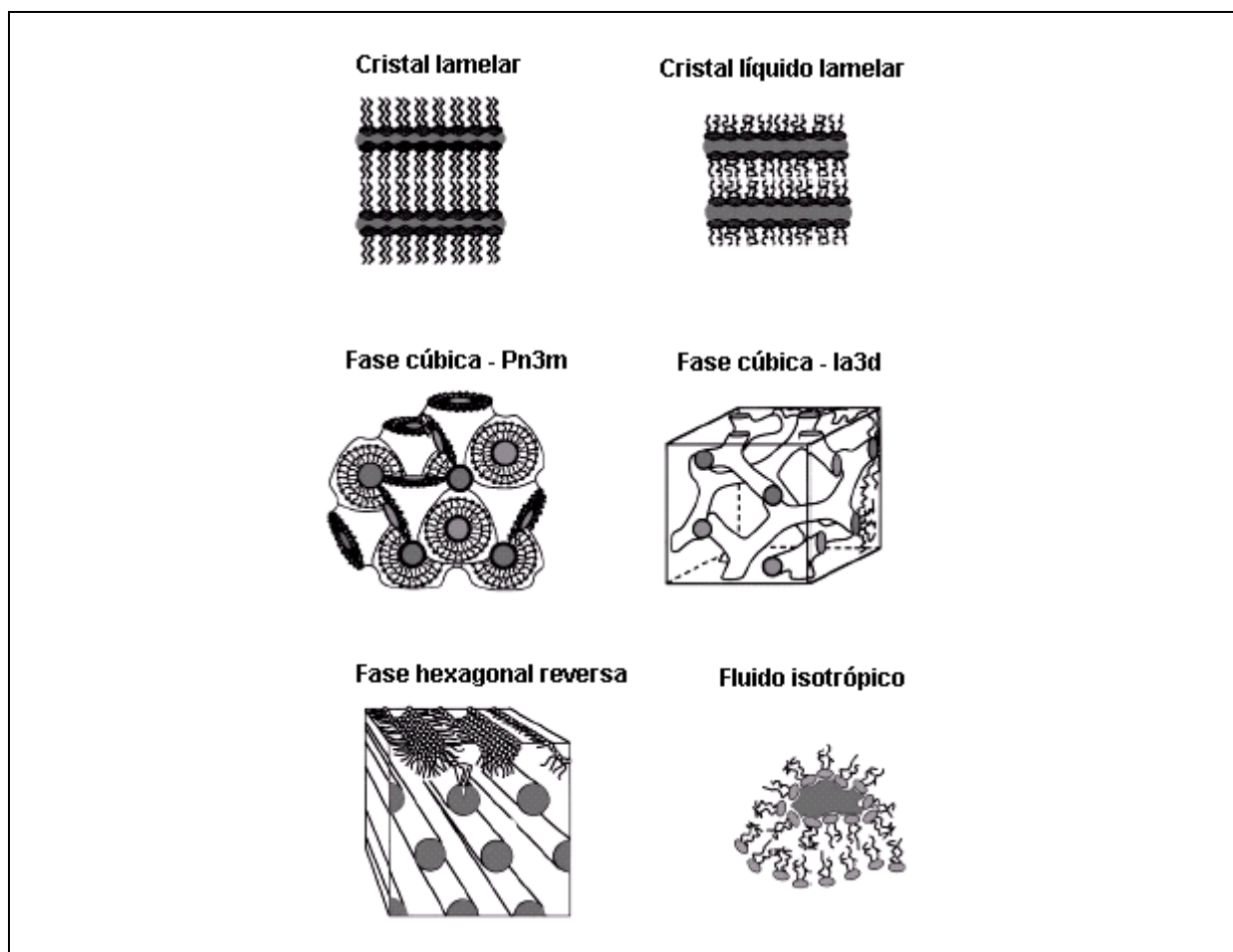


Figura 14: Representação esquemática das diferentes fases formadas pela monoleína em presença de água. Fonte: Adaptado de QIU; CAFFREY, 2000.

Cristais líquidos são considerados um estado da matéria cujas propriedades mecânicas e de simetria são intermediárias entre aquelas apresentadas por um sólido cristalino e um líquido isotrópico. A diferença básica entre um cristal e um líquido é que as moléculas de um cristal apresentam-se de forma ordenada, enquanto que as do líquido não. Portanto, as fases líquido-cristalinas possuem as características de ordem encontradas em sólidos cristalinos, podendo ser

caracterizadas por difração de raios-X, e alguma desordem, evidenciada pela fluidez, exibida por líquidos (SINGH, 2000).

A fase lamelar é formada por bicamadas lipídicas de MO, por exemplo, intercaladas por fases aquosas. A porção polar da MO encontra-se disposta à fase aquosa, enquanto que a porção apolar encontra-se disposta paralelamente. Esta fase caracteriza-se por ser fluida e apresentar anisotropia, quando observada em microscópio de luz polarizada (TYLE, 1989).

A fase hexagonal é formada por estruturas cilíndricas infinitas, sendo que a fase reversa é formada por canais aquosos de aproximadamente 2,6 nm, separados por camadas lipídicas e a fase normal o contrário. Ela caracteriza-se por ser mais viscosa que a lamelar e sua anisotropia é apresentada na forma de estrias. Para a formação deste tipo de fase em temperatura ambiente, é necessária a adição de um ácido graxo livre insaturado, como o ácido oléico (AO) (NORLING *et al.*, 1992, BORNE; NYLAMDER; KHAN, 2001).

A fase cúbica é formada por bicamadas curvas que se estendem tridimensionalmente, separando dois canais congruentes de água de aproximadamente 5,0 nm quando hidratado. Ela é caracterizada por ser um gel transparente, altamente viscoso e termodinamicamente estável na presença de excesso de água (ALI; CAFFREY, 2000; TYLE, 1989). Existem três tipos de fases cúbicas reversas denominadas de Diamante (D), Giróide (G) e Primitiva (P), que correspondem aos respectivos espaçamentos de grupos: $Pn3m$, $Ia3d$ e $Im3m$ (**Figura 15**). Sendo que o conteúdo de água acomodado por cada fase e, conseqüentemente, o tamanho dos canais aquosos, aumenta da fase D em direção a P.

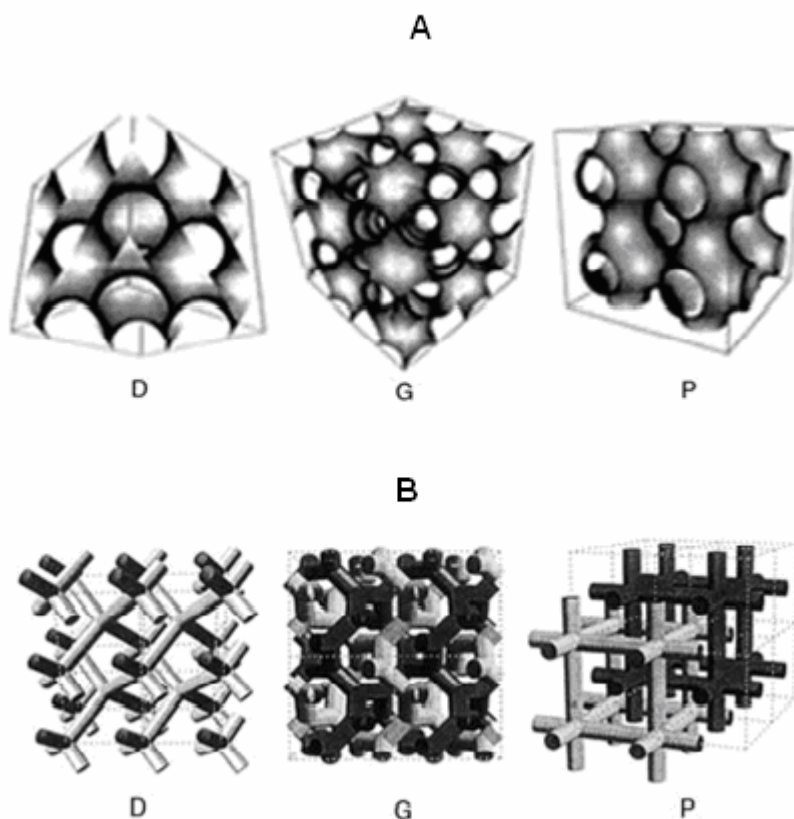


Figura 15: Representação estrutural dos três diferentes tipos de estrutura da fase cúbica, respectivamente, Diamante, Giróide e Primitiva: (A) representação da porção lipídica e (B) representação dos canais aquosos. Fonte: MARDER *et al.*, 2004.

Ambas as fases, cúbica e hexagonal reversas, também são formadas em excesso de água (> 40%), porém em diferentes temperaturas, sendo a fase cúbica em temperatura ambiente e a hexagonal somente em altas temperaturas quando na ausência do AO. A estabilidade em excesso de água é a principal característica destas fases, o que possibilita a sua dispersão (LARSSON, 2000). Sendo que, após serem submetidas a este processo, a estrutura líquido-cristalina e as propriedades inerentes a esses sistemas são mantidos (DRUMMOND; FONG, 2000; SIEKMANN *et al.*, 2002). A obtenção de nanodispersões de fase cúbica e hexagonal originou, respectivamente, os termos “cubossomas” (**Figura 16**) e “hexossomas”, e a estabilidade de ambas as fases como sistemas nanoparticulados é favorecida através do seu revestimento por um polímero de óxido de propileno e óxido de etileno denominado poloxamer (GUSTAFSSON *et al.*, 1997).

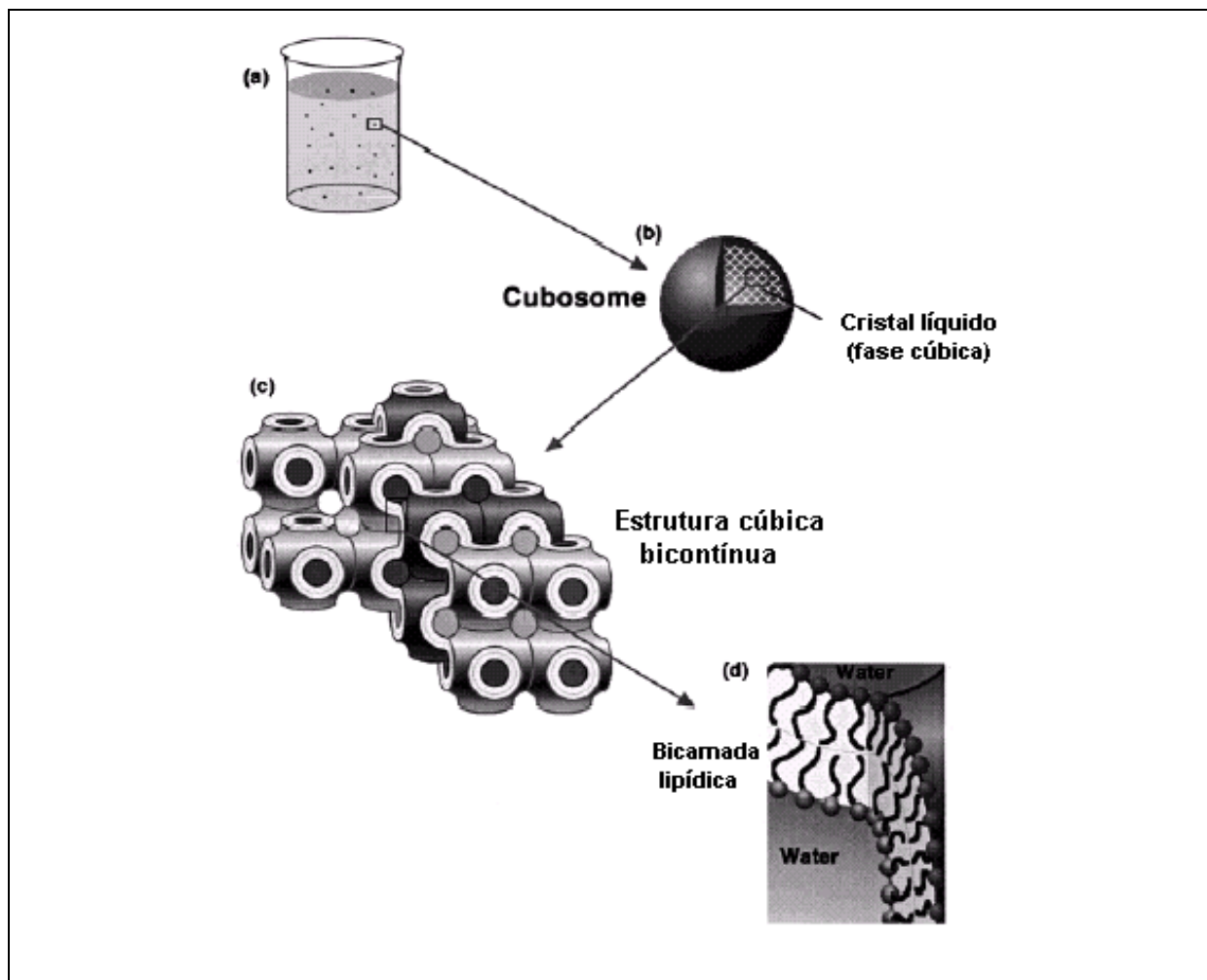


Figura 16: Representação esquemática dos “Cubossomas”. Fonte: NAKANO *et al.*, 2001.

A dispersão de fases líquido-cristalinas vem sendo estudada desde a descrição dos lipossomas, que consistem numa dispersão de fase lamelar (BANGHAM, 1972; GUSTAFSSON *et al.*, 1997). A utilização de nanodispersões de outras fases líquido-cristalinas pode contornar algumas desvantagens dos lipossomas, tais como, instabilidade termodinâmica, dificuldade de produção em escala industrial, pureza e custo dos lipídeos estruturais e baixa taxa de incorporação de compostos (BARENHOLZ, 2001; BARRAT, 2000; HEURTAULT *et al.*, 2003). Outras vantagens das nanodispersões de fases reversas comparadas aos lipossomas convencionais incluem a maior razão área de bicamada/volume das partículas dispersas, o que permite maior incorporação de fármacos lipo e anfífilos (SIEKMANN *et al.*, 2002; BOYD, 2003), estabilidade termodinâmica, além do baixo

custo dos lipídeos formadores destas fases (LARSSON, 2000; SIEKMANN *et al.*, 2002).

As nanodispersões foram inicialmente propostas como sistema de liberação para a administração parenteral, visando contornar o problema da elevada viscosidade dos géis de MO, que impede a sua administração parenteral (SIEKMANN *et al.*, 2002). Porém, esses sistemas dispersos também podem ser administrados por diversas vias, como a oral, tópica e percutânea (GUSTAFSSON *et al.*, 1997; LOPES *et al.*, 2006; SIEKMANN *et al.*, 2002).

Na área dermatológica, o uso de fases líquido-cristalinas do tipo cúbica e hexagonal apresenta diversas vantagens, tais como: i) são bioadesivas; ii) possuem um lipídio promotor de absorção (MO) como principal composto estrutural; iii) são capazes de incorporar compostos hidrossolúveis e lipossolúveis e evitam sua degradação química e enzimática; iv) controlam a liberação de compostos incorporados (LEE; KELLAWAY, 2000a; LEE; KELLAWAY, 2000b; SHAH; SADHALE; CHILUKURI, 2001; BORNE; NYLAMDER; KHAN, 2001; LARA; BENTLEY; COLLETT, 2005); e suportam a adição de substâncias promotoras de absorção na sua estrutura, até determinada concentração, sem alteração do fator de empacotamento, com conseqüente mudança de fase (IMBERG *et al.*, 2003; LIBSTER *et al.*, 2007). Sendo que sistemas de liberação compostos por MO na veiculação de FS para TFD demonstraram preservar a estabilidade química destes compostos e também aumentar sua penetração cutânea (MERCLIN *et al.*, 2004, STELUTI *et al.*, 2005; TURCHIELLO *et al.*, 2003).

Em comparação ao gel de fase cúbica e hexagonal, as nanodispersões destas fases líquido-cristalinas apresentam vantagens sobre estas por apresentarem uma área superficial maior, a qual permite uma maior interação com a pele, alta fluidez e podem ser incorporadas em outros tipos de formulações (SIEKMANN *et al.*, 2002; ESPOSITO *et al.*, 2003). Neste sentido, estudos demonstraram que as nanodispersões de fases líquido-cristalinas reversas do tipo cúbica e hexagonal são capazes, respectivamente, de controlar a absorção percutânea (ESPOSITO *et al.*, 2005) e aumentar a penetração de fármacos peptídicos e vitaminas na pele (LOPES *et al.*, 2006; LOPES; SPERETTA; BENTLEY, 2007).

A TFD tópica possui a vantagem de aumentar a seletividade do FS por células cancerosas, bem como evitar a fotossensibilidade generalizada do paciente proveniente da sua administração sistêmica (MILLER *et al.*, 2007). Porém, o sucesso

da TFD no tratamento de câncer de pele do tipo não melanoma depende, dentre outras variáveis, que quantidades suficientes do FS cheguem a células cancerosas localizadas na epiderme (MACCORMACK, 2008). Sendo assim, a formulação utilizada para administração tópica do FS tem que possibilitar a sua penetração através do EC e isso se torna difícil, pois a maioria dos FSs utilizados na TFD são moléculas altamente hidrofóbicas e de alta massa molecular, que dificilmente chegariam à epiderme viável sem o uso de um sistema de liberação adequado a esse fim. Neste sentido, a presente tese propõe o desenvolvimento de nanodispersões de cristais líquidos compostos por MO e AO como sistema de liberação tópico para os FSs PpIX e ftalocianina na TFD, com o objetivo de aumentar a penetração cutânea destes.

5- CONCLUSÃO

A discussão dos resultados obtidos permitiu concluir que:

- A espectrofluorimetria mostrou-se um método analítico sensível e adequado para a quantificação dos FSs em amostras de permeação e retenção cutâneas.
- Os diagramas de fases permitiram à seleção das nanodispersões de fase cúbica e hexagonal adequadas para a incorporação dos FSs e a realização dos experimentos *in vitro* e *in vivo* de permeação e retenção cutâneas. Essas eram compostas por MO/AO/NMP/poloxamer/H₂O nas seguintes proporções: 10/0/6,7/0,8/82,5 (DFC) e 8/2/5,3/1,3/83,4 (DFH).
- A análise por microscopia de luz polarizada possibilitou a caracterização dos géis de fase cúbica e hexagonal antes e após a adição do solvente NMP, FSs e conservante, bem como o acompanhamento da estabilidade dessas fases ao longo de 90 dias. A análise por difração de raios-X caracterizou a estrutura cúbica e hexagonal, e a manutenção da fase cristalina após a adição dos FSs e espessante nas nanodispersões.
- O acompanhamento do tamanho médio e Pdl durante 90 dias demonstrou que as nanodispersões a seguir, mantidas a 25°C, foram as mais estáveis, por apresentarem o tamanho médio abaixo de 200,0 nm, Pdl médio abaixo de 0,20 e o coeficiente de variação de no máximo 25% para ambos os parâmetros: DFH sem FS e com PpIX, ZnPc e CIAIPc; DFH espessadas sem FS e com PpIX e CIAIPc; DFC espessada contendo PpIX. O acompanhamento do tamanho médio e Pdl dessas nanodispersões durante 90 dias, mantidas a 45±2°C e 75±2% de U.R., demonstrou que as condições de armazenagem não alteraram a estabilidade das mesmas.
- A determinação da estabilidade química dos FSs nas nanodispersões demonstrou que a PpIX se manteve estável a 25°C e 45±2°C com U.R. de 75±5%. Sendo que as ftalocianinas apresentaram redução no seu conteúdo, quando armazenadas em ambas as condições de armazenagem.
- Os FSs PpIX e CIAIPc apresentaram uma eficiência de encapsulação adequada (> 70%) nas nanodispersões, sendo baixa (< 50%) para o FS ZnPc.

- Estudos preliminares de liberação *in vitro* mostraram uma liberação lenta (acima de 24 h) dos FSs CIAIPc e PpIX quando veiculados nas nanodispersões em comparação com o controle PEG.
- A análise por microscopia de fluorescência da pele dos camundongos, logo após o experimento *in vivo*, mostrou uma melhor distribuição dos FSs em camadas mais profundas da pele quando veiculados nas nanodispersões.
- Os estudos de pré-tratamento demonstraram que a solução de MO/AO/NMP/PEG não foi capaz de aumentar a penetração cutânea dos FSs por um mecanismo que atua preferencialmente na redução da resistência do EC.
- Os estudos de pré-tratamento demonstraram que as nanodispersões, além de atuarem por um mecanismo promotor de absorção atuando no EC, no caso da PpIX, para ambos os FSs (PpIX e CIAIPc) o aumento verificado também sugere um efeito proporcionado pelo sistema de liberação atuando concomitante aos FSs, ou seja, efeito de carreamento., dentre outros.
- As DFH consistem em um sistema de liberação tópico eficazes, uma vez que aumentaram a penetração cutânea *in vitro* e *in vivo* dos FSs PpIX e CIAIPc na camada alvo da TFD, ou seja, epiderme viável.

De maneira geral pode-se concluir que as DFH são sistemas de liberação de base nanotecnológica promissores para administração tópica dos FSs PpIX e CIAIPc na TFD.

6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

* As Referências Bibliográficas estão de acordo com as normas da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT).

ALFONS, K.; ENGSTROM, S. Drug compatibility with the sponge phases formed in monoolein, water and propylene glycol or poly(ethylene glycol). **J. Pharm. Sci.**, United States, v. 87, n. 12, 1998.

ALLISON, R.R., DOWNIE, G.H., CUENCA, R., HU, X., CHILDS, C.J.H., SIBATA, C. Photosensitizers in clinical PDT. **Photodiagn. Photodyn. Ther.**, Netherlands, v. 1, p. 27-42, 2004.

ALMGREN, M.; EDWARDS, K.; KARLSSON, G. Cryo transmission electron microscopy of liposomes and related structures. **Colloids Surf., A**, Netherlands, v. 174, p. 3-21 (2000).

ALVAREZ-ROMÁN, R., NAIKA, A., KALIAA, Y.N., FESSIA, H., GUY, R.H. Visualization of skin penetration using confocal laser scanning microscopy. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, Netherlands, v. 58, p. 301–316, 2004.

AMAR-YULI, I.; WACHTEL, E.; SHOSHAN, E.B.; DANINO, D.; ASERIN, A.; GARTI, N. Hexosome and Hexagonal Phases Mediated by Hydration and Polymeric Stabilizer. **Langmuir**, Baltimore, v. 23, p. 3637-3645, 2007.

AMAR-YULI, I.; ASERIN, A.; GARTI, N. Solubilization of Nutraceuticals into Reverse Hexagonal Mesophases. **J. Phys. Chem. B.**, United States, v. 112, p. 10171–10180, 2008.

ARMSTRONG, B.K.; KRICKER, A. **J. Photochem. Photobiol. B.**, Amsterdam, v. 63, p. 8-18, 2001.

ASBILL, C.S., MICHNIAK, B.B. Percutaneous penetration enhancers: local versus transdermal activity. **PSTT**, Amsterdam, v. 3, p. 36-41, 2000.

ATKINS, P.W. Diffraction techniques. In: ATKINS, P.W. **Physical chemistry**. Oxford University Press, 1998. p. 619-646.

AUTIER, P. Perspectives in melanoma prevention: the case of sunbeds. **Eur. J. Cancer**, Oxford, v. 40, p. 2367–2376, 2004.

BAGNATO, V.S., KURACHI, C., FERREIRA, J., MARCASSA, L.G., SIBATA, C.H., ALLISON, R.R. PDT experience in Brazil: A regional profile. **Photodiagn. Photodyn. Ther.**, Netherlands, v. 2, p. 107-118, 2004.

BANGHAM, A.D. Lipid bilayers and biomembranes. **Annu. Rev. Biochem.**, United States, v. 41, p. 753-776, 1972.

BARENHOLZ, Y. Liposome application: problems and prospects. **Curr. Opinion Colloid Interf. Sci.**, Amsterdam, v. 6, p. 66-67, 2001.

BARRAT, G.M. Therapeutic applications of colloidal drug carriers. **PSTT**, Amsterdam, v. 3, p. 163-171, 2000.

BARRY, B.W. Mode of action of penetration enhancers in human skin. . **J. Control. Release**, Amsterdam, v. 6, p. 85-97, 1987.

BARRY, B.W. Novel mechanisms and devices to enable successful transdermal drug delivery. **Eur. J. Pharm. Sci.**, Amsterdam, v. 14, p. 102-114, 2001.

BASTIAENS, M. T.; HOEFNAGEL, J.J.; BRUIJN, J.A.; WESTENDORP, R.G.; VERMEER, B.J.; BOUWES BAVINCK, J.N. Differences in age, size distribution, and sex between nodular and superficial basal cell carcinoma indicate different types of tumors. **J. Invest. Dermatol.**, New York, v.110, n.6, p.880-4. 1998.

BEN-HUR, E., ROSENTHAL, I. Photosensitized inactivation of Chinese hamster cells by phthalocyanines. **Photochem Photobiol.**, United States, v. 42, p. 129-133, 1985.

BOEHNCKE, W.H., Topical photodynamic therapy for psoriasis, In: Calvazara-Pinton, P., Szeimies, R.M., Ortel, B., **Photodynamic therapy and Fluorescence diagnosis in dermatology**, Elsevier Science, 2001, p. 259-270.

BONNETT, R. Photosensitizers of the porphyrin and phthalocyanine series for photodynamic therapy. **Chem. Soc. Reviews**, England, p. 19-33, 1995.

BONNETT, R. Photodynamic therapy in historical perspective. **Ver. Contemp. Pharmacother.** v. 10, p. 1-17, 1999.

BORNÉ, J., NYLANDER, T., KHAN, A. Phase behaviour and aggregate formation for the aqueous monoolein system mixed with sodium oleate and oleic acid. **Langmuir**, Baltimore, v. 17, p. 7742-7751, 2001.

BOYD, B.J. Characterisation of drug release from cubosomes using the pressure ultrafiltration method. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 260, p. 239-247, 2003.

BOYD. B.J., WHITTAKER, D.V., KHOO, S., DAVEY, G. Hexosomes formed from glycerate surfactants—Formulation as a colloidal carrier for irinotecan. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 318, p. 154–162, 2006.

BOYD, B.J.; RIZWAN, S.B.; DONG, Y.; HOOK, S.; RADES, T. Self-assembled geometric liquid-crystalline nanoparticles imaged in three dimensions: hexosomes are not necessarily flat hexagonal prisms. **Langmuir**, Baltimore, v. 23, p. 12461-12464, 2007.

BOIY, A., ROELANDTS, R., OORD, J., DE WITTE, P.A.M. Photosensitizing activity of hypericin and hypericin acetate after topical application on normal mouse skin. **Br. J. Dermatol.**, England, v. 158, p. 360 – 369, 2007.

BOUWSTRA, J., GOORIS, G., PONEC, M. The lipid organisation of the skin barrier: liquid and crystalline domains coexist in lamellar phases. **J. Biol. Phys.**, Netherlands, v. 28, p. 211–223, 2002.

BOUWSTRA, J., GOORIS, G., PONEC, M. The skin barrier: A unique interplay between corneocytes and lipids. **J. Cosmetic Sci.**, United States, v. 54, p. 102–103, 2003.

BRAATHEN, L.R., SZEIMIES, R.M., BASSET-SEGUIN, N., BISSONNETTE, R., FOLEY, P., PARISER, D., ROELANDTS, R., WENBERG, A.M., MORTON, C.A. Guidelines on the use of photodynamic therapy for nonmelanoma skin cancer: an international consensus. **J. Am. Acad. Dermatol.**, United States, v. 56, p.125-143, 2007.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Validação. Resolução nº 899, 29 de maio de 2003. **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**, Brasília, junho de 2003.

BRONAUGH, R.L., STEWART, R.F., CONGDON, E.R. Methods for *in vitro* percutaneous absorption studies. II. Animal models for human skin. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, United States, v. 62, p. 481-488, 1982.

BROWN, S.B.; BROWN, E.A.; WALKER, I. The present and future role of photodynamic therapy in cancer treatment. **Lancet Oncol.**, London, v. 5, p. 497-508, 2004.

BRUCE, A.J., BRODLAND, D.G. Overview of skin cancer detection and prevention for the primary care physician. **Mayo Clin. Proc.**, Rochester, v. 75, p. 491-500, 2000.

BUGAJ, A., IANI, V., JUZENIENE, A., JUZENAS, P., MA, L.W., MOAN, J. The effect of dimethylsulfoxide, 1-[2-(decylthio)ethyl]azacyclopentan-2-one and Labrafac® CC on porphyrin formation in normal mouse skin during topical application of methyl 5-aminolevulinate: A fluorescence and extraction study. **Photodiag. Photodyn. Ther.**, Netherlands, v. 3, p. 27—33, 2006.

CABOI, F., AMICO, G.S., PITZALIS, P., MONDUZZI, M., NYLANDER, T., LARSSON, K. Addition of hydrophilic and lipophilic compounds of biological relevance to the monoolein:water system. I. Phase behavior. **Chem. Phys. Lipids**, Ireland, v. 109, p. 47–62, 2001.

CARDINEZ, C.J.; COKKINIDES, V.E.; WEINSTOCK, M.A.; O'CONNELL, M.C. Sun protective behaviors and sunburn experiences in parents of youth ages 11 to 18. **Prev. Med.**, New York, v. 41, p. 108-117, 2005.

CARR, M.G.; CORISH, J.; CORRIGAN, O.I. Drug delivery from a liquid crystalline base across Visking and human stratum corneum. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, .v. 157, p. 35-42, 1997.

CASTANO, A.P.; DEMIDOVA, T.; HAMBLIN, M.R. Mechanisms in photodynamic therapy: party one - photosensitizers, photochemistry and cellular localization. **Photodiag. Photodyn. Ther.**, Netherlands, v.1, p. 279-293, 2004

CASTANO, A.P.; DEMIDOVA, T.; HAMBLIN, M.R. Mechanisms in photodynamic therapy: party three - photosensitizer pharmacokinetics, biodistribution, tumor localization and modes do tumor destruction. **Photodiag. Photodyn. Ther.**, Netherlands, v.2, p. 91-106, 2005.

CAUSON, R. Validation of chromatographic methods in biomedical analysis. Viewpoint and discussion. **J. Chromatogr. B**. Amsterdam, v. 689, nº1, p. 175-180, 1997.

CEVC, G., BLUME, G., SCHATZLEIN, A., GEBAUER, D., PAUL, A. The skin: A pathway for systemic treatment with patches and lipid-based agent carriers. **Adv. Drug Del. Rev.**, Netherlands, v. 18, p. 349-378, 1996.

CEVC, G., RICHARDSEN, H. Lipid vesicles and membrane fusion. **Adv. Drug Del. Rev.**, Netherlands, v. 38, p. 207-232, 1999.

CEVC, G. Lipid vesicles and other colloids as drug carriers on the skin. **Adv. Drug Del. Rev.**, Netherlands, v. 56, p. 675-711, 2004.

CHAN, W.S., MARSHALL, J.F., LAM, G.Y., HART, I.R. Tissue uptake, distribution and potency of the photoactivatable dye chloroaluminium sulfonated phthalocyanine, in mice bearing transplantable tumors. **Cancer Res.**, Philadelphia, v. 48, p. 3040-3044, 1988.

CHANG, C.M., BODMEIER, R. Low viscosity monoglyceride-based drug delivery systems transforming into a highly viscous cubic phase. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 173, p. 51-60, 1998.

CHUNG, H., KIM, J., UM, J.Y., KWON, I.C., JEONG, S.Y. Self-assembly "nanocubicle" as a carrier for peroral insulin delivery. **Diabetologia**, Germany, v. 45, p. 448-451, 2002.

CUBEDDU, R., CANTI, G., D'ANDREA, C., PIFFERI, A., TARONI, P., TORRICELLI, A., VALENTINI, G. Effects of photodynamic therapy on the absorption properties of disulphonated aluminum phthalocyanine in tumor-bearing mice. **J. Photochem. Photobiol. B: Biol.**, Amsterdam, v.60, p. 73-78, 2001.

DARWENT, J.R. Photoreduction of methyl viologen in micellar solutions sensitized by zinc phthalocyanine. **J. Chem. Soc. Chem. Commun.**, England, p. 805-807, 1980.

De PAULA, D. **Sistemas lipídicos para veiculação de fármacos peptídicos e RNAs interferentes**. 2007. 172 f. Tese (doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 2007

DE ROSA, F.S.; BENTLEY, M.V.L.B. Photodynamic therapy of skin cancers: sensitizers, clinical studies and future directives. **Pharm. Res.**, Washington, v. 17, p. 1447-1455, 2000.

DE ROSA, F.S., MARCHETTI, J.M., TEDESCO, A.C., BENTLEY, LOPEZ, R., PIERRE, M., LANGE, N., ROTTA, J. BENTLEY, M.V.L.B. *In vitro* skin permeation and retention os 5-aminolevulinic acid ester derivatives for photodynamic therapy. **J. Control. Release**, Netherlands, v. 89, p. 261-269, 2003.

DHAMI, S., PHILLIPS, D. Comparison of the photophysics of an aggregating and non-aggregating aluminum phthalocyanine system incorporated into unilamellar vesicles. **J. Photochem. Photobiol. A: Chem.**, Switzerland, v. 100, p. 77-84, 1996.

DONNELLY, R.F., MCCARRON. P.A., TUNNEY. M.M. Antifungal photodynamic therapy. **Microbiol. Res.**, Germany, v. 163, p. 1-12, 2008

DRAKAKI, E.; BORISOVA, E.; MAKROPOULOU, M.; AVRAMOV, L.; SERAFETINIDES, A.A.; ANGELOV, I. Laser induced autofluorescence studies of animal skin used in modeling of human cutaneous tissue spectroscopic measurements. **Skin Res. Technol.**, Denmark, v. 13, p.350–359, 2007.

DRUMMOND, C.J. FONG, C. Surfactant self-assembly objects as novel drug delivery vehicles. **Curr. Opinion Colloid Interf. Sci.**, Amsterdam, v. 4, p. 449-456, 2000.

EICHWURZEL, I.; STIEL, H., RODER, B. Photophysical studies of the pheophorbide a dimmer. **J. Photochem. Photobiol.**, Switzerland, v. 54, p. 194-200, 2000.

EL MAGHRABY, G.M., BARRY, B.W., WILLIAMS, A.C. Liposomes and skin: From drug delivery to model membranes. **Eur. J. Pharm. Sci.**, Netherlands, v. 34, p. 203–222, 2008.

ESPOSITO, E.; CORTESI, R.; DRECHLER, M.; PACCAMICCIO, L.; MARIANI, P.; CONTADO, C.; STELLIN, E.; MENEGATTI, E.; BONINA, F.; PUGLIA, C. Cubosome dispersions as delivery systems for percutaneous administration of indomethacin. **Pharm. Res.**, Washington, v. 22(12), p. 2163-73, 2005.

ESPOSITO, E., EBLOVI, N., RASI, S., DRECHLER, M., DI GREGORIO, G., MENEGATTI, E., CORTESI, R. Lipid-based supramolecular systems for topical application: A preformulatory study. **AAPS PharmSci.**, United States, v. 5, p.1-15, 2003.

FABRIS, C., SONCIN, M., MAZZON, E., CALZAVARA-PINTON, P., FANTETTI, L., CHITI, G., DEI, D., TAMPUCCI, S., RONCUCCI, G., JORI, G. A novel tetracationic phthalocyanine as a potential skin phototherapeutic agent. **Exp. Dermatol.**, Denmark, v. 14, p. 675–683, 2005.

FABRIS, C., SONCIN, M., MIOTTO, G., FANTETTI, L., CHITI, G., DEI, D., RONCUCCI, G., JORI, G. Zn(II)-phthalocyanines as phototherapeutic agents for cutaneous diseases. Photosensitization of fibroblasts and keratinocytes. **J. Photochem. Photobiol. B: Biol.**, Switzerland V. 83, p. 48–54, 2006.

GERAGHTY, P.B.; ATTWOOD, D.; COLLETT, J.H.; SHAMA, H.; DANDIKER, Y. An investigation of the parameters influencing the bioadhesive properties of Myverol 18-99/water gels. **Biomaterials**, England, v. 18, p. 63-67, 1997.

GIBSON, S.L.; HAVENS, J.J.; NGUYEN, M.L.; HILF, R. δ -Aminolevulinic acid-induced photodynamic therapy inhibits protoporphyrin IX biosynthesis and reduces subsequent treatment efficacy *in vitro*. **Br. J. Cancer**, London, v. 80, p. 998-1004, 1999.

GREEN, A.; BATTISTUTTA, D.; HART, V. LESLIE, D., WEEDON, D. Skin cancer in a subtropical Australian population: incidence and lack of association with occupation. **Am. J. Epidemiol.**, Baltimore, v. 144, p. 1034-40, 1996.

GRIFFITH, J., CROUSE-SAWYER, J., WOOD, S.R., SCHOFIELD, J., BROWN, S.B., DIXON, B. On the photodynamic therapy action spectrum of zinc phthalocyanine tetrasulphonic acid *in vivo*. **J. Photochem. Photobiol. B: Biol.**, Switzerland, v. 24, p. 195-199, 1994.

GROFCSIK, A.; BARANYAI, P.; BITTER, I.; CSOKAI, V.; KUBINYI, M.; SZEGLETES, K.; TATAI, J.; VIDOCZY, T. Triple state properties of tetrasubstituted zinc phthalocyanine derivatives. **J. Mol. Struct.**, Amsterdam, v. 704, p.11-15, 2004.

GUSTAFSSON, J., LJUSBERG-WAHREN, H., ALMGREN, M., LARSSON, K. Cubic-lipid-water phase dispersed into submicron particles. **Langmuir**, Baltimore, v. 12, p. 4611-4613, 1996.

GUSTAFSSON, J., LJUSBERG-WAHREN, H., ALMGREN, M., LARSSON, K. Submicron particles of reversed lipid phases in water stabilized by nonionic amphiphilic polymer. **Langmuir**, Baltimore, v. 13, p. 6964-6971, 1997.

HARDING, C. The stratum corneum: structure and function in health and disease. **Dermatol. Ther.**, Denmark, v. 17, p. 6-15, 2004.

HEURTAULT, B., SAULNIER, P., PECH, B., PROUST, J.E., BENOIT, J.P. Physico-chemical stability of colloidal lipid particles. **Biomaterials**, Amsterdam, v. 24, p. 4283-4300, 2003.

HONEYWELL-NGUYEN, P.L., BOUWSTRA, J.A. Vesicles as a tool for transdermal and dermal delivery. **Drug Discov. Today: Technologies**, England, v. 2, p. 67-74, 2005.

HOWE, L.; ZHANG, J.Z. The effect of biological substrates on the ultrafast excited-state dynamics of zinc phthalocyanine tetrasulfonate in solution. **Photochem. Photobiol.**, Oxford, v. 67, n. 1, p. 90-96, 1998.

HOWELL, B.G.; SOLISH, N.; LU, C.; WATANABE, H.; MAMELAKA A.J.; FREED, I.; WANG, B.; SAUDER, D.N. Microarray profiles of human basal cell carcinoma: Insights into tumor growth and behavior. **J. Dermatol. Sc.**, Japan, v. 39, p. 39-51, 2005.

HUMPHREYS, T. R. Skin cancer: recognition and management. **Clin. Cornerstone**, Bridgewater, v.4, n.1, p.23-32. 2001.

IBBOTSON, S.H.; MOSELEY, H.; BRANCALEON, L.; PADGETT, M.; O'DWYER, M.; WOODS, J.A.; LESAR, A.; GOODMAN, C.; FERGUSON, J. Photodynamic therapy in dermatology: Dundee clinical and research experience. **Photodiagn. Photodyn. Ther.**, Netherlands, v. 1, p. 211-223, 2004.

IDOWU, M.; NYOKONG, T. Photophysical and photochemical properties of zinc and aluminum phthalocyanines in the presence of magnetic fluid. **J. Photochem. Photobiol. A Chem.**, Switzerland, v. 188, p. 200-206, 2007.

IMBERG, A., EVERTSSON H., STILBS P., KRIECHBAUM, M., ENGSTROM S. On the self-assembly of monoolein in mixtures of water and a polar aprotic solvent. **J. Phys. Chem. B.**, United States, v. 109, p. 2311-2318, 2003.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER - MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Estimativa 2010: Incidência de câncer no Brasil**. Disponível em <<http://www.inca.gov.br>>. Acesso em: janeiro de 2010.

JUZENAS, P., SORENSEN, R., IANI, V., MOAN, J. Uptake of topically applied 5 aminolevulinic acid and production of protoporphyrin IX in normal mouse skin: dependence on skin temperature. **Photochem. Photobiol.**, Oxford, v. 69, p. 478-481, 1999.

KASSAB, K.; FABRIS, C.; DEFILIPPIS, M.P.; DEI, D.; FANTETTI, L.; RONCUCCI, G.; REDDI, E.; JORI, G. Skin-photosensitizing properties of Zn(II)-2(3), 9(10), 16(17), 23(24)-tetrakis-(4-oxy-N-methylpiperidiny) phthalocyanine topically administered to mice. **J. Photochem. Photobiol. B., Switzerland**, v. 55, p.128-137, 2000.

KENNEDY, J. C.; POTTIER, R. H.; PROSS, D. C., Photodynamic therapy with endogenous protoporphyrin IX: basic principles and present clinical experience, **J. Photochem. Photobiol. B: Biol.**, Switzerland, v. 6, p. 143-148, 1990.

KENNEDY, J. C., POTTIER, R. H., Endogenous protoporphyrin IX, a clinically useful photosensitizer for photodynamic therapy, **J. Photochem. Photobiol. B: Biol.**, Switzerland, v. 14, p. 275-292, 1992.

KIM, D.D., KIM, J.L., CHIEN, Y.W. Mutual hairless rat skin permeation-enhancing effect of ethanol/water system and oleic acid. **J. Pharm. Sci.**, United States, v. 85, p. 1191-1195, 1996.

KIM, S.H.; HAIMOVICH-CASPI, L.; OMER, L.; YU, C.; TALMON, Y.; WANG, N.L.; FRANCES, E.I. Stability and state of aggregation of aqueous fibrinogen and dipalmitoylphosphatidylcholine lipid vesicles. **Langmuir**, United States, v. 23, p. 5657-5664, 2007.

KORMEILI, T., YAMAUCHI, P.S., LOWE, J. Topical photodynamic therapy in clinical dermatology. **Br. J. Dermatol.**, England, v. 150, p. 1061-1069, 2004.

KRAMMER, B.; UBERRIEGLER, K. *In vitro* investigation of ALA-induced protoporphyrin IX. **J. Photochem. Photobiol. B, Biol.**, Switzerland, v. 36, p. 121-126, 1996.

KUGEL, R., SVIRMICKAS, A., KATZ, J.J., HINDMAN, J.C. Laser properties of some phthalocyanines. **Opt. Commun.**, Netherlands, v. 23, p. 189-193, 1977.

KYRIAZI, M., ALEXANDRATOU, E., YOVA, D., RALLIS, M., TREBST, T. Topical photodynamic therapy of murine non-melanoma skin carcinomas with aluminum phthalocyanine chloride and a diode laser: pharmacokinetics, tumor response and cosmetic outcomes. **Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.**, Denmark, v. 24, p. 87-94, 2008.

LARA, M.G., BENTLEY, M.V.L.B., COLLETT, J.H. *In vitro* drug release mechanism and drug loading studies of cubic phase gels. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 293, p. 241-250, 2005.

LARSSON, K. Aqueous dispersions of cubic lipid-water phases. **Curr. Opinion Colloid Interf. Sci.**, Amsterdam, v. 5, p. 64-69, 2000.

LARSSON, K. Lyotropic liquid crystals and their dispersions relevant in foods. **Curr. Opin. Colloid Interf. Sci.**, Amsterdam, v. 14, p. 16-20, 2009.

LAUTH, M.; UNDEN, A.B.; TOFTGARD, R. Non-melanoma skin cancer: pathogenesis and mechanisms. **Drug Discov. Today**, England, v. 1, n. 2, p. 267-272, 2004.

LEE, J.; KELLAWAY, I.W. Combined effect of oleic acid and polyethylene glycol 200 on buccal permeation of [D-Ala², D-Leu⁵]enkephalin from a cubic phase of glyceryl monooleate. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 204, p. 137-144, 2000a.

LEE, J.; KELLAWAY, I.W. Buccal permeation of [D-Ala², D-Leu⁵]enkephalin from liquid crystalline phases of glyceryl monooleate. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 195, p. 35-384, 2000b.

LI, X.Y.; HE, X.; ANTHONY, C.H.; WU, C.; DENNIS, K.P. Influence of surfactants on the aggregation behaviour of water-soluble dendritic phthalocyanines. **Macromolecules**, Washington, v. 33, p. 2119-2123, 2000.

LIBSTER, D., ASERIN, A., WACHTEL, E., SHOHAM, G., GARTI, N. An H_{II} liquid crystal-based delivery system for cyclosporin A: Physical characterization. **J. Colloid Interface Sci.**, United States, v. 308, p. 514-524, 2007.

LIBSTER, D., ASERIN, A., YARIV, D., SHOHAM, G., GARTI, N. Soft matter dispersions with ordered inner structures, stabilized by ethoxylated Phytosterols. **Colloids Surf. B Biointerfaces**, Netherlands, v. 74, p. 202-215, 2009.

LILGE, L., O'CARROLL, C., WILSON, B.C. A solubilization technique for photosensitizer quantification in *ex vivo* tissue samples. **J. Photochem. Photobiol. B: Biol.**, Switzerland, v. 39, p. 229-235, 1997.

LIU, H., LI, S., WANG, Y., YAO, H., ZHANG, Y. Effect of vehicles and enhancers on the topical delivery of cyclosporin A. **Int. J. Pharm.**, Netherlands, v. 311, p. 182–186, 2006.

LIU, W., JENSEN, T.J., FRONCZEK, F.R., HAMMER, R.P., SMITH, K.M., VICENTE, M.G.H. Synthesis and cellular studies of nonaggregated water-soluble phthalocyanines. **J. Med. Chem.**, Washington, v. 48, p. 1033-1041, 2005.

LOPES, L.B. **Estratégias para o aumento da penetração cutânea de fármacos peptídicos: avaliação *in vitro* e *in vivo* de sistemas de liberação e moléculas carreadores.** 2005. 179 f. Tese (doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 2005)

LOPES, L.B., FERREIRA, D.A., DE PAULA, GARCIA, M.T., THOMAZINI, J.A., FANTINI, M.C., BENTLEY, M.V.L.B. Reverse hexagonal phase nanodispersion of monoolein and oleic acid for topical delivery of peptides: *in vitro* and *in vivo* skin penetration of cyclosporin A. **Pharm. Res.** Washington, v. 23, p. 1332–1342, 2006.

LOPES, L.B.; SPERETTA, F.F.F.; BENTLEY, M.V.L.B. Enhancement of skin penetration of vitamin K using monoolein-based liquid crystalline systems. **Eur. J. Pharm. Sci.**, Amsterdam, v. 32, p. 209–215, 2007.

LOPEZ, R.F.V.; BENTLEY, M.V.L.B.; DELGADO-CHARRO, M.B.; GUY, R.H. Optimization of aminolevulinic acid (ALA) delivery by iontophoresis. **J. Control. Release**, Netherlands, v. 88, p.65-70, 2003.

LOPEZ, R.F.V.; LANGE, N.; GUY, R.H.; BENTLEY, M.V.L.B. Photodynamic Therapy of Skin Cancer: Controlled Drug Delivery of 5-ALA and Its Esters. **Adv. Drug Del. Rev.**, Netherlands, v. 56, p. 77-94, 2004.

LOVE, G.W., DUK, S., BIOLO, R., JORI, G., TAYLOR, P.W. Liposome-mediated delivery of photosensitizers: Location of Zinc(II)-phthalocyanine within implanted tumours after intravenous administration. **Photochem. Photobiol.**, Oxford, v. 63, n° 5, p. 656-661, 1996.

LOVE, W.G., ZANDEN, B.C., TAYLOR, P.W. Formulation of a zinc (II) phthalocyanine containing topical gel for photodynamic therapy of hiperproliferative skin conditions. **Drug Dev. Ind. Pharm.**, New York, v. 23, n. 7, p. 705-710, 1997.

MACCORMACK, M.A. Photodynamic Therapy in Dermatology: An Update on Applications and Outcomes. **Semin. Cutan. Med. Surg.**, United States, v. 27, p. 52-62, 2008.

MANNE, S.; FASANELLA, N.; CONNORS, J.; FLOYD, B.; WAN, H.; LESSIN, S. Sun protection and skin surveillance practices among relatives of patients with malignant melanoma: prevalence and predictors. **Prev. Med.**, New York, v. 39, p. 36–47, 2004.

MARDER, S.R., ARMITAGE, B., YANG, D. Cubic liquid-crystalline nanoparticles. **Angew Chem. Int. Ed. Engl.**, Germany, v. 43, p. 4402-4409, 2004.

MENON, G. New insights into skin structure: scratching the surface. **Adv. Drug Del. Rev.**, Netherlands, v. 54(1), p. S3–S17, 2002.

MERCLIN, N., BENDER, J., SPARR, E., GUY, R.H., EHRSSON, H., ENGSTROM, S. Transdermal delivery from a lipid sponge phase-iontophoretic and passive transport *in vitro* of 5-aminolevulinic acid and its methyl ester. **J. Control. Release**, Netherlands, v. 100, p. 191-198, 2004.

MILLER, J.D., BARON, E.D., SCULL, H., HIA, A., BERLIN, J.C., MCCORMICK, T., COLUSSI, V., KENNEY, M.E., COOPER, K.D., OLEINICK, N.L. Photodynamic therapy with the phthalocyanine photosensitizer Pc 4: The case experience with preclinical mechanistic and early clinical–translational studies. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, United States, v. 224, p. 290–299, 2007.

MITRAGOTRI, S. Modeling skin permeability to hydrophilic and hydrophobic solutes based on four permeation pathways. **J. Control. Release**, Netherlands, v.86, p. 69–92, 2003.

MOSER, K., KRIWET, K., NAIK, A., KALIA, Y.N., GUY, R.H. Passive skin penetration enhancement and its quantification *in vitro*. **Eur. J. Pharm. Sci.**, Netherlands, v. 52, p. 103-112, 2001.

MURA, S., MANCONIA, M., SINICO, C., VALENTIA, D., FADDA, A.M. Penetration enhancer-containing vesicles (PEVs) as carriers for cutaneous delivery of minoxidil. **Int. J. Pharm.**, Netherlands, v. 380, p. 72–79, 2009.

NANAYAKKARA, G.R., BARTLETT, A., FORBES, B., MARRIOTT, C., WHITFIELD, P.J., BROWN, M.B. The effect of unsaturated fatty acids in benzyl alcohol on the percutaneous permeation of three model penetrants. **Int. J. Pharm.**, Netherlands, v. 301, p. 129–139, 2005.

NORLING, T., ENGSTROM, L.P., LARSSON, K., KROG, N., NISSEN, S.S. Formulation of a drug delivery system based on a mixture of monoglycerides and tryglicerides for use in the treatment of periodontal disease. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v. 19, p. 687-692, 1992.

NUNES, S.M.T., SGUILLA, F.S., TEDESCO, A.C. Photophysical studies of zinc phthalocyanine and chloroaluminum phthalocyanine incorporated into liposomes in the presence of additives. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, Brazil, v. 37, p. 273-284, 2004.

ORTEL, B.; CALZAVARA-PINTON, P.G.; SZEIMIES, R.M.; HASAN, T. Perspectives in cutaneous photodynamic sensitization. **J. Photochem. Photobiol. B: Biol.**, Switzerland, v. 36, p. 209-211, 1996.

OSCHNER, M. Photodynamic therapy: the clinical perspective. Review on applications for control of diverse tumorous diseases. **Arzneimittelforschung**, Aulendorf, v. 47, n. 11, p. 1185-94, 1997a.

OSCHNER, M. Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumours. **J. Photochem. Photobiol. B: Biol.**, Switzerland, v. 39, p. 1-18, 1997b.

ODA, K., OGURA, S., OKURA, I. Preparation of water-soluble zinc phthalocyanine and its effect for photodynamic therapy. **J. Photochem. Photobiol. B: Biol.**, Switzerland, v. 59, p. 20-25, 2000.

OGISO, T., IWAKI, M., PAKU, T. Effects of various enhancers on transdermal penetration of indomethacin and urea, and relationship between penetration parameters and enhancement factors. **J. Pharm. Sci.**, United States, v. 84, p.482-488, 1995.

OZOEMENA, K., KUZNETSOVA, N., NYOKONG, T. Photosensitized transformation of 4-chlorophenol in the presence of aggregated and non-aggregated metallophthalocyanines. **J. Photochem. Photobiol. A: Chem.**, Amsterdam, v. 139, p. 217-224, 2001.

OWENS, J.W.; SMITH, R.; ROBINSON, R.; ROBINS, R. Photophysical properties of porphyrins, phthalocyanines and benzochlorins. **Inorganica Chim. Acta, Switzerland**, v. 279, p. 226-231, 1998.

PENG, Q.; WARLOE, T.; MOAN, J.; HEYERDAHL, H.; STEEN, H.B.; NESLAND, J.M.; GIERCKSKY, K.E. Distribution of 5aminolevulinic acid-induced porphyrins in noduloucerative basal cell carcinoma. **Photochem. Photobiol.**, Oxford, v. 62, p. 906-913, 1995.

PIERRE, M.B.R., RICCI, E.J., TEDESCO, A.C., M.V.L.B.B. Oleic acid as optimizer of the skin delivery of 5-aminolevulinic acid in photodynamic therapy. **Pharm. Res.**, Washington, v. 23, p. 360-366. 2006.

POTTS, R.O., GUY, R.H. Predicting skin permeability. **Pharm. Res.**, Washington, v. 9, 663-669, 1992.

Programa KowWin versão Demo. Disponível em: < www.syrres.com >. Acesso em: 26/04/2009.

ROSENTHAL, I.; BEM-HUR, E. Phthalocyanines in Photobiology. In: LEZNOFF, C.C.; LEVER, A.B.P. **Phthalocyanines Properties an Applications**. New York: VCH, 1989. chapter 6, p. 393-425.

ROSENTHAL, I. Phthalocyanines as photodynamic sensitizers. **Photochem. Photobiol.**, v. 53, p. 859-870, 1991.

SARTORELLI, P., ANDERSEN H.R., ANGERER, J., CORISH J., DREXLER, H., GOEN, T., GRIFFIN, P., HOTCHKISS, S.A.M., LARESE, F., MONTOMOLI, L., PERKINS, J., SCHMELZ, M., VAN DE SANDT, J., WILLIAMS, F. Percutaneous penetration studies for risk assessment. **Enviroment Toxicol. Pharmacol.**, Amsterdam, v.8, p. 133-152, 2000.

SCHEUPLEIN, R.J., BLANK, I.H. Permeability of the skin. **Physiol. Rev.**, Bethesda, v. 51, p. 702-747, 1971.

SCHOMOOK, F.P.; MEINGASSNER, J.G.; BILLICH, A. Comparison of human skin or epidermis models with humana skin and animal skin in vitro percutaneous absorption. **Int. J. Pharm.**, Amsterdan, v. 215, p. 51-56, 2001.

SCOLARO, L.M., CASTRICIANO, M., ROMEO, A., PATANÈ, S., CEFALI, E., ALLEGRIANI, M. Aggregation behavior os photoporphyrin IX in aqueous solutions: clear evidence of vesicle formation. **J. Phys. Chem. B.**, United States, v. 106, p. 2453-2459, 2002.

SCULLY, A.D.; OSTLER, R.B.; MACROBERT, A.J.; PARKER, A.W.; DE LARA, C.; O'NEILL, P.; PHILLIPS, D. Laser line-scanning confocal fluorescence imaging of the photodynamic action of aluminium and zinc phthalocyanines in V79-4 chinese hamster fibroblasts. **Photochem. Photobiol.**, United States, Oxford, v. 68, n. 2, p. 199-204, 1998.

SESSLER, J.L., JAYAWICKRAMARAJAH, J., GOULOUMIS, A., PANTOS, G.D., TORRES, T., GULDI, D.M. Guanosine and fullerene derived de-aggregation of a new

phthalocyanine-linked cytidine derivative. **Tetrahedron**, England, v. 62, p. 2123-2131, 2006.

SHAH, V.E., MIDHA, K.K., DIGHE, S., MCGILVERY, L.J., SKELLY, J.E., YACOBI, A., LAYOFF, T., VISWANATHAN, C.T., COOK, C.E., MCDOWALL, R.D., PITMAN, K.A., SPECTOR, S. Analytical methods validation: bioavailability, bioequivalence and pharmacokinetic studies. **Pharm. Res.**, Washington, v. 9, p 588, 1992.

SHAH, J.C.; SADHALE, Y.; CHILUKURI, D.M. Cubic phase gels as drug delivery systems. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, Netherlands, v. 47, p. 229–250, 2001.

SHARMAN, W.M., VAN LIER, J.E., ALLEN, C.M. Targeted photodynamic therapy via receptor mediated delivery systems. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, Netherlands, v. 56, p. 53–76, 2004.

SHELTON, R.M. Skin cancer: a review and atlas for the medical provider. **Mt. Sinai J. Med.**, New York, v.68, n.4-5, p.243-52, 2001.

SIBATA, M.N., TEDESCO, A.C., MARCHETTI, J.M. Photophysicals and photochemicals studies of Zn(II)phthalocyanine in long time circulation micelles for photodynamic therapy use. **Eur. J. Pharm. Sci.**, Amsterdam, v. 23, p. 131-138, 2004.

SIEKMANN, B., BUNJES, H., KOCH, M.H.J., WETSEN, K. Preparation and structural investigation of colloidal dispersions prepared from cubic monoglycerides-water phases. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 54, p. 56-68, 2002.

SMITH, E.W., MAIBACH, W.I. **Percutaneous Penetration Enhancers**, 2^o ed., CRC Press, New York, 1995.

SINGH, S. Phase transitions in liquid crystals. **Phys. Reports**, Amsterdam, v. 324, p. 107-269, 2000.

SIVASH, A.A., MASINOVSKY, Z., LOZOVAYA, G.I. Surfactant micelles containing protoporphyrin IX as models of primitive photocatalytic systems: a spectral study. **BioSystems**, Ireland, v. 25, p. 131-140, 1991.

SPICER, P.T., HAYDEN, K.L. Novel process for producing cubic liquid crystalline nanoparticles (Cubosomes). **Langmuir**, United States, v. 17, p. 5748-5756, 2001.

SPIKES, J.D., Phthalocyanines as photosensitizers in biological systems and for the photodynamic therapy of tumours. **Photochem. Photobiol.**, United States, v.43, p. 691-699, 1986.

SPIKES, J.D.; VAN LIER, J.E.; BOMMER, J.C. A comparison of the photoproperties os zinc phthalocyanine and zinc naphthalocyanine tetrasulfonates: model sensitizers for the photodynamic therapy of tumors. **J. Photochem. Photobiol. A: Chem., Switzerland**, v. 91, p. 193-198, 1995.

STELUTI, R., DE ROSA, F.S., COLLETT, J., TEDESCO, A.C., BENTLEY. M.V.L.B. Topical glycerol monooleate/propylene glycol formulations enhance 5-aminolevulinic acid *in vitro* skin delivery and *in vivo* protophorphyrin IX accumulation in hairless mouse skin. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, Netherlands, v. 60, p. 439-444, 2005.

STENDER, I.M.; WULF, H.C. Photodynamic therapy with 5aminolevulinic acid in the treatment of actinic cheilitis. **Br. J. Dermatol.**, Oxford, v. 135, p. 454-456, 1996.

STERNBERG, E.D., DOLPHIN, D., BRUCKNER, C. Porphyrin-based photosentitizers for use in photodynamic therapy. **Tetrahedron**, England, v. 54, p. 4151-202, 1998.

SUHONEN, T.M., BOUWSTRA, J.A., URTTI, A. Chemical enhancement of percutaneous absorption in relation to stratum corneum structural alterations. **J. Control. Release**, Amsterdam, v. 59, p. 149-161, 1999.

SVAASAND, L., TROMBERG, B., WYSS-DESSERICH, M., TADIR, Y., BERNS, M. Light and drug distribution with topically administered photosensitizers. **Lasers Med. Sci.**, England, v. 11, p. 261-264, 1996.

SZEIMIES, R.M.; KARRER, S.A. Photodynamic therapy with topical application of 5-aminolevulinic acid in the treatment of actinic keratoses: an initial clinical study. **Dermatology**, Switzerland, v. 192, p. 146-251, 1996.

TURCHIELLO, R.F.; VENA, F.C.B.; MAILLARD, P.H.; SOUZA, C.S.; BENTLEY, M.V.L.B.; TEDESCO, A.C. Cubic phase gel as a drug delivery system for topical application of 5-ALA, its ester derivatives and m-THPC in photodynamic therapy (PDT). **J. Photochem. Photobiol. B: Biol.**, Switzerland, v. 70, n. 1, p.1-6, 2003.

TYLE, P. Liquid Crystals and their applications in drug delivery. In: ROSOFF, M. **Controlled release of drugs: Polymer and aggregate systems**. New York: VCH Publishers, 1989. chapter 4, p. 125-162.

UM, J.Y.; CHUNGA, H.; KIMB, K.S.; KWON, I.C.; JEONG, S.Y. In vitro cellular interaction and absorption of dispersed cubic particles. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 253, p. 71–80, 2003.

VALDUGA, G.; REDDI E.; JORI, G. Spectroscopic studies on Zn(II)-phthalocyanine in homogeneous and microheterogeneous systems. **J. Inorg. Biochem.**, New York, v. 29, p. 59-65, 1987.

VALDUGA, G.; REDDI, E.; GARBISA, S.; JORI, G. Photosensitization of cells with different metastatic potentials by liposome-delivered Zn(II)-Phthalocyanine. **Int. J. Cancer**, New York, v. 75, p. 412-417, 1998.

VISONÀ, A., ANGELINI, A., GOBBO, S., BONANOME, A., THIENE, G., PAGNAN, A., TONELLO, D., BONANDINI. E., JORI. G. **Photochem. Photobiol. B: Biol.**, Switzerland, v. 57, p. 94-101, 2000.

WAINWRIGHT, M. Photodynamic therapy: the development of new photosensitisers. **Anticancer Agents Med. Chem.**, Netherlands, v. 8, p. 280-291, 2008.

WENBERG, A.M.; LINDHOLM, L. E.; ALPSTEN, M.; LARKO, O. Treatment of superficial basal cell carcinomas using topically applied delta-aminolevulinic acid and a filtered xenon lamp. **Arch. Dermatol. Res.**, Berlin, v. 288, p. 561-564, 1996.

WHITLOCK, J.B., BIRD, G.R., COX, M.D., PANAYOTATOS, P. Hydration of chloroaluminum phthalocyanine. **Thin Solid Films**, Netherlands, v. 215, p. 84-87, 1992.

WILLIAMS, A.C., BARRY, B.W. Penetration enhancers. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, Netherlands, v. 56, p. 603– 618, 2004.

WONG, T.W.; AIZAWA, K.; SHEYHEDIN, I.; WUSHUR, C.; KATO, H. Pilot study of topical delivery of mono-l-aspartyl chlorine e6 (NPe6): Implication of topical NPe6-photodynamic therapy. **J. Pharmacol. Sci.**, Japan, v. 93, p. 136-142, 2003.

YAGHMUR, A., GLATTER, O. Characterization and potencial applications of nanostructured aqueous dispersions. **Adv Colloid Interface Sci**, Netherlands, v. 147, p. 333-342, 2009.

ZEITOUNI, N.C.; OSEROFF, A.R.; SHIEH, S. Photodynamic Therapy for nonmelanoma skin cancers. Current review and update. **Mol. Immunol.**, Oxford, v. 39, p. 1133-1136, 2003.