



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM
CURSO DE GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

ALICE VITORIA FROTA REIS

**LIPOSSOMAS CONTENDO ÁCIDO OLEICO E CLORO-ALUMÍNIO
FTALOCIANINA: DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO
DE SUA PENETRAÇÃO CUTÂNEA *IN VITRO* ASSOCIADA AO
MICROAGULHAMENTO**

FORTALEZA

2022

ALICE VITORIA FROTA REIS

LIPOSSOMAS CONTENDO ÁCIDO OLEICO E CLORO-ALUMÍNIO FTALOCIANINA:
DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DE SUA PENETRAÇÃO
CUTÂNEA *IN VITRO* ASSOCIADA AO MICROAGULHAMENTO

Monografia apresentada ao Curso de Farmácia
do Departamento de Farmácia da Universidade
Federal do Ceará, como requisito parcial para
obtenção do título de bacharel em Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Josimar de Oliveira Eloy

Coorientador(a): Prof. Dra. Raquel Petrilli Eloy

FORTALEZA

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- R2981 Reis, Alice Vitoria Frota.
LIPOSSOMAS CONTENDO ÁCIDO OLEICO E CLORO-ALUMÍNIO FTALOCIANINA:
DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DE SUA PENETRAÇÃO CUTÂNEA IN
VITRO ASSOCIADA AO MICROAGULHAMENTO / Alice Vitoria Frota Reis. – 2022.
104 f. : il. color.
- Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia,
Odontologia e Enfermagem, Curso de Farmácia, Fortaleza, 2022.
Orientação: Prof. Dr. Josimar de Oliveira Eloy.
Coorientação: Prof. Dr. Raquel Petrilli Eloy.
1. AICIPc. 2. Lipossomas. 3. Ácido oleico. 4. Microagulhamento. 5. Box-Benhken design. I. Título.
CDD 615
-

ALICE VITORIA FROTA REIS

LIPOSSOMAS CONTENDO ÁCIDO OLEICO E CLORO-ALUMÍNIO FTALOCIANINA:
DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DE SUA PENETRAÇÃO
CUTÂNEA *IN VITRO* ASSOCIADA AO MICROAGULHAMENTO

Monografia apresentada ao Curso de Farmácia
do Departamento de Farmácia da Universidade
Federal do Ceará, como requisito parcial para
obtenção do título de bacharel em Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Josimar de Oliveira Eloy

Coorientador(a): Prof. Dra. Raquel Petrilli

Aprovada em: __ / __ / __.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Raquel Petrilli (Coorientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dra. Cristiani Lopes C. G. de Oliveira
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Érika Sabóia Diógenes Pessoa
Universidade Federal do Ceará (UFC)

AGRADECIMENTOS

Certa vez ouvi uma frase que dizia que, em alguns momentos de nossas vidas, é preciso ter coragem para pular e fé para confiar que haverá uma rede para nos amparar na queda. À esta altura, nenhum período foi tão desafiador, pessoal e profissionalmente, e nem me exigiu tanta bravura quanto a minha graduação. Por isso, gostaria de agradecer verdadeiramente àqueles que, ao longo dos últimos anos, foram a minha rede.

À Deus, por ter trazido conforto e coragem ao meu coração, mesmo quando eu não soube pedir ou quando eu não mereci, e por ter estado ao meu lado a cada passo.

À minha mãe e minha irmã, a quem, por mais que eu tente, nunca conseguirei agradecer o suficiente por todo o amor, acolhimento e apoio. Vocês são o meu lar, minha força e minha fortaleza, e por isso eu sei que sempre terei para onde voltar. Seremos *nós três*, para sempre.

À minha família, a quem eu devo minhas raízes e meus valores. Em especial, à minha avó que, se ainda estivesse aqui, certamente estaria fazendo uma promessa à Deus para que tudo corresse bem em minha apresentação, mas que agora sei que me guardará pessoalmente a todo instante.

Aos meus orientadores, Josimar Eloy e Raquel Petrilli, por toda a confiança que depositaram em mim ao longo dos últimos quase quatro anos, e por ela sempre ter sido acompanhada de apoio, compreensão e reconhecimento, que foram fundamentais para o meu crescimento pessoal e profissional. O amor de vocês pelo que fazem nos estimula diariamente a darmos também o melhor de nós.

Ao CEDEFAR, ao meu grupo de pesquisa, GPNano, e a todos aqueles que o integram. Obrigada por provarem que o ambiente da pesquisa pode ser colaborativo e acolhedor. Em especial, à Márcia, que tanto admiro, por todo o suporte e aconselhamento dentro e fora da bancada.

À Karina, ao lado de quem eu trabalhei neste projeto nos últimos anos e com quem eu tanto aprendi. O seu comprometimento e dedicação foram fontes constantes de inspiração.

À Universidade Federal do Ceará, e todos os seus colaboradores. Para a maioria de nós, assim como para mim, a Universidade foi o primeiro ambiente no qual fomos confrontados com realidades que fogem de nossa bolha, onde passados a ser vistos e cobrados como adultos e onde solidificamos nossas visões do mundo e de nós mesmos. Por ter tido essa oportunidade, sou imensamente grata.

Aos meus amigos Lucas, Renan, Jojô, Genu, Carol, Thais, Livia, Matheus e Mac. Vocês caminharam ao meu lado em algum momento ao longo desse período doido. Trouxeram leveza e alegria, cada um à sua maneira, aos momentos difíceis, e foram as primeiras pessoas com quem eu quis dividir os momentos de celebração.

Às integrantes da minha banca examinadora, inteiramente feminina, Érika, Professora Cristiani e Professora Raquel. Agradeço verdadeiramente por aceitarem fazer parte desse momento tão marcante para mim e, de forma antecipada, pelas contribuições valiosas que estou certa de que farão a este trabalho.

Ao CNPq, pela oportunidade de bolsa e fomento ao projeto de pesquisa, processo 409352/2018-7, e ao Professor Antônio Cláudio Tedesco pelas contribuições valiosas à metodologia analítica.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a minha formação e para o desenvolvimento deste trabalho.

RESUMO

A cloro-alumínio ftalocianina (AlClPc) pertence à segunda geração de fotossensibilizadores (FS) aplicáveis à terapia fotodinâmica (TFD) do câncer de pele devido ao seu alto coeficiente de absorção na janela terapêutica do espectro de luz (600-800nm) junto à longa vida útil dos seus estados singlete e tripleto excitados. No entanto, sua administração direta é impossibilitada pela alta hidrofobicidade e tendência à auto agregação em meio aquoso da molécula. Desse modo, a encapsulação do FS em lipossomas bem como o uso de promotores químicos e/ou físicos de absorção podem representar estratégias para a viabilização e otimização de sua penetração cutânea. O objetivo deste estudo foi desenvolver lipossomas à base de fosfatidilcolina de soja e colesterol contendo ácido oleico (AO) para a veiculação da AlClPc, bem como avaliar sua penetração cutânea associada ao microagulhamento. Para a otimização da formulação desenvolvida, empregou-se a estratégia de *quality by design* através de Box-benhken, com três fatores e três níveis. Como variáveis independentes, foram adotadas o tamanho de partícula, a eficiência de encapsulação e o índice de polidispersão (PdI) dos lipossomas. Para os ensaios de penetração cutânea *in vitro*, utilizou-se pele *full thickness* de orelhas de suínos recém abatidos e *roller de* microagulhas sólidas de titânio de 0,25mm de comprimento. Os lipossomas desenvolvidos apresentaram tamanho de partícula, eficiência de encapsulação, PdI e potencial zeta médios de $153,20 \pm 13,39$ nm, $69,09 \pm 3,31\%$, $0,309 \pm 0,03$ e $-15,24$ mV, respectivamente. A análise morfológica revelou vesículas em formato esférico ou quase esférico, enquanto as análises por DSC e FTIR sugeriram que o fármaco foi adequadamente incorporado à bicamada lipídica dos lipossomas, em seu estado amorfo ou molecularmente disperso. Os ensaios de penetração cutânea *in vitro* revelaram que a AlClPc não apresenta absorção transdérmica, permanecendo retida às camadas epidérmica e dérmica, onde geralmente se encontram os tumores de pele. A encapsulação do fármaco em lipossomas contendo AO aumentou em ~20 e 8 vezes sua penetração no estrato córneo e na epiderme viável + derme, respectivamente ($p < 0,05$). O microagulhamento promoveu um aumento adicional de 1,3 vezes no transporte do fármaco às camadas viáveis da pele ($p < 0,05$). Isto posto, o design estatístico Box-Benhken foi bem-sucedido no fornecimento de uma formulação lipossomal otimizada. Ademais, os resultados obtidos neste estudo sugerem que a encapsulação da AlClPc em lipossomas associada à promotores químicos e físicos de absorção é uma estratégia promissora para a terapia fotodinâmica do câncer de pele.

Palavras-chave: AlClPc; lipossomas; ácido oleico; microagulhamento; Box-Benhken design.

ABSTRACT

Chloro-aluminum phthalocyanine (AlClPc) belongs to the second generation of photosensitizers (FS) applicable to photodynamic therapy (PDT) of skin cancer due to its high absorption coefficient in the therapeutic window of the light spectrum (600-800nm) along with the long lifetime of their excited singlet and triplet states. However, its direct administration is impossible due to the molecule's high hydrophobicity and tendency to self-aggregate in an aqueous medium. Thus, the encapsulation of FS in liposomes as well as the use of chemical and/or physical absorption promoters may represent strategies for the feasibility and optimization of its cutaneous penetration. The objective of this study was to develop liposomes based on soy phosphatidylcholine and cholesterol containing oleic acid (OA) for the delivery of AlClPc, as well as to evaluate its cutaneous penetration associated with microneedling. For the optimization of the developed formulation, the strategy of quality by design was used through Box-benhken, with three factors and three levels. As independent variables, the particle size, the encapsulation efficiency and the polydispersity index (PdI) of the liposomes were adopted. For the *in vitro* skin penetration tests, full thickness skin of the ears of recently slaughtered pigs and a roller with solid titanium microneedles of 0.25 mm in length were used. The developed liposomes showed particle size, encapsulation efficiency, PdI and mean zeta potential of 153.20 ± 13.39 nm, $69.09 \pm 3.31\%$, 0.309 ± 0.03 and -15.24 mV, respectively. Morphological analysis revealed spherical or nearly spherical vesicles, while DSC and FTIR analyzes suggested that the drug was adequately incorporated into the lipid bilayer of liposomes, in its amorphous or molecularly dispersed state. *In vitro* skin penetration tests revealed that AlClPc does not show transdermal absorption, remaining retained in the epidermal and dermal layers, where skin tumors are usually found. The drug encapsulation in AO-containing liposomes increased its penetration in the stratum corneum and in the viable epidermis + dermis by ~20 and 8-fold, respectively ($p < 0.05$). Microneedling promoted an additional 1.3-fold increase in drug transport to viable skin layers ($p < 0.05$). That said, the Box-Benhken statistical design was successful in providing an optimized liposomal formulation. Furthermore, the results obtained in this study suggest that the encapsulation of AlClPc in liposomes associated with chemical and physical absorption promoters is a promising strategy for the photodynamic therapy of skin cancer.

Keywords: AlClPc; liposomes; oleic acid; microneedling; Box-Behnken design.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Representação esquemática da estrutura da pele.	18
Figura 2. Carcinoma de células escamosas na forma de nódulo ulcerado no dorso da mão.	21
Figura 3. Ilustração esquemática do mecanismo da terapia fotodinâmica (TDF).	23
Figura 4. Esquema representativo da profundidade de penetração efetiva da luz de acordo com o comprimento de onda adotado.	24
Figura 5. Estrutura química geral de um derivado metálico de ftalocianina.	29
Figura 6. Estrutura química da cloro-alumínio ftalocianina (AlClPc).	30
Figura 7. Rotas de penetração e permeação cutânea de moléculas.	32
Figura 8. Principais tipos de nanocarreadores empregados como sistemas de liberação de fármacos.	34
Figura 9. Lipossoma em corte transversal, com as porções hidrofílicas dos fosfolipídios em verde, e porções hidrofóbicas em amarelo.	36
Figura 10. Estruturas químicas do SPC (A), DSPE-PEG ₂₀₀₀ (B), ácido oleico (C), colesterol (D).	37
Figura 11. Dispositivos utilizados para o microagulhamento da pele, (a) patch e (b) dermaroller.	40
Figura 12. Estrutura química tridimensional do ácido oleico em sua conformação cis.	43
Figura 13. Design Box-Behnken para três fatores em três níveis representando por um cubo (a) ou como três designs fatoriais 2 ² interligados (b).	47
Figura 14. Método de hidratação do filme lipídico empregado para o preparo de lipossomas contendo AlClPc.	52
Figura 15. Princípio da técnica de espalhamento dinâmico de luz no equipamento Zetasizer Nano.	53
Figura 16. Procedimento do ensaio de determinação da eficiência de encapsulação de AlClPc.	56
Figura 17. Representação esquemática da metodologia adotada para o ensaio de penetração cutânea. PBS: Tampão fosfato pH 7,4.	57

Figura 18. Curva de calibração para a cloro-alumínio ftalocianina em DMSO obtida em espectrofluorímetro ($\lambda_{ex} = 615 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 635 - 750\text{nm}$).	65
Figura 19. Gráficos de contorno (acima) e superfície de resposta (abaixo) para o efeito das variáveis independentes sobre o tamanho de partícula dos lipossomas (Y_1).	70
Figura 20. Gráficos de contorno (acima) e superfície de resposta (abaixo) para o efeito das variáveis independentes sobre a eficiência de encapsulação dos lipossomas (Y_2).....	71
Figura 21. Gráficos de contorno (acima) e superfície de resposta (abaixo) para o efeito das variáveis independentes sobre o índice de polidispersividade (Y_3)	72
Figura 22. Gráficos de resíduos para tamanho de partícula (Y_1)......	74
Figura 23. Gráficos de resíduos para eficiência de encapsulação (Y_2)......	74
Figura 24. Gráficos de resíduos para índice de polidispersividade (Y_3).....	75
Figura 25. Otimização obtida por planejamento fatorial para lipossomas contendo AlClPc. Quantidades de ácido oleico (C1), AlClPc (C2) e colesterol (C3) indicadas para a obtenção de mínimos tamanho de partícula (C4) e PDI (C7), e máxima EE% (C5).....	76
Figura 26. Microscopia de Força Atômica (MFA) da amostra LP-ideal: imagem 3D – $10 \times 10 \mu\text{m}$ (A), imagem 2D – $10 \times 10 \mu\text{m}$ (B), imagem 2D – $2 \times 2 \mu\text{m}$ (C). Imagens com resolução de 512 pixels.	78
Figura 27. Tamanho médio do lipossoma ideal (LP – Ideal), em que barras expressam tamanho máximo e mínimo obtidos.	79
Figura 28. Curvas de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) para a AlClPc livre (vermelho), lipossoma branco (verde) e lipossoma contendo AlClPc (azul).	80
Figura 29. Espectros de infravermelho para a AlClPc livre (vermelho), lipossoma branco (azul), lipossoma contendo a AlClPc (verde) e sais de PBS (preto).....	82
Figura 30. Curva de calibração matrizada para a cloro-alumínio ftalocianina obtida em espectrofluorímetro ($\lambda_{ex} = 615 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 635 - 750 \text{ nm}$).....	83
Figura 31. Gráficos representativos das concentrações de AlClPc, em ng/cm^2 , recuperadas das diferentes camadas da pele após tratamento com a solução de fármaco ou lipossomas nos ensaios de penetração passiva ou precedida por microagulhamento. Os níveis de significância estatística foram obtidos em análise two way ANOVA com pós-teste de Tukey ($p \leq 0,05$).	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Variáveis independentes e seus respectivos níveis, em mg.	49
Tabela 2. Planejamento fatorial com todas as combinações de variáveis e seus níveis.	50
Tabela 3. Planejamento fatorial com valores experimentais para variáveis independentes.	50
Tabela 4. Relação entre as variáveis independentes, em seus níveis distintos, e os valores reais obtidos para as variáveis dependentes adotadas.	61
Tabela 5. Coeficientes de Regressão Full Quadratic para tamanho de partícula (Y_1).....	67
Tabela 6. Coeficientes de Regressão Full Quadratic para eficiência de encapsulação(Y_2)	67
Tabela 7. Coeficientes de Regressão Full Quadratic para índice de polidispersividade (Y_3) ..	68
Tabela 8. Correlação entre resultados previstos e os resultados experimentais para a formulação otimizada.	77
Tabela 9. Valores médios de tamanho, PDI e eficiência de encapsulação experimentais para o lipossoma ideal contendo (Lip. AlClPc) ou não (Lip. Branco) o fármaco.....	77
Tabela 10. Concentrações de AlClPc, em ng/cm^2 , para a solução de fármaco e lipossoma recuperadas do estrato córneo, na epiderme viável e no compartimento receptor por penetração passiva e precedida por microagulhamento.	83

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

DMSO	Dimetilsulfóxido
DOPE	1,2-Dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina
DPOC	1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfocolina
DSPC	1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfocolina
DSPE-PEG ₂₀₀₀	1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[polietilenoglicol-2000]
EGFR	Receptor de Fator de Crescimento Epidermal
FGFR	Receptor de Fator de Crescimento de Fibroblastos
SPC	Fosfatidilcolina de soja
Ras	Sarcoma de rato

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	13
2.	OBJETIVOS	17
2.1.	Objetivo geral:	17
2.2.	Objetivos específicos:.....	17
3.	REFERENCIAL TEÓRICO	18
3.1.	Pele	18
3.2.	Câncer de pele	20
3.3.	Terapia Fotodinâmica (TFD).....	22
3.3.1.	Terapia fotodinâmica do câncer de pele não melanoma (CPNM).....	25
3.4.	Fármacos fotossensibilizantes	26
3.4.1.	Fotossensibilizadores de primeira geração	26
3.4.2.	Fotossensibilizadores de segunda geração	27
3.4.2.1.	Ftalocianinas e seus derivados metálicos: cloro-alumínio	28
	ftalocianina (AICIPc).....	28
3.4.3.	Fotossensibilizadores de terceira geração.....	30
3.5.	Administração tópica de fármacos: desafios e aplicação na terapia fotodinâmica do CPNM	31
3.6.	Nanotecnologia e suas aplicações na terapia do câncer	33
3.6.1.	Lipossomas como sistemas de liberação de fármacos.....	35
3.7.	Promotores de absorção cutânea.....	39
3.7.1.	Microagulhamento.....	40
3.7.2.	Ácido oleico.....	42
3.8.	Design de experimentos: Planejamento fatorial de Box-Behnken	44
4.	METODOLOGIA.....	49
4.1.	Planejamento fatorial de Box-Behnken.....	49
4.2.	Preparo dos lipossomas carregados com AICIPc	51
4.3.	Caracterização físico-química dos lipossomas	52
4.3.1.	Análise de tamanho de partícula e índice de polidispersividade (PdI).....	52
4.3.2.	Determinação de potencial zeta (ζ).....	53
4.3.3.	Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).....	53
4.3.4.	Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier	54
	(FTIR).....	54
4.3.5.	Microscopia de força atômica (MFA)	54
4.3.6.	Preparo de curva analítica de AICIPc	54
4.4.	4.4.7. Eficiência de encapsulação de AICIPc	55
4.4.	Avaliação da penetração e permeação cutânea <i>in vitro</i>	56
4.4.1.	Quantificação de AICIPc em pele.....	57
4.4.2.	Avaliação da resistividade elétrica da pele.....	58
4.4.3.	Penetração cutânea passiva.....	58
4.4.4.	Penetração cutânea precedida por microagulhamento.....	59
4.5.	Análises estatísticas	59
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
5.1.	Desenvolvimento e caracterização físico-química de lipossomas contendo AICIPc obtidos por planejamento fatorial Box-Benhken.....	61
5.1.1.	Formulação lipossomal otimizada.....	75

5.2.	Microscopia de Força Atômica (MFA)	77
5.3.	Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).....	79
5.4.	Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	80
5.5.	Avaliação da penetração e permeação cutânea <i>in vitro</i>	82
6.	CONCLUSÃO	88
	REFERÊNCIAS	89

1. INTRODUÇÃO

Estatísticas globais levantadas pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em 2020 apontaram o câncer de pele não-melanoma (CPNM) como o quarto, dentre 36 tipos distintos de câncer, no ranking mundial de números de novos casos (SUNG et al., 2021). À nível nacional, os dados são igualmente alarmantes, uma vez que, segundo o Instituto Nacional de câncer (INCA), o CPNM corresponde a 30% de todos os tumores malignos registrados no Brasil, o que o torna, portanto, o mais frequente no país (INCA, 2022). Dentre os subtipos do CPNM, o carcinoma de células escamosas (CCE), que se origina das células epidérmicas, apesar de menos frequente, se apresenta como mais agressivo (CRAYTHORNE; NICHOLSON, 2021; RATUSHNY et al., 2012; WALKER; HARDWICKE, 2021). O tratamento de escolha na maioria dos casos é a excisão cirúrgica do tumor ou, quando esta não for indicada, a radioterapia. Em casos de lesões superficiais e de baixo risco, o uso de quimioterápicos tópicos também pode ser recomendado. No entanto, a intervenção cirúrgica comumente cursa com resultados estéticos insatisfatórios, além de envolver o risco de danos funcionais ao paciente (CRAYTHORNE; NICHOLSON, 2021; INOUE et al., 2020). Em adição, enquanto a radioterapia pode acarretar severos efeitos adversos, a quimioterapia tópica tem sido associada à alta taxa de recorrência (INOUE et al., 2020).

A terapia fotodinâmica (TFD), que integra o guia de diretrizes terapêuticas do CPNM junto às estratégias tópicos, têm se mostrado promissora por exibir eficácia comparativa a estas, melhores resultados estéticos e menor taxa de recorrência (KEYAL et al., 2019; SIDOROFF; THALER, 2010). Fundamentalmente, o mecanismo pelo qual a PDT exerce seus efeitos terapêuticos é baseado em três componentes: um agente fotossensibilizante (FS), luz no espectro visível e oxigênio molecular (BANERJEE et al., 2017; HOPPER, 2000). Em resumo, a eficácia da TFD depende, inicialmente, do acúmulo do FS nas células cancerígenas a partir de sua administração, e da subsequente exposição do tecido tumoral à luz em comprimento de onda compatível com o espectro absorptivo do FS (BANERJEE et al., 2017; HOPPER, 2000; RAK et al., 2019). Sob irradiação luminosa, o FS sofre reações fotoquímicas que o conduzem de um estado energético fundamental a um estado excitado de maior energia, denominado estado tripleto. De forma direta ou indireta, tais estados tripleto levam à produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) que, ao interagirem com a membrana das células cancerígenas, causam alterações em sua matriz lipídica que culminam na morte celular (RAK et al., 2019; TSUBONE; BAPTISTA; ITRI, 2019).

No contexto da terapia do CPNM, a via tópica de administração pode oferecer o acúmulo local de fármacos com menos efeitos adversos que a via sistêmica (CHATURVEDI; GARG, 2021). No entanto, a absorção tópica de compostos é severamente dificultada pela eficiente barreira estabelecida pelo estrato córneo, camada mais externa da epiderme. Ademais, os FS mais utilizados na clínica, como o ácido 5-aminolevulínico (5-ALA), um FS porfirínico, apresentam características físico-químicas que dificultam sua penetração e acúmulo nas camadas mais profundas da pele. Exibem ainda absorção de luz majoritariamente em comprimentos de onda estreitos (400-600 nm), com baixa profundidade de penetração efetiva nos tecidos, além de longo tempo de depuração no organismo, o que resulta em fotossensibilidade cutânea prolongada. Por esse motivo, apesar de seu imenso potencial terapêutico, a TFD permanece sendo indicada apenas para o tratamento de lesões superficiais (ASH et al., 2017; DOBSON; DE QUEIROZ; GOLDING, 2018; HU et al., 2022).

Nesse contexto, muito esforço tem sido investido na busca por FS que reúnam propriedades físicas, químicas e biológicas superiores aos disponíveis no mercado. Dentre os compostos mais promissores, estão as ftalocianinas, macrociclos tetrapirrólicos com alta absorção em largos comprimentos de onda (650-780 nm), o que se traduz em ótima penetração tecidual luminosa, e pobre absorção em 400-600 nm, reduzindo o risco de toxicidade cutânea prolongada (ONISZCZUK et al., 2016; RAK et al., 2019; ZHANG et al., 2020). Além disso, possuem rendimento quântico de fluorescência superior às demais porfirinas (DE SIQUEIRA et al., 2022; ONISZCZUK et al., 2016; RAK et al., 2019; ZHANG et al., 2020). A adição de um íon metálico diamagnético ao centro da molécula, como o Al^{3+} , pode ainda promover a formação de estados tripleto com maior rendimento e sobrevida, o que favorece a produção de EROs e, conseqüentemente, a atividade fototerapêutica do FS (DE SIQUEIRA et al., 2022). Não por acaso, a cloro-alumínio ftalocianina (AlClPc) têm protagonizado os estudos publicados nos últimos anos envolvendo o emprego de ftalocianinas na TFD no câncer (ALMEIDA et al., 2018, 2022; BRILKINA et al., 2019; CHEN et al., 2020; DE SIQUEIRA et al., 2022; SANTOS et al., 2020).

Em contrapartida, como as demais ftalocianinas, a AlClPc exibe alta hidrofobicidade e tendência à auto agregação em meios aquosos e biocompatíveis (SIQUEIRA-MOURA et al., 2010). Se por um lado o perfil lipofílico da molécula a confere boa interação com sistemas biológicos, por outro, a formação de dímeros ou agregados maiores pode levar ao decaimento ou até à anulação da emissão de fluorescência e da eficiência de produção de EROs. Portanto, para ser aplicável à TFD por via tópica, o fotossensibilizante precisa alcançar as camadas mais profundas da pele em concentrações adequadas e em sua forma monomérica, o

que inviabiliza a sua administração direta (NUNES; SGUILLA; TEDESCO, 2004; PEREIRA; TASSO, 2021; SIQUEIRA-MOURA et al., 2010). Com o propósito de superar essa limitação, os carreadores nanoestruturados têm se destacado como sistemas de liberação de fármacos capazes de melhorar as propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas de moléculas como a AICIPc (CALORI; TEDESCO, 2016; CANDIDO et al., 2018).

Os nanocarreadores caracterizam-se como sistemas de carreamento e liberação de fármacos que, usualmente, apresentam tamanho de partícula de até 500 nm (DASTIDAR; GHOSH; DAS, 2022). Características como tamanho, forma, carga e arranjo superficiais, que são determinantes para o comportamento farmacocinético de um composto, podem ser modificadas em uma nanopartícula de modo a torná-la compatível com a via de administração planejada, ainda que o fármaco não seja (FERRISSE et al., 2022; GIODINI et al., 2017). Dentre os diferentes tipos de nanocarreadores, os lipossomas, vesículas esféricas compostas por uma bicamada fosfolipídica, oferecem vantagens adicionais como sistemas de entrega de fármacos, tais como: possibilidade de carreamento de moléculas hidrofílicas e hidrofóbicas simultaneamente (SOUTO et al., 2022); marcantes biocompatibilidade e biodegradabilidade, dada a grande similaridade, estrutural e composicional, entre a bicamada fosfolipídica dos lipossomas e a membrana celular de mamíferos (LARGE et al., 2021).

Considerando os desafios para a penetração de moléculas para e através da pele, agentes facilitadores têm sido largamente empregados, sozinhos ou em associação aos nanocarreadores, para a otimização da administração tópica de fármacos (YUAN et al., 2022). O microagulhamento, um método físico de promoção de absorção, consiste na abertura temporária de microporos no estrato córneo por ação mecânica, abrindo caminho para o transporte direto de moléculas para a epiderme e camadas superficiais da derme (WAGHULE et al., 2019; YUAN et al., 2022). Já o ácido oleico (AO), um ácido graxo monoinsaturado bem estabelecido na literatura como um promotor químico de absorção cutânea, atua, de modo geral, por desestabilização dos lipídios presentes no estrato córeo (EC) (LANE, 2013; NAIK et al., 1995; WILLIAMS; BARRY, 2012). Ambos os agentes têm sido explorados em estudos voltados para a administração tópica e transdérmica de fármacos, e os resultados obtidos são promissores (ALMEIDA et al., 2018, 2022; LEV-TOV et al., 2017; PETUKHOVA et al., 2017).

Face ao exposto, o objetivo deste trabalho foi desenvolver e caracterizar lipossomas contendo AO e carreados com a AICIPc, além de avaliar a sua penetração e permeação cutânea, tanto de forma passiva quanto precedida por tratamento prévio da pele com microagulhamento. No entanto, o desenvolvimento de uma nova formulação farmacêutica requer a combinação de

diferentes excipientes e procedimentos sob condições específicas para que seja obtido um produto com eficácia e qualidade satisfatórias (JAIN; HURKAT; JAIN, 2019). Para a otimização deste processo, podem ser adotadas abordagens estatísticas que possibilitem o estudo da relação entre os fatores determinantes para este, chamados de variáveis independentes, e as respostas produzidas quando os fatores são alterados, chamadas de variáveis dependentes (SOLANKI; PARIKH; PARIKH, 2007). Há, por consequência, a identificação de ótimas condições de desenvolvimento da formulação com um número mínimo de experimentos, com menor consumo de insumos e tempo de trabalho (DAS; MISHRA, 2017; FERREIRA et al., 2007; JAIN; HURKAT; JAIN, 2019). Isto posto, para o delineamento experimental do desenvolvimento dos lipossomas, adotou-se o design estatístico de Box-Behnken (DBB), um método de superfície de resposta (MSR).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral:

Desenvolver, empregando o design estatístico Box-Benhken, lipossomas carregados com AlClPc e associá-los ao uso de promotores físicos e químicos de absorção visando potencial aplicação na terapia fotodinâmica do câncer de pele.

2.2. Objetivos específicos:

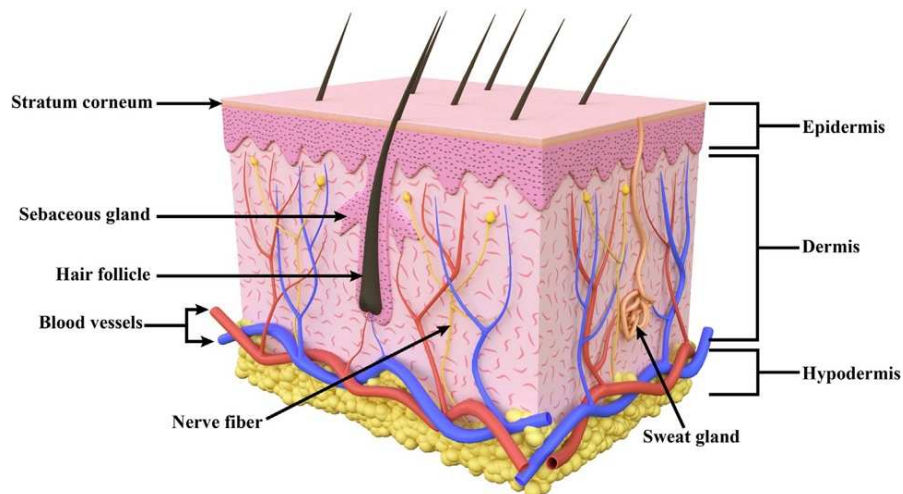
- Desenvolver lipossomas à base de fosfatidilcolina de soja, colesterol e ácido oleico, como promotor químico de absorção, para o carregamento da AlClPc;
- Aplicar o planejamento fatorial por design Box-Benhken com três fatores e três níveis para a obtenção de uma formulação lipossomal otimizada;
- Caracterizar as formulações produzidas quanto ao tamanho de partícula (nm), potencial zeta (mV) e índice de polidispersão por *dynamic light scattering*;
- Determinar a eficiência de encapsulação de AlClPc nos lipossomas por espectrofluorimetria;
- Caracterizar morfologicamente a formulação otimizada por microscopia de força atômica;
- Submeter os lipossomas sintetizados à análise por calorimetria exploratória diferencial e espectroscopia do infravermelho com transformada de Fourier;
- Avaliar a penetração e permeação cutânea *in vitro* dos lipossomas associada ao microagulhamento como promotor físico de absorção.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1. Pele

A pele é o maior órgão do corpo humano e, como tal, se apresenta de forma complexa e possui diferentes funções, respondendo por 15% do peso corporal total de um indivíduo adulto (LAI-CHEONG; MCGRATH, 2021). Cabe a ela atuar como uma barreira à invasão de patógenos, à perda de água e nutrientes pelo organismo, bem como à penetração de diferentes substâncias, por exemplo. Além disso, oferece ainda proteção mecânica e térmica aos tecidos subjacentes, e responde, em grande parcela, pela síntese de vitamina D no organismo (MOHAMED; HARGEST, 2021; TSAKOVSKA et al., 2017). O acúmulo destas diferentes atribuições é possível devido à heterogeneidade morfológica da pele. Estruturalmente, é dividida em três principais camadas, da mais externa à mais interna: epiderme, derme e subderme, também denominada hipoderme ou subcutis (Figura 1) (CHATURVEDI; GARG, 2021; LOSQUADRO, 2017).

Figura 1. Representação esquemática da estrutura da pele.



Fonte: (YUAN et al., 2022).

A epiderme é constituída preponderantemente por queratinócitos, sendo estes distribuídos em cinco subcamadas, de acordo com seu estágio de diferenciação celular (LAI-CHEONG; MCGRATH, 2021). Todavia, melanócitos, células de Langerhans e células de Merckell também integram a sua composição (MOHAMED; HARGEST, 2021). A camada epidérmica mais interna corresponde ao estrato basal, uma faixa única de células germinativas adjacentes à derme que, ao longo de 40 dias, aproximadamente, sofrem diferenciação e ascensão gradativas às camadas superiores. Acima do estrato basal, em sequência, estão

dispostos os estratos celulares espinhoso, granuloso, lúcido e, por fim, o estrato córneo, que reveste a superfície cutânea (BORGHETI-CARDOSO et al., 2020; ROBERTS et al., 2021). Apesar de avascularizadas, as quatro camadas mais profundas da epiderme recebem subsídio nutricional por difusão a partir da junção dermo-epidermal, e, por esse motivo, constituem a camada viável da epiderme. Em contrapartida, após um intenso processo de maturação e queratinização, os queratinócitos que chegam ao estrato córneo, agora denominados corneócitos ou queratinócitos, encontram-se anucleados e funcionalmente “mortos” (BORGHETI-CARDOSO et al., 2020; ZSIKÓ et al., 2019). Neste estrato epidérmico, os corneócitos se sobrepõem em 10-30 camadas, a depender da região do corpo, e encontram-se imersos em uma matriz lipídica intercelular densa, composta de ceramidas, ácidos graxos e colesterol, por exemplo (BORGHETI-CARDOSO et al., 2020). Por esse motivo, o modelo de “tijolo e argamassa” é amplamente utilizado para descrever seu arcabouço estrutural. É também devido à sua natureza altamente hidrofóbica e espessa que o estrato córneo é a principal barreira à perda de água pelo organismo, mas principalmente à penetração cutânea de agentes externos, inclusive de fármacos e ativos cosméticos (LAI-CHEONG; MCGRATH, 2021; ZSIKÓ et al., 2019). Em espessura, a epiderme, como um todo, pode atingir de 60-120 μm (BORGHETI-CARDOSO et al., 2020).

Abaixo da epiderme encontra-se a derme, uma camada vascularizada que pode ser subdividida em duas regiões: a papilar, adjacente à epiderme, e a reticular, camada mais profunda que repousa sobre a hipoderme. Em composição, possui os fibroblastos como tipo celular majoritário, fibras de colágeno, elastina e reticulina como principais constituintes de sua porção intersticial, além de 60% de seu peso em água. A derme abriga ainda os folículos pilosos, glândulas sebáceas e sudoríparas (LAI-CHEONG; MCGRATH, 2021; MOHAMED; HARGEST, 2021). Variando de 0,5 a 5 mm de espessura, a camada média da pele responde por sua resistência e flexibilidade (BORGHETI-CARDOSO et al., 2020; MOHAMED; HARGEST, 2021).

Por fim, a hipoderme, camada ricamente vascularizada, é composta por adipócitos, tipo celular responsável pelo armazenamento de gordura, que são agrupados em lóbulos (MOHAMED; HARGEST, 2021). Uma vez que, em indivíduos não obesos, aproximadamente 80% da gordura corporal total está localizada no tecido subcutâneo, a hipoderme desempenha um papel central na absorção de impactos mecânicos e na capacidade de termorregulação corpórea, além de exercer ainda atividades endócrinas (LAI-CHEONG; MCGRATH, 2021; MOHAMED; HARGEST, 2021).

3.2.Câncer de pele

Dados levantados pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em 2019 apontaram o câncer como a primeira ou segunda causa de morte para ambos os sexos antes dos 70 anos de idade em 112 de 183 países ao redor do mundo, incluindo o Brasil (SUNG et al., 2021). Dentre os sítios que lideram o ranking global de novos casos está o câncer de pele, que pode ser subdividido em melanoma (CPM), quando derivado de melanócitos, ou não-melanoma (CPNM), quando se origina de células derivadas da epiderme. No entanto, a distribuição de casos entre ambos não é equilibrada, sendo atribuídos ao câncer de pele não-melanoma 78% de todos eles no ano de 2018, o que corresponde a 1,04 milhão de ocorrências (CRAYTHORNE; NICHOLSON, 2021; SUNG et al., 2021). À nível nacional, os dados são igualmente alarmantes, uma vez que, segundo o Instituto Nacional de câncer (INCA), o CPNM corresponde a 30% de todos os tumores malignos registrados no Brasil, o que o torna, portanto, o mais frequente no país (INCA, 2022). O câncer de pele não-melanoma pode ainda ser dividido em diferentes subtipos, mas dois deles merecem destaque por sua maior incidência: o carcinoma basocelular (CBC), mais frequente e menos agressivo, e o carcinoma de células escamosas (CCE) (WALKER; HARDWICKE, 2021; INCA, 2020).

O CCE cutâneo (CCEc), originário dos queratinócitos, comumente deriva de lesões pré-malignas que evoluem para a doença de Bowen ou CCEc *in situ*, isto é, retido às camadas superficiais da epiderme, como a ceratose actínica, feridas crônicas e cicatrizes de queimaduras, mesmo anos após terem sido geradas (CRAYTHORNE; NICHOLSON, 2021; RATUSHNY et al., 2012; WALKER; HARDWICKE, 2021). O principal fator de risco para o desenvolvimento do CCEc, bem como para a sua progressão, é a exposição recorrente à radiação ultravioleta B (UVB). No entanto, condições intrínsecas ao paciente também são determinantes, como pele e cabelos claros (níveis I e II na escala de Fitzpatrick), idade avançada e supressão imunológica crônica em indivíduos submetidos a transplante prévio de órgãos, por exemplo (CRAYTHORNE; NICHOLSON, 2021; LI et al., 2021; RATUSHNY et al., 2012). Clinicamente, pode se apresentar de formas diversas, desde lesões que se assemelham a verrugas, até pápulas crostosas ou mesmo nódulos ulcerados (Figura 2).

Figura 2. Carcinoma de células escamosas na forma de nódulo ulcerado no dorso da mão.



Fonte: (CRAYTHORNE; NICHOLSON, 2021)

Em termos fisiopatológicos, a exposição crônica à radiação UVB, ou demais agentes carcinogênicos, pode levar à instabilidade genética e perda do controle do ciclo celular nos queratinócitos a partir de mutações em genes específicos (RATUSHNY et al., 2012). A perda de função do gene p53, um importante supressor tumoral, foi identificada em 90% dos casos de CCEc (KHANDELWAL et al., 2021). Em contrapartida, estima-se que, em 21% dos casos, os tumores de CCE abriguem mutações de ativação ou amplificação nos proto-oncogenes da família Ras, relacionados à proliferação e sobrevivência celular (RATUSHNY et al., 2012; SANTOS et al., 2020). Além disso, a superexpressão ou ativação constitutiva de receptores que medeiam importantes vias de sinalização de fatores de crescimento, como o EGFR e o FGFR, também têm sido observadas (KHANDELWAL et al., 2021; RATUSHNY et al., 2012).

Uma vez que o diagnóstico de CCEc é estabelecido, este pode ser classificado como de baixo, alto ou muito alto risco, de acordo com algumas características das lesões através das quais se manifesta, como diâmetro e débito de invasão, por exemplo. Tumores < 20 mm, de 20-40 mm e > 40mm são considerados de baixo, alto e muito alto risco, respectivamente. Ademais, lesões confinadas à derme apresentam menor risco e melhores prognósticos, com potencial metastático de 3%. Em contraste, para as lesões que atingem ou ultrapassam o tecido subcutâneo, consideradas de alto ou muito-alto risco, de modo respectivo, este percentual pode chegar a ser dez vezes maior (CRAYTHORNE; NICHOLSON, 2021; WALKER; HARDWICKE, 2021).

O tratamento de escolha na maioria dos casos é a excisão cirúrgica do tumor, por meio da cirurgia de Mohs, por exemplo, com margens de 4-10 mm, a depender da gravidade da lesão (INOUE et al., 2020). Nos casos em que a cirurgia é contraindicada ou não recomendada em decorrência do risco de danos funcionais ou estéticos, a radioterapia pode ser considerada, uma vez que oferece taxas de cura superiores a 90% (CRAYTHORNE; NICHOLSON, 2021). Para os casos de CCEc *in situ* ou na contraindicação das estratégias primárias, um terceiro

segmento terapêutico consiste na administração tópica de fármacos, tais como os quimioterápicos 5-fluoruracila (5-FU), principalmente, e Imiquimod, ambos aprovados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), no Brasil, e pela Food and Drug Administration (FDA), nos EUA (CULLEN et al., 2020; ANVISA, 2022). No entanto, o longo tempo de tratamento, a alta taxa de recorrência e os efeitos colaterais associados às quimioterapias tópicas disponíveis são dois dos principais fatores que comumente limitam a adesão do paciente e, conseqüentemente, sua eficácia (INOUE et al., 2020). Neste contexto, a terapia fotodinâmica, que integra o guia de diretrizes terapêuticas junto às estratégias tópicas, têm se mostrado promissora por exibir eficácia comparativa, melhores resultados estéticos e menor taxa de recorrência (KEYAL et al., 2019; SIDOROFF; THALER, 2010).

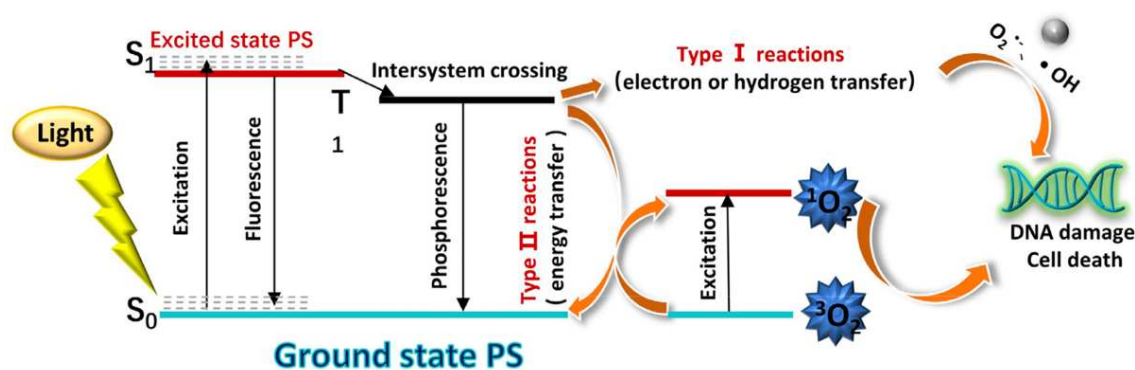
3.3. Terapia Fotodinâmica (TFD)

Apesar de se acreditar que a sua origem remonta ao antigo Egito, o uso da terapia fotodinâmica (TFD) no tratamento de diferentes tipos de câncer de pele só passou a ser explorado na década de 70, e a ganhar maior aceitabilidade e reconhecimento anos depois, na década de 80 (DOBSON; DE QUEIROZ; GOLDING, 2018; DOUGHERTY et al., 1978). Em princípio, a TFD baseia-se na foto-oxidação de tecidos biológicos sensibilizada por corantes mediante ativação por irradiação luminosa (HENDERSON; DOUGHERTY, 1992). Portanto, para que seja bem-sucedida, depende da presença de três principais elementos no sítio alvo. O primeiro deles é um fármaco fotossensibilizador (FS), isto é, uma molécula capaz de absorver energia luminosa e transferi-la para substratos vizinhos e/ou para o oxigênio, principalmente, produzindo espécies reativas. O segundo, luz em um comprimento de onda satisfatoriamente absorvível pelo FS empregado e, por fim, o próprio oxigênio molecular (CHEN et al., 2022; CULLEN et al., 2020; DOBSON; DE QUEIROZ; GOLDING, 2018).

Quando se encontram em seu estado fundamental (S_0), comumente, os fármacos fotossensibilizantes possuem dois elétrons de spins opostos em um orbital molecular de baixa energia. Ao absorver fótons provenientes da irradiação luminosa, um destes elétrons passa a um orbital molecular de maior energia mantendo seu spin, o que conduz o FS a um estado singlete excitado de vida curta (S_1), como mostra a Figura 3. Em nano ou pico segundos, o fármaco em seu estado singlete excitado pode retornar ao estado fundamental, dissipando energia na forma de luz por fluorescência, ou sofrer, espontaneamente, cruzamento inter sistema (CIS). Neste último caso, em particular, o elétron localizado no orbital de maior energia tem seu spin invertido, dando origem a um estado tripleto excitado (S_2) de maior sobrevida

(milissegundos). À semelhança, quando em seu estado S_2 , o FS pode retornar ao estado S_0 , dissipando energia luminosa por fosforescência. Por outro lado, é também somente em seu estado tripleto que o fármaco pode mediar duas diferentes reações fotoquímicas nas quais a TFD se baseia, as chamadas reações do tipo I e II (CHAMPEAU et al., 2019; CHEN et al., 2022; CHILAKAMARTHI; GIRIBABU, 2017; HENDERSON; DOUGHERTY, 1992; SWAMY et al., 2020).

Figura 3. Ilustração esquemática do mecanismo da terapia fotodinâmica (TFD).

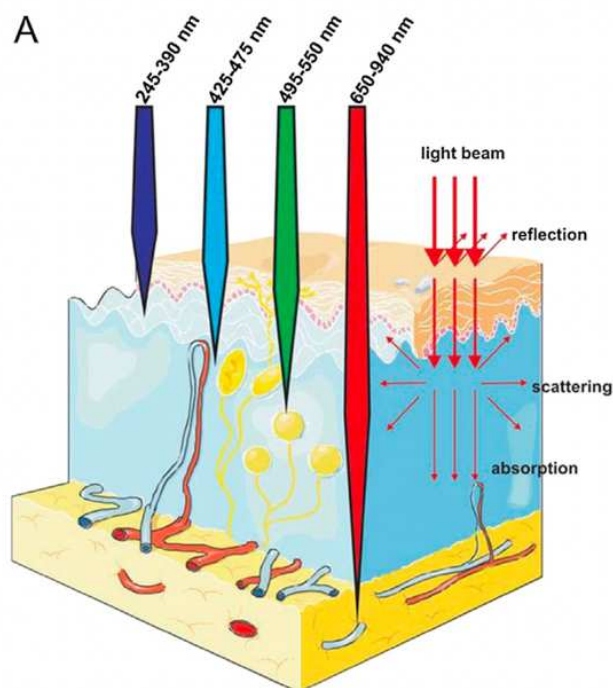


Fonte: (CHEN et al., 2022).

As reações do tipo I são caracterizadas pela interação direta entre o fármaco em seu estado tripleto excitado e o tecido alvo, isto é, membranas celulares ou biomoléculas, por exemplo, e ocorre mais comumente em tecidos com menor concentração de oxigênio. Nesta via, o fotossensibilizador transfere elétrons para o substrato biológico dando origem a radicais livres que, rapidamente, reagem com o oxigênio presente no microambiente tumoral formando espécies reativas de oxigênio (EROs). As reações do tipo II, em contrapartida, caracterizam-se pela interação entre o fotossensibilizante e o oxigênio molecular e, por esse motivo, ocorrem com maior frequência em tecidos em que este encontra-se mais disponível. Neste caso, o fármaco transfere energia para o oxigênio em seu estado tripleto basal, e o conduz ao seu estado singleto excitado. Em ambos os casos, os produtos oxidados gerados, oxigênio singlete e EROs, exibem alta reatividade e são responsáveis por mediar o efeito citotóxico da TFD (CHEN et al., 2022; CHILAKAMARTHI; GIRIBABU, 2017; DOBSON; DE QUEIROZ; GOLDING, 2018; ONISZCZUK et al., 2016; SWAMY et al., 2020). Os três principais processos envolvidos na morte de células cancerígenas provocados por EROs são os danos celulares diretos, por necrose ou apoptose, dano à vasculatura tumoral e ativação de resposta imunológica contra o tumor (DOBSON; DE QUEIROZ; GOLDING, 2018; PETRELLIS et al., 2019; SWAMY et al., 2020).

No entanto, para que os produtos oxidados se acumulem no sítio tumoral e sejam gerados em níveis satisfatórios para garantir o sucesso terapêutico da TFD, a escolha adequada da fonte de luz e do FS a serem utilizados é imprescindível. Para a fonte de luz, o comprimento de onda adotado deve permitir máxima penetração tecidual e, ao mesmo tempo, ser compatível com a faixa de absorção do FS escolhido. Este é um desafio em particular na TFD, considerando a presença de cromóforos naturais nos tecidos, como a melanina e a hemoglobina. Por esse motivo, cada região do espectro visível da luz apresentará uma profundidade de penetração efetiva específica, ou seja, profundidade na qual a radiação é reduzida em aproximadamente 37% (Figura 4). Para a luz na região do vermelho e próximo ao infravermelho ($\lambda = 600-940$ nm), por exemplo, a profundidade atingida é de 1-3 mm, enquanto a luz verde ($\lambda = 500 - 550$ nm) atinge apenas centenas de micrometros (DOBSON; DE QUEIROZ; GOLDING, 2018; HU; LEI; ZHANG, 2020).

Figura 4. Esquema representativo da profundidade de penetração efetiva da luz de acordo com o comprimento de onda adotado.



Fonte: Adaptado de (HU et al., 2022).

Para o FS adotado, por sua vez, algumas das características de interesse são: ser atóxico na ausência de ativação luminosa; exibir coeficiente de partição compatível com a via de administração pretendida, de modo a permitir o seu acúmulo preferencialmente no sítio tumoral; ser ativado por luz em comprimento de onda clinicamente aplicável; possuir estados

tripleto excitados de longa vida útil; exibir um rendimento quântico de espécimes reativas de oxigênio adequado ao alcance do resultado terapêutico (CHAMPEAU et al., 2019; DOBSON; DE QUEIROZ; GOLDING, 2018). Ademais, os FS podem ser distribuídos em diferentes classes e gerações, que serão abordadas na seção 3.4.

3.3.1. Terapia fotodinâmica do câncer de pele não melanoma (CPNM)

Junto à crioterapia e o uso de quimioterápicos tópicos, a terapia fotodinâmica está bem consolidada como seguimento terapêutico eficaz e seguro no tratamento de alguns subtipos de CPNM e de lesões precursoras (ALGORRI et al., 2021; CHAMPEAU et al., 2019; CULLEN et al., 2020). Traçando um breve histórico, no final da década de 90, o pró-fármaco ácido 5-aminolevulínico (5-ALA) (Levulan Kerastick®, DUSA Pharmaceuticals, Massachusetts, EUA) foi aprovado nos EUA, pela *Food and Drug Administration* (FDA), para a TFD da ceratose actínica. Cinco anos depois, o seu derivado esterificado, aminolevulinato de metila (MAL) (Metvix®, Galderma, Paris, França), também recebeu aprovação para a mesma indicação. No Brasil, o MAL e o 5-ALA passaram a integrar o guia de diretrizes terapêuticas para a TFD do CPNM em 2006 e 2008, respectivamente. Todavia, apenas o MAL manteve, até o momento, o seu registro aprovado perante a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), sendo, atualmente, indicado para a TFD da ceratose actínica, do CBC e do CCEc *in situ* (ISSA; BOECHAT; FASSINI, 2016).

Em 2005, um estudo clínico comparativo investigou a crioterapia, o uso tópico do 5-FU e a associação de MAL-TFD no tratamento de 225 pacientes com doença de Bowen não tratada previamente. Dois anos após o tratamento final, a combinação MAL-TFD exibiu taxa de cura de 68%, ao passo que a crioterapia e o 5-FU tópico alcançaram taxas de 60% e 59%, respectivamente (LEHMANN, 2007)). Outro estudo, realizado em 2001, demonstrou a considerável seletividade que o MAL-TFD apresenta, uma vez que 98% da concentração administrada por via tópica no tecido tumoral foi recuperada ao término do tratamento, indicando baixo risco de toxicidade sistêmica (PENG et al., 2001). Ademais, a TFD, frente às demais abordagens terapêuticas, se mostra menos invasiva e mais segura para pacientes idosos e para aqueles que, por possuírem comorbidades, a abordagem cirúrgica não é recomendada. A fototerapia oferece ainda melhores resultados estéticos e menores taxas de recorrência (KEYAL et al., 2019; ONISZCZUK et al., 2016).

Contudo, como qualquer estratégia terapêutica, a TFD possui desvantagens e aspectos que precisam ser pontuados. A princípio, os fármacos fotossensibilizantes mais

utilizados clinicamente, como o MAL e o ALA, absorvem luz majoritariamente em 405 nm e, em menor proporção, na faixa de 570 – 670 nm. Portanto, são ativados principalmente por fontes luminosas na região azul do espectro visível, que exhibe baixa profundidade de penetração efetiva, como abordado anteriormente (LEHMANN, 2007). Em adição, a pobre penetração tecidual não se limita, neste caso, à fonte de luz. Ao passo que, para o ALA, sua alta hidrofobicidade é um obstáculo particular à sua passagem através do estrato córneo, para o MAL, que possui caráter hidrofóbico, o desafio é não permanecer retido na barreira cutânea (CHAMPEAU et al., 2019). Desse modo, em decorrência da dificuldade dos fotossensibilizadores em se acumularem nas camadas mais profundas da pele, a TFD permanece sendo indicada para o tratamento de lesões superficiais, como o CCEc *in situ*, mas, em geral, não é recomendada em lesões invasivas (BANDER; NEHAL; LEE, 2019; KEYAL et al., 2019; KIBBI et al., 2020).

Em suma, a TFD se apresenta como uma alternativa terapêutica promissora para o CPNM, mas que demanda aperfeiçoamento. Com esse objetivo, estudos pré-clínicos e clínicos tem se concentrado, nos últimos anos, em ao menos uma das seguintes estratégias: otimização das características físico-químicas dos fotossensibilizadores já utilizados na clínica (CRÜNING; MÜLLER-GOYMANN, 2008; MANALO et al., 2019; RISALITI et al., 2018; WANG et al., 2022); uso de promotores químicos e/ou físicos de penetração cutânea (ABDEL-AZIM et al., 2022; ALEXIADES, 2017; ALMEIDA et al., 2018; PETUKHOVA et al., 2017); associação da TFD à demais tecnologias, como o emprego de sistemas de liberação de fármacos (SLF) (MORTON et al., 2018; SHI et al., 2013; WANG et al., 2015; WANG; LI; LIU, 2021), bem como o desenvolvimento e a investigação da atividade terapêutica de fotossensibilizantes ainda não explorados (ABDEL FADEEL; KAMEL; FADEL, 2020; ALMEIDA et al., 2022; FADEL et al., 2017; REIS et al., 2019).

3.4.Fármacos fotossensibilizantes

3.4.1. Fotossensibilizadores de primeira geração

Estima-se que a denominação “composto fotossensibilizante” englobe, até então, aproximadamente 400 moléculas que encontram aplicação nas áreas médica, cosmética e química, por exemplo (ONISZCZUK et al., 2016). No campo médico, especificamente, a ascensão da TFD na década de 70 veio acompanhada da aprovação, por agências regulatórias, do primeiro fotossensibilizante comercializado para fins terapêuticos (KWIATKOWSKI et al.,

2018). Posteriormente, a molécula em questão, um derivado de hematoporfirina, foi parcialmente purificada dando origem ao porfímero sódico (ALGORRI et al., 2021).

Sob o nome comercial Photofrin, o porfímero sódico foi regularizado em dezenas de países, à época, para a TFD de diferentes tipos de câncer e, atualmente, é o único fármaco aprovado para este fim pelo FDA (NWOGU et al., 2021; YOON; LI; SHIM, 2013). Apesar do seu uso amplo, o Photofrin, que se apresenta como uma mistura complexa de compostos, possui diversas limitações. A princípio, é administrado por via endovenosa, pois o tamanho destas moléculas inviabiliza sua administração tópica. Tais compostos se distribuem de forma heterogênea pelos tecidos, e alguns tendem a permanecer por mais tempo na pele, resultando em fotossensibilidade cutânea prolongada. Ademais, o espectro absorptivo luminoso do Photofrin é composto com uma faixa majoritária em 400 nm e por uma região mais discreta que decai em aproximadamente 630 nm, limitando sua penetração cutânea (ASH et al., 2017; KWIATKOWSKI et al., 2018; NWOGU et al., 2021). Sob a motivação de superar as limitações dos primeiros fotossensibilizadores, aos quais foi atribuída a designação de fotossensibilizantes de primeira geração, novos compostos foram desenvolvidos.

3.4.2. Fotossensibilizadores de segunda geração

A segunda geração de fotossensibilizadores engloba moléculas que derivam, que se assemelham estruturalmente ou que são precursores metabólicos das porfirinas. Por essa razão, estes compostos são classificados como fotossensibilizantes porfirínicos. Integram o grupo, ainda, corantes sintéticos não relacionados, que, por esse motivo, são chamados de não-porfirínicos (D’ALESSANDRO; PRIEFER, 2020; SWAMY et al., 2020). Em geral, os fotossensibilizadores de segunda geração apresentam maiores pureza química, seletividade tumoral e rendimento quântico de oxigênio singleto, menores tempo de depuração e efeitos adversos, além de melhor penetração tecidual. Esta última característica, em específico, se deve ao aumento do pico de absorção destes compostos em comprimentos de onda mais largos, dentro do vermelho ou do infravermelho próximo (650-800 nm) (KWIATKOWSKI et al., 2018; SWAMY et al., 2020).

Tais propriedades, no entanto, variam entre as numerosas classes de fotossensibilizadores de segunda geração. Diversos corantes e pigmentos não-porfirínicos possuem a capacidade de gerar EROs eficientemente e têm sido vastamente explorados, como o azul de metileno, um corante fenotiazínico, a curcumina, um curcuminóide, e o rosa bengala,

da classe dos xantenos (D'ALESSANDRO; PRIEFER, 2020). Todavia, fotossensibilizadores porfirínicos, como o 5-ALA, as clorinas e as ftalocianinas são mais comumente empregados na clínica em decorrência da similaridade estrutural que exibem com cromóforos naturalmente presentes no organismo humano (GRIN; SUVOROV; MIRONOV, 2020; RAK et al., 2019).

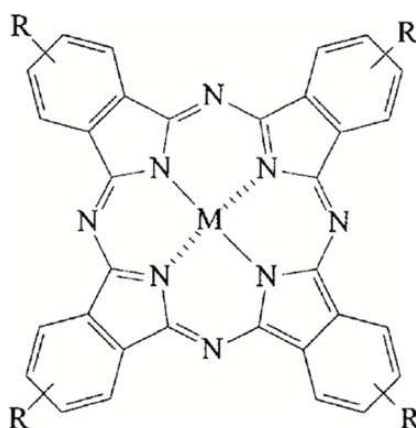
No grupo dos precursores de porfirinas, estão o ALA e o MAL, já abordados anteriormente, que se tornam ativos após metabolização em protoporfirina (KWIATKOWSKI et al., 2018). Foi o tamanho reduzido destas moléculas, em comparação ao Photofrin, que permitiu sua administração tópica (SZEIMIES et al., 2005). Já as clorinas, que derivam de porfirinas hidrofílicas reduzidas, caracterizam-se por apresentarem maior rendimento quântico de EROs e forte absorção, em comparação às demais porfirinas, em comprimentos de ondas mais longos (650-660 nm) (ONISZCZUK et al., 2016). Dois grandes representantes dos fotossensibilizadores derivados de clorinas são a temoporfina e a talaporfina, aprovadas na Europa e no Japão, respectivamente, para o uso na TFD do câncer (GRIN; SUVOROV; MIRONOV, 2020; KEUM; YOO; JON, 2022).

3.4.2.1.Ftalocianinas e seus derivados metálicos: cloro-alumínio ftalocianina (AICIPc)

As ftalocianinas são corantes sintéticos que compartilham com as porfirinas a estrutura macrocíclica, mas que possuem anéis aromáticos fundidos aos anéis pirrólicos (RAK et al., 2019). É justamente a sua natureza aromática que as confere absorção na região do vermelho e do infravermelho próximo, em 650-780 nm, o que se traduz em ótima penetração tecidual luminosa, além de pobre absorção em 400-600 nm, o que reduz o risco de toxicidade cutânea prolongada (ONISZCZUK et al., 2016; RAK et al., 2019; ZHANG et al., 2020). Exibem ainda absorvidade luminosa e rendimento quântico de fluorescência superiores às demais porfirinas (DE SIQUEIRA et al., 2022; RAK et al., 2019). Em contrapartida, a alta hidrofobicidade e tendência à auto agregação em meio aquoso são marcantes características comuns às ftalocianinas (SIQUEIRA-MOURA et al., 2010). Se por um lado o perfil lipofílico da molécula a confere boa interação com sistemas biológicos, por outro, a formação de dímeros ou agregados maiores pode levar ao decaimento ou até anulação da emissão de fluorescência e da eficiência de produção de EROs. Portanto, a presença do fotossensibilizante em sua forma monomérica é imprescindível para o sucesso da TFD (NUNES; SGUILLA; TEDESCO, 2004; PEREIRA; TASSO, 2021; SIQUEIRA-MOURA et al., 2010).

As propriedades fotofísicas destes compostos são ainda fortemente influenciadas pela presença e natureza do íon que ocupa a posição central (M) da molécula, como mostra a Figura 5, que pode ser metálico, não-metálico ou metalóide. No âmbito da TFD, no entanto, a funcionalização com íons metálicos representa a maior parcela dos exemplos, dando origem aos chamados derivados metálicos de ftalocianinas. Isso ocorre porque metais como o Zn^{2+} , Al^{3+} e Ga^{3+} , por exemplo, promovem a formação de estados tripleto com maior rendimento e maior sobrevida, o que favorece a produção de EROs e, conseqüentemente, a atividade fototerapêutica, além de reduzirem a tendência à agregação de suas respectivas ftalocianinas (DE SIQUEIRA et al., 2022). Não por acaso, compostos como a ftalocianina de zinco (ZnPc) e a cloro-alumínio ftalocianina (AlClPc) têm protagonizado os estudos publicados nos últimos anos envolvendo o emprego da TFD em doenças infecciosas e oncológicas (BRILKINA et al., 2019; CHEN et al., 2020; DE SIQUEIRA et al., 2022; SANTOS et al., 2020).

Figura 5. Estrutura química geral de um derivado metálico de ftalocianina.

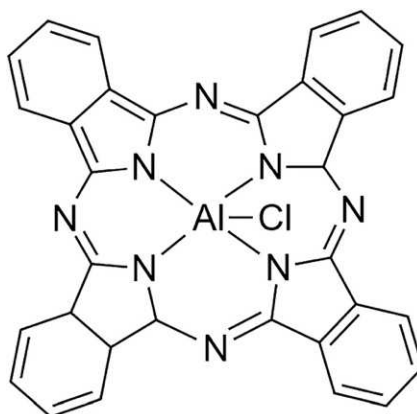


Fonte: Adaptado de (DE SIQUEIRA et al., 2022).

Em termos estruturais, a AlClPc se apresenta como um macrociclo composto por quatro pirróis ligados entre si por átomos de nitrogênio e com um átomo de Al^{3+} ao centro, como representado na Figura 6, possuindo massa molecular equivalente a 540 kDa, aproximadamente. À semelhança das demais ftalocianinas, a AlClPc exibe propriedades fotofísicas excelentes para aplicação na TFD, que são potencializadas pela presença do metal diamagnético (CALORI; TEDESCO, 2016). Possui estado tripleto excitado de longa vida ($\sim 80 \mu s$) produzido com alto rendimento ($\Phi_T \sim 0,3$ em dimetilsulfóxido), assim como alto rendimento quântico de O_2 singleto ($\Phi_{\Delta} > 0,47$ em dimetilsulfóxido) (SANTOS et al., 2020). Somadas ao seu espectro absorptivo compatível com a janela terapêutica ($\sim 2.9 \times 10^5 L mol^{-1} cm^{-1}$ em 672 nm em etanol) (CALORI; TEDESCO, 2020), tais características a posicionaram como

um fotossensibilizante promissor para o tratamento de diversos tipos de câncer, incluindo o CPNM, o que tem sido confirmado pelos resultados obtidos *in vitro* e *in vivo* (ALMEIDA et al., 2022; CALORI; TEDESCO, 2016; GOTO; SIQUEIRA-MOURA; TEDESCO, 2017; LONGO et al., 2009; REIS et al., 2019; ROCHA et al., 2012).

Figura 6. Estrutura química da cloro-alumínio ftalocianina (AlClPc).



Fonte: (SANTOS et al., 2020).

O aproveitamento do potencial farmacológico da AlClPc, no entanto, assim como das demais ftalocianinas, tem como principal obstáculo sua alta hidrofobicidade ($\text{Log } P = 7,3$) (REIS et al., 2019). Com o objetivo de contornar tal característica e viabilizar sua administração, duas principais estratégias têm sido exploradas. A primeira consiste na introdução de grupos sulfonados, por exemplo, às extremidades (R) dos anéis isoindol da molécula (Figura 5), construindo, desse modo, um composto hidrofílico. Apesar de viabilizar sua administração sistêmica direta, a substituição pode afetar negativamente a captação celular e a atividade fotofísica do composto, como demonstrado em alguns estudos (BRILKINA et al., 2019; CHAN et al., 1990; DE SIQUEIRA et al., 2022). Por essa razão, visando melhorar a solubilidade da molécula nos compartimentos biológicos e, ao mesmo tempo, preservar suas propriedades foto-terapêuticas, diversos nanocarreadores têm sido explorados como sistemas de liberação para a AlClPc (CALORI; TEDESCO, 2020).

3.4.3. Fotossensibilizadores de terceira geração

A terceira geração de fotossensibilizadores não se baseia no desenvolvimento de novas moléculas, mas sim no emprego de novas tecnologias para a otimização dos aspectos farmacocinéticos e farmacodinâmicos dos fotossensibilizadores de segunda geração (MFOUO-TYNGA et al., 2021). Embora a natureza dessas moléculas favoreça, por vezes, sua retenção

tumoral e a irradiação direcionada com luz de um determinado comprimento de onda minimize os riscos de danos aos tecidos saudáveis, a melhora da seletividade de acúmulo em um sítio específico permanece sendo um aspecto crítico (GRIN; SUVOROV; MIRONOV, 2020). Isto posto, o desenvolvimento de fotossensibilizadores de terceira geração faz uso, principalmente, da bioconjugação dos fármacos a moléculas de direcionamento ao tecido-alvo, como anticorpos monoclonais (mAbs), e/ou do encapsulamento dos fotossensibilizadores em sistemas nanoestruturados de liberação de fármacos (KWIATKOWSKI et al., 2018; MFOUO-TYNGA et al., 2021).

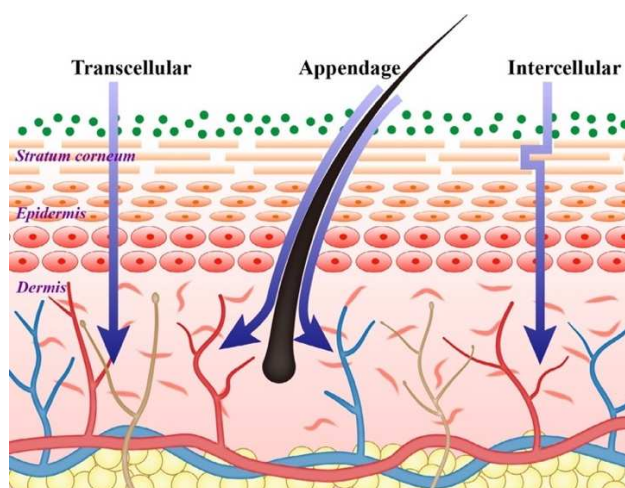
3.5.Administração tópica de fármacos: desafios e aplicação na terapia fotodinâmica do CPNM

Um dos maiores desafios associados à terapia oncológica é alcançar o acúmulo seletivo dos fármacos administrados, por via oral ou intravenosa, em sua maioria, no sítio tumoral. Isso porque a disseminação sistêmica dos agentes citotóxicos não somente aumenta a dose necessária para se atingir o efeito terapêutico, uma vez que o fármaco não é distribuído apenas para o tecido alvo, mas também porque, em razão disso, os pacientes são acometidos por uma série de efeitos adversos (HAQUE et al., 2015). No contexto da terapia do CPNM, a via tópica pode ser igualmente efetiva, uma vez que pode oferecer, com menos efeitos adversos associados e pouca ou nenhuma toxicidade sistêmica, o acúmulo local de fármacos (CHATURVEDI; GARG, 2021). Em tese, isso a permitiria ser a via de administração de escolha para lesões precursoras, como a ceratose actínica, lesões *in situ*, como a doença de Bowen, e até para casos de CCE invasivo.

Todavia, a administração cutânea de fármacos, seja ela tópica ou transdérmica, enfrenta uma série de obstáculos (PADYA et al., 2021). O mais significativo deles é o estrato córneo (EC), camada mais externa da epiderme e principal barreira física à penetração de agentes exógenos em função de sua natureza espessa e altamente hidrofóbica (HAQUE et al., 2015; LAI-CHEONG; MCGRATH, 2021). Em lesões de ceratose actínica, no entanto, essa barreira se torna ainda mais densa e espessa, pois a sua fisiopatologia usualmente cursa com hiperqueratinização do EC (SHENDE; VAIDYA; GAUD, 2018). À semelhança, no CPNM foram observados maiores níveis de queratina e componentes lipídicos nas células tumorais em comparação aos presentes no tecido normal (KHAN et al., 2022). A espessura da barreira cutânea pode ainda, como consequência, variar entre lesões mesmo em um único indivíduo (YAMADA; PROW, 2020).

Em adição, as características do fármaco também são determinantes para a sua penetração, isto é, a passagem pela barreira do EC, para sua permeação, definida pela sua passagem de uma camada dérmica para outra e, por fim, para sua reabsorção, quando este atinge a camada vascular (BOLZINGER et al., 2012). A penetração cutânea de uma molécula, especificamente, pode ocorrer por três vias distintas (Figura 7): a rota intracelular, em que o fármaco atravessa os corneócitos, a rota intercelular, onde percorre a matriz lipídica extracelular na qual estes estão embebidos e, por fim, a rota folicular, isto é, através dos anexos dérmicos, como folículos pilosos (CHATURVEDI; GARG, 2021; KRISHNAN; MITRAGOTRI, 2020). A rota de penetração de um composto, bem como a extensão de sua permeação, é influenciada, principalmente, por sua massa molecular (MM), o número de aceptores (NAH) e de doadores de hidrogênio (NDH) da molécula e por seu coeficiente de partição octanol-água ($\log P$) (BOLZINGER et al., 2012). Desse modo, a literatura aponta que fármacos com $MM > 600$ kDa, $NDH > 5$, $NAH > 10$ e $\log P > 5$ tendem a apresentar maior dificuldade para serem absorvidos pela via tópica (BOLZINGER et al., 2012; CHATURVEDI; GARG, 2021; SHENDE; VAIDYA; GAUD, 2018).

Figura 7. Rotas de penetração e permeação cutânea de moléculas.



Fonte: (YUAN et al., 2022).

Face ao exposto, apesar das vantagens sobre as demais vias, até o momento, um número muito limitado de fármacos tem sido utilizado topicamente para o tratamento do CPNM, sendo este número ainda mais restrito para aqueles aplicáveis à TFD (HAQUE et al., 2015). Fotossensibilizantes como a AICIPc, que reúne propriedades fotofísicas que a tornam um excelente candidato ao propósito, exhibe, em contrapartida, características físico-químicas que dificultam ou mesmo inviabilizam sua administração cutânea direta ($MM = 540$ kDa e \log

P = 7,3) (CALORI; TEDESCO, 2020; REIS et al., 2019). Com o objetivo de contornar tais características, a incorporação da ALCIPc em nanocarreadores têm sido largamente explorada (ALMEIDA et al., 2018, 2022; CALORI; TEDESCO, 2020; REIS et al., 2019). Todavia, quando se almeja a via tópica como rota de administração, o uso de promotores de absorção cutânea pode, adicionalmente, ser adotado como estratégia e, combinada à nanotecnologia, otimizar e potencializar a entrega e liberação do fármaco (ALMEIDA et al., 2018; KHAN et al., 2022; PADYA et al., 2021; YUAN et al., 2022).

3.6. Nanotecnologia e suas aplicações na terapia do câncer

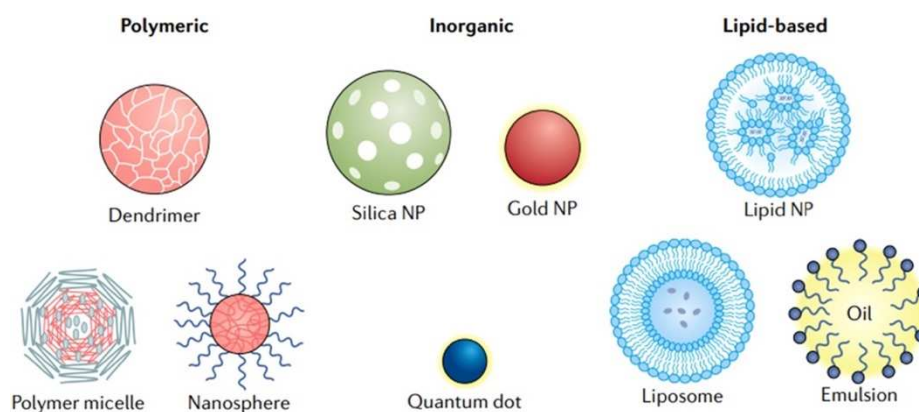
De forma bastante abrangente, a nanotecnologia se baseia na tradução das teorias da nanociência para aplicações práticas por meio da manipulação de materiais em escala nanométrica (BAYDA et al., 2020). A generalidade de sua definição reflete a multidisciplinaridade do termo, uma vez que a nanotecnologia, enquanto seguimento de pesquisa, engloba produtos, processos e propriedades em nanoescala de interesse para as áreas da química, física e biologia, bem como para todas aquelas que perpassam ou se relacionam a estas (MORROW; BAWA; WEI, 2007; QIDWAI et al., 2020). Aplicada às áreas médica e biotecnológica, a nanomedicina, como passa a ser chamada, tem revolucionado o manejo de diferentes doenças, principalmente do câncer, em decorrência de sua aplicabilidade no diagnóstico e na entrega alvo-direcionada de fármacos, por exemplo (ADNANE; EL-ZAYAT; FAHMY, 2022; JING et al., 2022). Dentre os produtos da nanomedicina, os nanocarreadores ocupam um lugar de destaque.

Os nanocarreadores, como a denominação sugere, caracterizam-se como sistemas de carregamento e liberação de fármacos ou correlatos que, usualmente, apresentam tamanho de partícula de até 500 nm (DASTIDAR; GHOSH; DAS, 2022). Como mostra a Figura 8, tais estruturas podem se apresentar de forma uni, bi ou tridimensional, com natureza lipídica (lipossomas, micelas, nanopartículas lipídicas sólidas), polimérica (dendrímeros, micelas poliméricas, nanoesferas) e inorgânica (nanopartículas de sílica, de ouro, quantum dots) (ADNANE; EL-ZAYAT; FAHMY, 2022). O interesse crescente em sua aplicação na terapia e diagnóstico do câncer está centrada em algumas propriedades particulares às nanopartículas.

Em primeiro lugar, o seu tamanho nanométrico as confere a habilidade de acúmulo passivo no sítio tumoral por usufruto do efeito de retenção e permeabilidade aumentadas (do inglês *Enhanced Permeability and Retention Effect*, EPR) (JING et al., 2022; LI et al., 2021).

Quando a difusão deixa de ser suficiente para suprir as necessidades nutricionais das células tumorais, em rápida e intensa proliferação, novos vasos sanguíneos são formados de maneira desorganizada, resultando em ausência de membrana basal e presença de poros de 100 nm a 2 µm de diâmetro. Portanto, como consequência do processo angiogênico aberrante no tecido tumoral, têm-se o efeito EPR (KALYANE et al., 2019).

Figura 8. Principais tipos de nanocarreadores empregados como sistemas de liberação de fármacos.



Fonte: (ADNANE; EL-ZAYAT; FAHMY, 2022).

Outra marcante vantagem dos nanocarreadores consiste na possibilidade de funcionalização de sua superfície com moléculas de interesse. A proliferação descontrolada das células tumorais leva à expressão de proteínas anômalas, bem como à superexpressão de receptores naturalmente presentes nas células normais (DASTIDAR; GHOSH; DAS, 2022). Desse modo, tais marcadores de superfície podem ser utilizados como alvos farmacológicos de moléculas ancoradas no exterior da nanopartícula para as quais estes exibem especificidade de ligação (SANTOS et al., 2020; SHAH et al., 2021). Para gerar o acúmulo ativo dos nanocarreadores no sítio tumoral, podem ser utilizados anticorpos monoclonais (mAbs) (ELOY et al., 2020; PETRILLI et al., 2017), peptídeos (GANBOLD et al., 2019; SAWAN et al., 2022), ácidos nucleicos (HU et al., 2022; SHAH et al., 2021) e polímeros (ELOY et al., 2020; KOMSTHÖFT et al., 2022), por exemplo. Assim como o acúmulo passivo, o direcionamento ativo dos nanocompósitos não apenas diminui os efeitos adversos associados ao fármaco, por preservar o tecido saudável, mas também reduz a dose necessária deste para o alcance do efeito terapêutico (DASTIDAR; GHOSH; DAS, 2022).

A funcionalização das nanopartículas pode ainda lhes conferir maior tempo de circulação no organismo. A ancoragem do polímero polietilenoglicol (PEG), especificamente, à membrana dos nanocarreadores, denominada peguilação, causa o impedimento estérico da interação entre estes e as opsoninas, moléculas do sistema imunológico responsáveis por mediar

a depuração de agentes exógenos. Consequentemente, há o aumento do tempo de meia-vida do fármaco. Além disso, o impedimento estérico ocasionado pela peguilação aplica-se, de forma semelhante, à interação entre as nanopartículas em suspensão, favorecendo também a estabilidade da formulação (ELSADEK; ABU LILA; ISHIDA, 2019; GAJBHIYE et al., 2020; SHAH et al., 2021). Por esses motivos, a peguilação foi utilizada como estratégia em muitos nanomedicamentos disponíveis no mercado, e permanece sendo explorada por aqueles que ainda se encontram em desenvolvimento (ELOY et al., 2020; ELSADEK; ABU LILA; ISHIDA, 2019; PETRILLI et al., 2017).

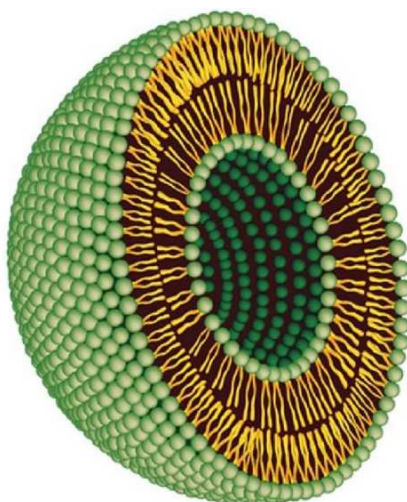
A encapsulação de fármacos permite ainda a melhora de suas características farmacocinéticas e, por consequência, a viabilização de sua administração, uma questão que já se provou crítica para o desenvolvimento de novas plataformas e estratégias terapêuticas, como a TFD (SHAH et al., 2021). Características como tamanho, forma, carga e arranjo superficiais, que são determinantes para os processos de absorção, distribuição, metabolismo e excreção de um fármaco, podem ser modificadas em uma nanopartícula de modo a torná-la compatível com a via de administração planejada para o composto carregado, ainda que este em si não seja (GIODINI et al., 2017). Neste cenário, uma revisão sistemática e metanálise foi conduzida com o objetivo de determinar se a associação entre a TFD e a nanotecnologia aumentava a efetividade do tratamento do carcinoma celular escamoso (CCE). Como resultado, o estudo apontou que a TFD, quando mediada por um nanocarreador como sistema de liberação do fármaco, aumentava a capacidade de inibição do crescimento tumoral em 52% ($p < 0,0001$). O trabalho de Ferrisse e colaboradores (2022) demonstrou ainda que o fotossensibilizador e a nanopartícula mais explorados para este propósito foram a protoporfirina IX e os lipossomas, respectivamente (FERRISSE et al., 2022).

3.6.1. Lipossomas como sistemas de liberação de fármacos

A história dos lipossomas como sistemas de liberação de fármacos teve início em 1964, com a publicação do estudo de Bangham e Horne que descrevia, pela primeira vez, vesículas fosfolipídicas multilamelares visualizadas por microscopia eletrônica (BANGHAM; HORNE, 1964; DEAMER, 2010; LARGE et al., 2021). Desde então, os lipossomas se tornaram os carreadores lipídicos mais explorados para o desenvolvimento de novas terapias oncológicas (SOUTO et al., 2022). Não por acaso, o primeiro nanomedicamento aprovado pelo FDA para esta proposta baseava-se em uma formulação lipossomal peguilada de doxorrubicina (DOX)

que, sob o nome comercial Doxil, foi indicado para o tratamento de sarcoma de Kaposi (ZHU; LIAO, 2015). Estruturalmente, os lipossomas se apresentam como vesículas constituídas por uma bicamada de fosfolipídios anfipáticos que se organizam espontaneamente em formato esférico quando em meio aquoso (Figura 9). Desse modo, as cabeças polares encontram-se voltadas para as porções hidrofílicas do meio, e as caudas apolares estão voltadas para si no interior da bicamada (LARGE et al., 2021).

Figura 9. Lipossoma em corte transversal, com as porções hidrofílicas dos fosfolipídios em verde, e porções hidrofóbicas em amarelo.

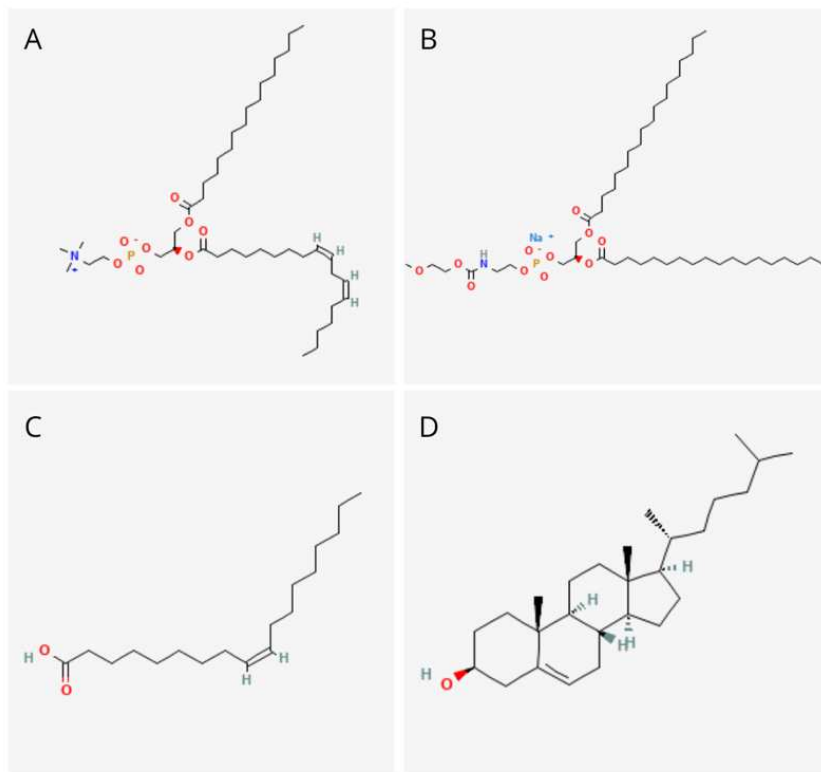


Fonte: adaptado de (BOZZUTO; MOLINARI, 2015).

Sua representação estrutural revela a primeira grande vantagem dos lipossomas sobre os demais carreadores de fármacos, que se baseia na possibilidade de incorporação de moléculas hidrofílicas, dispersas no núcleo aquoso do nanocarreador, bem como de compostos hidrofóbicos, acomodados no interior da bicamada lipídica, ao mesmo tempo (SOUTO et al., 2022). Ademais, a grande similaridade, tanto estrutural quanto composicional, entre a bicamada fosfolipídica dos lipossomas e a membrana celular de mamíferos as confere marcantes estabilidade e biodegradabilidade (LARGE et al., 2021). Enquanto as primeiras formulações desenvolvidas empregavam exclusivamente lipídeos naturais, as mais recentes podem derivar da combinação de lipídeos naturais ou sintéticos, polissacarídeos, esteróis e/ou surfactantes com o objetivo de otimizar sua potencialidade terapêutica (BOZZUTO; MOLINARI, 2015; LARGE et al., 2021). No presente trabalho, foram adotados como constituintes da matriz lipídica dos lipossomas a fosfatidilcolina de soja (SPC), o colesterol (COL) e o ácido oleico (AO), lipídios naturais, além do 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N[metoxi(polietilenoglicol)-

2000] (DSPE-PEG₂₀₀₀), um lipídio sintético. A Figura 10 exibe as estruturas químicas destes compostos.

Figura 10. Estruturas químicas do SPC (A), DSPE-PEG₂₀₀₀ (B), ácido oleico (C), colesterol (D).



Fonte: PUBCHEM, 2022.

A escolha da composição dos lipossomas bem como da proporção na qual cada um dos constituintes estará presente na matriz lipídica é fundamental para o sucesso terapêutico do nanocarreador. Cada lipídio apresentará, por exemplo, um grau de insaturação da cadeia alquil, uma temperatura de transição de fase (T_c) e uma carga líquida do grupo polar particulares. É a combinação das características de cada um dos constituintes da bicamada lipídica que espelhará o comportamento físico, químico e biológico dos lipossomas como formulação final. A estabilidade e flexibilidade das vesículas, o teor de encapsulação de fármaco e a sua velocidade de liberação, a carga superficial dos lipossomas, bem como os seus aspectos farmacocinéticos são diretamente dependentes do adequado planejamento da formulação (LARGE et al., 2021). Ao passo que o uso de lipídios de longa cadeia apolar e com maior grau de insaturações, como o SPC e o AO, favorece a maleabilidade da membrana, o carregamento de fármacos hidrofóbicos e sua liberação mais rápida, altos teores de colesterol podem exercer o efeito contrário (BOZZUTO; MOLINARI, 2015; LARGE et al., 2021). Já a presença do DSPE-PEG₂₀₀₀

contribuiu para o aumento do tempo de circulação do nanocarreador pelo mecanismo de peguilação, como abordado anteriormente (SHAH et al., 2021).

A aplicação de lipossomas no tratamento de doenças cutâneas foi inicialmente proposta na década de 80, com o estudo de Mezei e Gulasekharam (KRISHNAN; MITRAGOTRI, 2020; MEZEI; GULASEKHARAM, 1980). Dentre os principais fatores que afetam o desempenho dos lipossomas como sistemas de liberação de fármacos por via tópica, podem ser destacados o seu tamanho, sua carga superficial e a flexibilidade de sua membrana. No entanto, é importante ressaltarmos que a adequada penetração e permeação cutânea dos nanocarreadores não pode ser prevista por apenas um dos parâmetros, sendo muito mais dependente da combinação destes (DYMEK; SIKORA, 2022). No estudo de Verma (2003), demonstrou-se que lipossomas com tamanho superior a 600 nm permaneciam majoritariamente retidos ao estrato córneo, e somente partículas com até 300 nm exibiam a capacidade de atingir as camadas mais profundas da derme (VERMA et al., 2003).

A respeito do efeito da carga superficial dos nanocarreadores sobre sua penetração cutânea, por outro lado, os resultados são conflitantes. Posto que o estrato córneo é negativamente carregado, levantou-se a hipótese de que moléculas de carga positiva teriam a sua penetração cutânea favorecida por atração eletrostática. Apesar de muitos estudos darem suporte a esta hipótese (CHOI et al., 2017; LEE; LIM; LEE, 2019), vários outros trabalhos demonstraram que lipossomas negativamente carregados exibiram penetração cutânea superior, quando comparados aos de carga positiva ou neutros (DOPPALAPUDI et al., 2017; IBARAKI et al., 2019; KRISHNAN; MITRAGOTRI, 2020; RISALITI et al., 2018). Por fim, vesículas lipídicas com maior deformabilidade tendem a exibir maior facilidade em ultrapassar o EC quando comparadas às de maior rigidez (DYMEK; SIKORA, 2022).

Em um trabalho de revisão publicado em 2015, Bozzuto & Molinari discorreram sobre nanomedicamentos baseados em lipossomas que se encontravam disponíveis no mercado ou em testes clínicos. Dos 84 produtos levantados, apenas 3 foram associados ao câncer de pele como indicação primária, nenhum deles baseava-se na TFD como estratégia terapêutica e apenas um direcionava-se especificamente aos tipos não-melanoma (BOZZUTO; MOLINARI, 2015). A dimericina, nome comercial do produto, é um nanomedicamento de uso tópico baseado em uma loção lipossomal da enzima T4 endonuclease V e está em fase 2 dos testes clínicos. O estudo investiga a eficácia do medicamento na prevenção da recorrência do CPNM em ambos os seus subtipos, CBC e CCE, bem como de lesões pré-cancerosas, como a ceratose actínica (*National Library of Medicine* [NLM], NCT00089180). Em contrapartida, os artigos de pesquisa focados na encapsulação de fotossensibilizadores em lipossomas visando o

tratamento do CPNM são vastos, e podem ser encontrados para o 5-ALA, temoporfirina, curcumina e ftalocianina de zinco, por exemplo, como revisado por diferentes trabalhos (AKHTAR; KHAN, 2016; FERRISSE et al., 2022; MENDES et al., 2022).

Não foram encontrados estudos envolvendo a AICIPc, fotossensibilizador adotado neste trabalho, encapsulada em lipossomas no tratamento no CCE cutâneo, especificamente. Todavia, Longo e colaboradores (2009) investigaram o potencial terapêutico do fármaco encapsulado em lipossomas no tratamento do carcinoma escamoso oral. Na ausência de irradiação luminosa, a nanopartícula exibiu pobre toxicidade, mas a TFD mediada pelo fármaco encapsulado alcançou 90% de necrose tumoral (FAN et al., 2020; LONGO et al., 2009). Calori e Tedesco (2016), por outro lado, desenvolveram quatro lipossomas compostos por proporções distintas de colesterol, DSPC e DPOC, lipídios sintéticos, que foram incorporados com a AICIPc. Apesar de o fármaco ter demonstrado agregação no interior das vesículas lipídicas, esta era revertida após a internalização da nanopartícula por células de carcinoma escamoso oral, diferentemente da autoagregação sofrida em meio aquoso. Tal resultado reforça o potencial terapêutico dos lipossomas como carreadores para a AICIPc aplicada à TFD, bem como para demais fotossensibilizadores hidrofóbicos (CALORI; TEDESCO, 2016; FAN et al., 2020).

3.7.Promotores de absorção cutânea

Dada a complexidade composicional da pele e todos os desafios relacionados a penetração de moléculas para e através desta, agentes facilitadores têm sido largamente empregados, sozinhos ou em associação aos nanocarreadores, para a otimização da administração tópica de fármacos (YUAN et al., 2022). Os promotores de absorção cutânea, como são chamados, são comumente divididos entre agentes químicos e métodos físicos capazes de comprometer a função de barreira do estrato córneo (EC) e demais camadas dérmicas (CHAMPEAU et al., 2019). Dentre as classes de substâncias químicas capazes de desempenhar este papel, estão os álcoois, surfactantes, amidas, ésters, glicóis, sulfóxidos, fosfolipídios e ácidos graxos, por exemplo (LANE, 2013; WILLIAMS; BARRY, 2012). Já dentre os principais métodos físicos aplicados à facilitação do transporte dérmico de substâncias estão a iontoforese, a sonoforese e o microagulhamento, tendo em vista a possibilidade de aumento do sucesso terapêutico de tratamentos tópicos utilizando estratégias não invasivas (PADYA et al., 2021; WAGHULE et al., 2019).

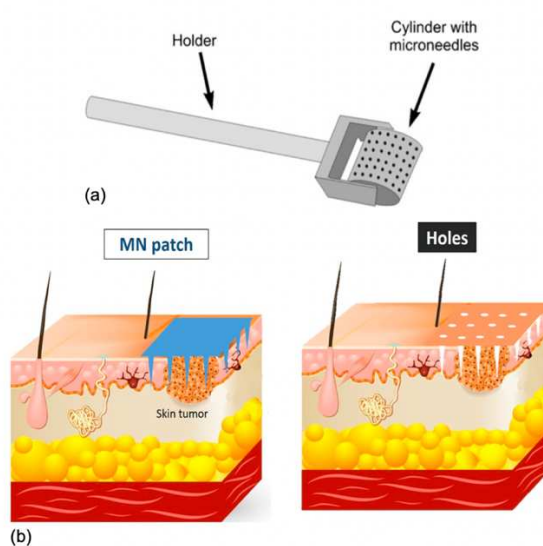
Neste trabalho, visando a máxima otimização da penetração cutânea da AICIPc, ambas as estratégias foram exploradas por meio do uso de um método físico, o

microagulhamento, bem como de um promotor químico, o ácido oleico. Destaca-se que não foram encontrados na literatura trabalhos prévios que tenham estudado a associação do microagulhamento a lipossomas contendo o ácido oleico (AO) no melhoramento da penetração cutânea da AICIPc, o que evidencia o caráter inovador deste estudo.

3.7.1. Microagulhamento

O microagulhamento consiste na submissão da superfície da pele a um dispositivo repleto de agulhas de tamanho micrométrico, resultando na ruptura temporária do estrato córneo por ação mecânica. Com a aplicação deste método físico, microporos são abertos na principal barreira à penetração tópica de fármacos (Figura 11), abrindo caminho para o transporte direto de moléculas para a epiderme e camadas superficiais da derme (WAGHULE et al., 2019; YUAN et al., 2022). Com o comprometimento da integridade do estrato córneo, moléculas hidrofílicas e de alto peso molecular passam a ser capazes de se difundir através dos tecidos cutâneos (CHAMPEAU et al., 2019). Em termos macroscópicos, os dispositivos que portam as microagulhas podem se apresentar de duas principais formas, como mostra a Figura 11, fixadas a pequenos cilindros de rolamento (a), ou a fragmentos planos, os chamados “patches” (b) (CHAMPEAU et al., 2019).

Figura 11. Dispositivos utilizados para o microagulhamento da pele, (a) patch e (b) dermarroler.



Fonte: (CHAMPEAU et al., 2019).

Em termos microscópicos, por outro lado, há uma vasta gama de possibilidades de materiais de constituição, formatos, dimensões e tipos de agulhas que podem ser utilizadas para facilitar a entrega de fármacos. A respeito dos tipos, as microagulhas podem ser subdivididas em três grupos principais: sólidas, dissolvíveis e ocas (YAMADA; PROW, 2020; YUAN et al., 2022). As dimensões das agulhas também são um parâmetro de relevância para a adequabilidade do dispositivo ao propósito terapêutico. Posto que a derme abriga uma rica rede de vasos sanguíneos e terminações nervosas, o comprimento das microagulhas empregadas comumente varia de 150 a 1500 μm . Desse modo, é suficiente para ultrapassar o EC e chegar à epiderme e às camadas superficiais da derme em alguma extensão, mas não para lesionar as enervações, mantendo o procedimento indolor e pouco invasivo (WAGHULE et al., 2019). Por fim, as microagulhas podem ainda ser fabricadas em diferentes materiais, como silicone, metal e polímeros, carregando, portanto, diferentes propriedades. As de natureza metálica, principalmente titânio, possuem como vantagens boas propriedades mecânicas e biocompatibilidade, sendo resistentes o suficiente para evitar o seu rompimento durante a inserção na pele, diferentemente das de silicone, por exemplo (WAGHULE et al., 2019; YAMADA; PROW, 2020).

As microagulhas tem sido largamente exploradas nas áreas cosmética, para a prevenção e manejo do envelhecimento da pele, e médica, para a administração de vacinas e fármacos aplicáveis ao diagnóstico e tratamento de diversas doenças, como o câncer de pele e lesões precursoras (JAIN; HURKAT; JAIN, 2019; LI et al., 2021; NAGUIB; KUMAR; CUI, 2014; YAMADA; PROW, 2020). Seu emprego na melhora da penetração cutânea de agentes fotossensibilizadores aplicáveis à TFD também foi observada em alguns trabalhos. Jain et al. (2016) investigaram a penetração cutânea e a ação antitumoral do 5-ALA em duas modalidades distintas: incorporado a um creme aplicado sobre a pele pré-tratada por microagulhamento, ou por meio do tratamento da pele com microagulhas sólidas revestidas com o fármaco por 5 minutos. As agulhas utilizadas no estudo eram metálicas, compostas de titânio e com 700 μm de comprimento. Ambos os grupos alcançaram concentrações similares de protoporfirina IX, produto metabólico do 5-ALA, e superiores aos grupos não associados ao método físico, bem como progressão tumoral interrompida após 12 dias (JAIN; HURKAT; JAIN, 2019). Dois ensaios clínicos foram conduzidos para avaliar se o uso do microagulhamento poderia potencializar a eficácia de formulações em creme contendo o 5-ALA em pacientes com ceratose actínica. Os resultados obtidos foram semelhantes, e mostraram que o pré-tratamento da pele com microagulhas sólidas de 200 μm (PETUKHOVA et al., 2017) e 690 μm (LEV-TOV et al.,

2017) alcançava recuperação equiparável ao tratamento convencional, mas em um terço do tempo de incubação deste.

Também foram encontrados trabalhos que exploraram a associação entre nanocarreadores e o microagulhamento na entrega tópica e transdérmica de fármacos. Donnelly e colaboradores investigaram a penetração cutânea de nanopartículas poliméricas hidrofílicas contendo o fotossensibilizador vermelho do Nilo. Estas foram incorporadas à microagulhas dissolvíveis de aproximadamente 600 μm ou, no grupo controle, à *patches* incapazes de romper o estrato córneo. Como resultado, com as microagulhas dissolvíveis, o fotossensibilizador penetrou a pele em maiores quantidades e maior extensão (DONNELLY et al., 2010). Bellefroid et al. (2019), por outro lado, estudaram a penetração cutânea de lipossomas associados ao microagulhamento prévio da pele com agulhas metálicas de 500 μm , 800 μm e 1400 μm . Como esperado, os resultados demonstraram que quanto maior o comprimento das agulhas utilizadas, maior o débito de penetração dos nanocarreadores (BELLEFROID et al., 2019).

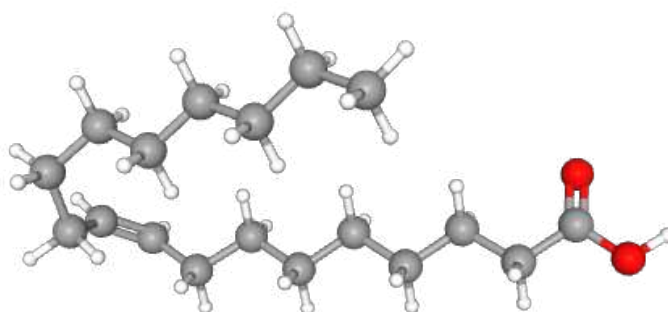
Trabalhando com a AlCIPc, Reis et al. (2019) desenvolveram complexos do fotossensibilizador conjugado à hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP- β CD), um oligossacarídeo cíclico, aplicáveis ao tratamento do melanoma. Em seguida, a penetração cutânea do complexo foi avaliada mediante os seguintes procedimentos prévios: remoção do estrato córneo (*tape stripping*), microagulhamento da pele com agulhas sólidas de titânio ou iontoforese. Apesar de terem sido testadas agulhas de 500 μm , 1000 μm e 2000 μm , nenhum dos dispositivos alcançou quantidades superiores a 1nmol de fármaco recuperado da pele (REIS et al., 2019). Ademais, como apontado por Yamada & Prow (2020), os trabalhos acadêmicos que relatam a aplicação do microagulhamento no tratamento do CPNM, especificamente, são escassos (YAMADA; PROW, 2020). Utilizando as palavras-chave “microneedles” e “squamous cell carcinoma” na Livraria Nacional de Medicina (*National Library of Medicine* [NLM]), apenas dois estudos clínicos foram encontrados. Um deles, agora em fase 2, avaliará a eficácia de microagulhas dissolvíveis contendo doxorrubicina (DOX) no tratamento do CCEc, e tem data de conclusão prevista para dezembro de 2024 (*National Library of Medicine* [NLM], NCT05377905).

3.7.2. Ácido oleico

Dentre os ácidos graxos que detém a habilidade de melhorar a penetração cutânea de compostos, o ácido oleico (AO) é o mais popular, e se apresenta como uma molécula monoinsaturada de estrutura química $\text{C}_{18}\text{H}_{34}\text{O}_2$ (Figura 12) (WILLIAMS; BARRY, 2012;

PUBCHEM, 2022). Pode ser encontrado em diversos alimentos, principalmente em óleos de origem vegetal, como o óleo de oliva, e seu consumo tem sido relacionado à melhora de funções fundamentais para a homeostase do organismo (ATEF et al., 2022). Foi o conhecimento de que o AO atua no metabolismo lipídico cutâneo, impactando diretamente, portanto, o estrato córneo como barreira e o conteúdo hídrico da pele, que o fez largamente utilizado pela indústria de cosméticos e despertou o interesse por sua aplicabilidade na promoção da absorção tópica de fármacos (ATEF et al., 2022; MANK; POLONSKA, 2016).

Figura 12. Estrutura química tridimensional do ácido oleico em sua conformação *cis*.



Fonte: PUBCHEM, 2022.

O efeito de melhora da penetração cutânea de compostos promovida pelo AO se dá por dois principais mecanismos: perturbação dos lipídios presentes no EC e separação de fases entre estes e o AO. Ongpipattanakul et al. (1991), por meio de espectroscopia do infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR), demonstraram que o AO interage com os lipídeos presentes no EC reduzindo a sua temperatura de transição de fase (T_c). Por consequência, em temperaturas acima de T_c , há o aumento da flexibilidade conformacional das cadeias alquil dos lipídios endógenos, fluidização destes e diminuição da resistência ao fluxo de molécula através do EC (ONGPIPATTANAKUL et al., 1991). Em adição, Naik et al. (1995) confirmaram, posteriormente, a hipótese de que, enquanto os lipídeos da matriz extracelular do EC encontram-se em um estado sólido, o AO que é absorvido pela barreira cutânea permanece em um estado fluido e desorganizado. Desse modo, pequenas fendas são abertas na “argamassa” do modelo de “argamassa e tijolos” do EC, facilitando a passagem de compostos através deste. Todavia, os autores também demonstraram que a habilidade de promoção da absorção cutânea só é exibida pelo isômero *cis* do AO, pois, nesta conformação, as moléculas do ácido graxo

tendem a se acumularem quando imersas na matriz de lipídeos endógenos saturados (LANE, 2013; NAIK et al., 1995; WILLIAMS; BARRY, 2012).

Almeida et al. (2018; 2022) desenvolveram nanopartículas lipídicas (NL) contendo o AO visando aplicação na TFD do câncer de pele por administração tópica. No primeiro trabalho, NL de ácido esteárico e AO em diferentes proporções (20 e 40% da fase lipídica) tiveram as suas penetração e permeação cutâneas investigadas junto à nanocarreadores sem o promotor de absorção e uma solução de AICIPc livre. Os autores demonstraram que a adição do AO ao nanocarreador diminuía sua retenção ao EC e promovia o acúmulo do fármaco nas camadas mais profundas da pele. Além disso, a concentração de AICIPc recuperada das camadas epidérmica e dérmica aumentava conforme aumentava-se também a proporção de AO nas nanopartículas de 20% para 40% (ALMEIDA et al., 2018). No estudo mais recente, nanocarreadores lipídicos nanoestruturados (NLN) contendo o AO e carregados com a AICIPc foram funcionalizados com quitosana. No trabalho, o ensaio de penetração cutânea foi realizado, mas com o objetivo de comparar o efeito da funcionalização da superfície do nanocarreador nesta, não sendo possível detectar o efeito isolado do AO no transporte dérmico das nanopartículas. Os resultados apontaram que, funcionalizados ou não, os NLN penetraram o EC satisfatoriamente e foram capazes de liberar quantidades semelhantes de AICIPc na epiderme e na derme, mas que a funcionalização aumentava a velocidade do transporte (ALMEIDA et al., 2022).

Visando a otimização da terapia do câncer de pele por via tópica, o AO foi aplicado ainda como promotor da penetração cutânea de outros fármacos, como o 5-ALA (PIERRE et al., 2006), a piplartina (GIACONE et al., 2020), a ftalocianina de zinco (DA SILVA et al., 2011) e a temozolamida (SUPPASANSATORN et al., 2007).

3.8.Design de experimentos: Planejamento fatorial de Box-Behnken

O desenvolvimento de uma nova formulação farmacêutica baseada em um sistema de liberação de fármacos requer a combinação de diferentes excipientes e procedimentos sob condições específicas para que seja obtido um produto com eficácia e qualidade satisfatórias (JAIN; HURKAT; JAIN, 2019). Por esse motivo, para a otimização deste processo, podem ser adotadas abordagens que possibilitem o estudo da relação entre os fatores determinantes para este, chamados de variáveis independentes, e as respostas produzidas quando os fatores são alterados, chamadas de variáveis dependentes (SOLANKI; PARIKH; PARIKH, 2007). Para o desenvolvimento de um lipossoma, por exemplo, podem ser citados como fatores determinantes

aqueles críticos para a formulação, como proporção de fármaco, e para o processo, como temperatura de síntese. Alterações nestes fatores podem gerar modificações em respostas críticas para a qualidade do produto, como tamanho de partícula (JAIN; HURKAT; JAIN, 2019).

Tradicionalmente, a otimização do processo é feita alterando-se um fator por vez, enquanto os demais são mantidos constantes. Todavia, por esta abordagem, não é possível detectar a interação entre diferentes fatores, que pode ser determinante para as respostas produzidas (FERREIRA et al., 2007; JAIN; HURKAT; JAIN, 2019; SOLANKI; PARIKH; PARIKH, 2007). Por esse motivo, a técnica de delineamento estatístico de experimentos (DOE, do inglês *design of experiments*) propõe abordagens multivariadas e sistemáticas, que têm se mostrado mais adequadas. Dentre estas, o método de superfície de resposta (MSR) se apresenta como uma ferramenta estatística eficaz. No MSR, é estabelecida uma relação entre os fatores, variados simultaneamente, e as respostas obtidas, de modo a fornecer uma melhor compreensão da interação entre estes. Há, por consequência, a identificação de ótimas condições de desenvolvimento da formulação e do processo com um número mínimo de experimentos, com menor consumo de insumos e tempo de trabalho (DAS; MISHRA, 2017; FERREIRA et al., 2007; JAIN; HURKAT; JAIN, 2019).

Dentre os modelos existentes que pertencem ao MSR, o design Box-Behnken (DBB) é um dos mais eficientes para análise multifatorial, e pode ser aplicado no desenvolvimento de formulações farmacêuticas (SARKAR; BHATTACHARYA; PAL, 2019). O modelo Box-Behnken pode ser empregado para a análise de superfície de resposta de 3-10 fatores (X) que, por sua vez, são considerados em três níveis distintos: baixo, médio e alto, codificados como -1, 0 e +1 (JAIN; HURKAT; JAIN, 2019). Tais fatores (variáveis independentes) podem ser de natureza qualitativa ou quantitativa (FERREIRA et al., 2007). O número de experimentos necessários aplicando-se este planejamento fatorial será definido pela equação 1.

$$N = 2k(k - 1) + C_0 \quad (1)$$

Onde k representa o número de fatores e C_0 é o número de pontos centrais. Para expressar a(s) resposta(s) predita(s) (Y) em função de um fator ou variável independente (X), podem ser aplicados diferentes modelos matemáticos. Um dos mais utilizados é o modelo de

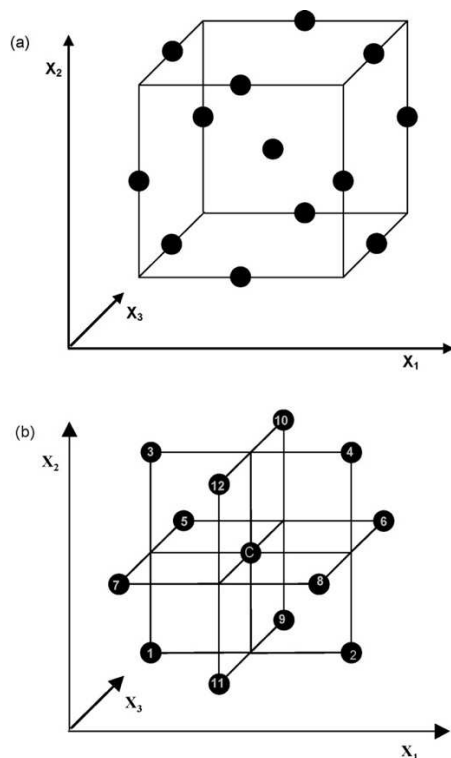
regressão polinomial de segunda ordem, representado pela equação (2), gerada por softwares estatísticos:

$$Y_i = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_{12}X_1X_2 + b_{13}X_1X_3 + b_{23}X_2X_3 + b_{11}X_1^2 + b_{22}X_2^2 + b_{33}X_3^2 \quad (2)$$

Na qual Y_i é a variável dependente, B_0 a resposta média aritmética das execuções, B_{1-33} são os coeficientes estimados para os fatores correspondentes X_i ($X_1, X_2, X_3, X_1X_2, X_1X_3, X_2X_3, X_1^2, X_2^2, X_3^2$). Enquanto as variáveis independentes (X_1, X_2, X_3), de forma isolada, representam o resultado médio da alteração de um fator por vez, os termos de interação (X_1X_2, X_1X_3, X_2X_3) representam a mudança na resposta correspondente quando dois fatores são alterados em simultâneo. Por fim, os termos polinomiais X_1^2, X_2^2, X_3^2 são incluídos para investigar não-linearidade nas regressões (SUDHAKAR; KRISHNA; MURTHY, 2016).

A Figura 13 apresenta a representação gráfica do projeto Box-Behnken para três fatores em três níveis, que possui conformação cubóide. O desenho experimental consiste em um conjunto de pontos situados no ponto médio de cada aresta e no ponto central replicado do cubo multidimensional. Neste caso, quinze experimentos são necessários, dos quais doze representam o ponto médio de cada aresta do cubo multidimensional e os três restantes são as réplicas do ponto central do cubo (FERREIRA et al., 2007).

Figura 13. Design Box-Behnken para três fatores em três níveis representando por um cubo (a) ou como três designs fatoriais 2^2 interligados (b).



Fonte: (FERREIRA et al., 2007).

Como vantagens frente aos demais designs de superfície de resposta, o DBB não expressa combinações nas quais todos os fatores se encontrem simultaneamente em seus níveis mais altos ou mais baixos. Nessas regiões, devido às condições experimentais extremas, há uma maior probabilidade de obtenção de resultados insatisfatórios (FERREIRA et al., 2007). Em contrapartida, nos pontos centrais e próximos a estes, fornece estimativas de coeficientes fortes (JAIN; HURKAT; JAIN, 2019). Ademais, fornece estimativas do modelo quadrático e detecta falhas de ajuste do modelo (DAS; MISHRA, 2017)

Rane e Prabhakar (2013) empregaram o design Box-Behnken para a otimização do desenvolvimento de lipossomas pH-sensíveis carregados com paclitaxel (PTX). No estudo, as variáveis independentes adotadas foram a razão molar entre os lipídeos fosfatidilcolina e DOPE, a concentração molar de hemissuccinato de colesterol (CHEMS) e a quantidade de fármaco. Como variáveis dependentes destes fatores, buscaram obter maior eficiência de encapsulação do fármaco, sensibilidade ao pH, implicando em alto teor de liberação de PTX no meio, e tamanho de partícula. A análise estatística permitiu identificar as proporções ideais entre os fatores estudados, e foram encontrados os seguintes resultados de respostas para a formulação otimizada: eficiência de encapsulação de 94,37%; liberação de 89,6% do fármaco

e tamanho de partícula de 3,24 μm , em concordância com os valores teóricos estimados após delineamento estatístico (RANE; PRABHAKAR, 2013).

Jayme et al. (2020) adotaram o mesmo modelo aplicando-o ao desenvolvimento de filmes poliméricos de DNA como sistema de liberação para a AICIPc. Os autores almejavam obter, como respostas, máximas absorvâncias, intensidade e rendimento quântico de fluorescência. Para tanto, adotaram como variáveis independentes a concentração de DNA, a concentração de AICIPc e a proporção água: etanol na solução binária. Os resultados obtidos através do planejamento estatístico permitiram a obtenção de uma formulação otimizada, revelando as concentrações ideais dos fatores explorados para tanto (CERON JAYME; FERREIRA PIRES; TEDESCO, 2020).

Tomadas em conjunto, as informações expostas sugerem que a encapsulação da AICIPc em lipossomas, bem como o uso de promotores químicos e/ou físicos de absorção, pode representar estratégias promissoras para a viabilização e otimização de sua penetração cutânea. Aplicando lipossomas como carreadores para o fármaco, almeja-se alcançar a máxima eficiência de encapsulação da AICIPc empregando, em contraponto, mínimos teores de excipientes, isto é, os lipídios de membrana. Assim, a segurança e a eficácia terapêutica da formulação são garantidas, e o seu custo de produção é minimizado. (MARITIM; BOULAS; LIN, 2021; ALMEIDA et al., 2018; ALMEIDA et al., 2022). Ademais, como abordado anteriormente, a composição da matriz lipídica adotada determinará parâmetros como tamanho de partícula, carga superficial e polidispersividade, essenciais para a estabilidade e adequação da formulação à via tópica de administração (MARITIM; BOULAS; LIN, 2021; ALMEIDA et al., 2018; ALMEIDA et al., 2022). Por esse motivo, o planejamento fatorial foi utilizado neste trabalho visando a identificação dos níveis ideais de fármaco e de constituintes da matriz lipídica, que talvez não pudessem ser percebidos empiricamente, para a obtenção das respostas de interesse com um número mínimo de experimentos. Destaca-se ainda que não foram encontrados trabalhos empregando a abordagem de design experimental no desenvolvimento de lipossomas contendo ácido oleico e cloro-alumínio ftalocianina.

4. METODOLOGIA

4.1. Planejamento fatorial de Box-Behnken

Visando a obtenção de uma formulação otimizada de lipossomas compostos por SPC: COL; DSPE-PEG₂₀₀₀:AO e carregados com AICIPc, empregou-se o método de superfície de resposta (MSR) aplicado através do design Box-Behnken com três fatores e três níveis utilizando o software estatístico MiniTab® 16.0 (CERON JAYME; FERREIRA PIRES; TEDESCO, 2020; RANE; PRABHAKAR, 2013). Como variáveis independentes, foram adotadas a quantidade de ácido oleico (AO) (X_1), de fármaco (X_2) e de colesterol (X_3). A Tabela 1 apresenta os níveis nos quais cada um dos fatores foi investigado. Como variáveis dependentes, buscou-se mínimos tamanho de partícula (Y_1) e índice de polidispersividade (PDI) (Y_2), bem como máxima eficiência de encapsulação (EE%) de AICIPc (Y_3), as quais a literatura aponta como determinantes para a estabilidade, qualidade e eficácia dos lipossomas (ALMEIDA et al., 2018; JAIN; HURKAT; JAIN, 2019; VERMA et al., 2003). O delineamento experimental também contou com condições fixas, representadas pela quantidade de fosfatidilcolina de soja (SPC), fixada em 50 mg, a quantidade de DSPE-PEG₂₀₀₀, de 2,5% em relação à composição lipídica total, e as condições de síntese, expostas no tópico a seguir. Aplicando-se a equação (1), apresentada previamente, a distribuição das variáveis resultou em 15 ensaios experimentais (Tabela 2), dos quais os três últimos são uma triplicata das condições centrais do planejamento estatístico.

Tabela 1. Variáveis independentes e seus respectivos níveis, em mg.

Variáveis (mg)	Níveis		
	Baixo (-1)	Médio (0)	Alto (+1)
X_1 = Ác. Oleico (AO)	0 (0%)	1,8 (10%)	3,59 (20%)
X_2 = AICIPc	1,0	2,5	5,0
X_3 = Colesterol (COL)	2,46 (10%)	4,92 (20%)	7,38 (30%)

*valores entre parênteses representam a porcentagem molar em relação à composição lipídica total

Tabela 2. Planejamento fatorial com todas as combinações de variáveis e seus níveis.

Design Box-Behnken			
Experimentos	X ₁ (Ác. Oleico)	X ₂ (AlClPc)	X ₃ (Colesterol)
1	-1	-1	0
2	1	-1	0
3	-1	1	0
4	1	1	0
5	-1	0	-1
6	1	0	-1
7	-1	0	1
8	1	0	1
9	0	-1	-1
10	0	1	-1
11	0	-1	1
12	0	1	1
13	0	0	0
14	0	0	0
15	0	0	0

Fonte: elaborado pelo autor, 2022.

Substituindo os valores dos níveis pelas respectivas quantidades de cada variável independente que representam, têm-se o planejamento fatorial executado experimentalmente, como mostra a Tabela 3.

Tabela 3. Planejamento fatorial com valores experimentais para variáveis independentes.

Design Box-Behnken			
Experimentos	X ₁ = AO (mg)	X ₂ = AlClPc (mg)	X ₃ = COL (mg)
1	0	1	4,92
2	3,59	1	4,92
3	0	5	4,92
4	3,59	5	4,92

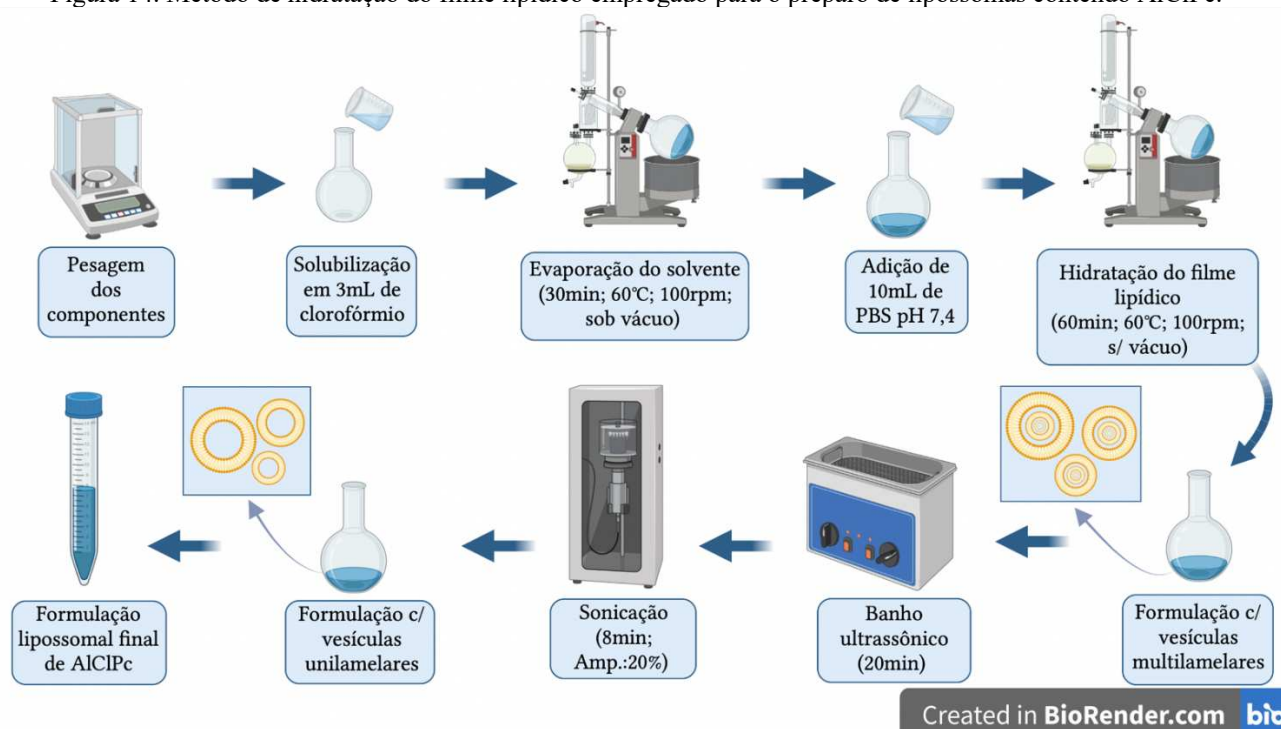
5	0	2,5	2,46
6	3,59	2,5	2,46
7	0	2,5	7,38
8	3,59	2,5	7,38
9	1,8	1	2,46
10	1,8	5	2,46
11	1,8	1	7,38
12	1,8	5	7,38
13	1,8	2,5	4,92
14	1,8	2,5	4,92
15	1,8	2,5	4,92

Fonte: elaborado pelo autor, 2022.

4.2.Preparo dos lipossomas carregados com AICIPc

Os lipossomas carregados com AICIPc foram preparados pelo método de hidratação do filme lipídico de Bangham, seguindo o protocolo proposto por Petrilli et al. (2018), com modificações (Figura 14) (BANGHAM; STANDISH; WATKINS, 1965; PETRILLI et al., 2017). De forma breve, os lipídeos SPC, Colesterol e DSPE-PEG₂₀₀₀ foram pesados, adicionados de AICIPc e Ácido Oleico (AO) e solubilizados em 3 ml de clorofórmio. A mistura resultante foi transferida para um balão de fundo redondo e o solvente orgânico foi evaporado em rota-evaporador (IKA – Modelo RV8) à 60°C e 100 rpm, sob pressão reduzida, durante 30 minutos. O filme lipídico formado foi acrescido de 10 ml de tampão fosfato (PBS pH 7,4) e submetido à hidratação por 60 minutos sob as mesmas condições de ensaio, mas na ausência de vácuo. Por fim, para a redução da lamelaridade e, conseqüentemente, do tamanho das partículas formadas, a dispersão lipossomal foi submetida a banho ultrassônico (Ultronique - Q9.5/25^a) por 20 minutos e, em seguida, ao sonicador de haste (Qsonica – Modelo: Q500) por 8 minutos à amplitude de 20%.

Figura 14. Método de hidratação do filme lipídico empregado para o preparo de lipossomas contendo AICIPc.



Fonte: Elaborada pelo autor utilizando o software BIORENDER, 2022.

4.3.Caracterização físico-química dos lipossomas

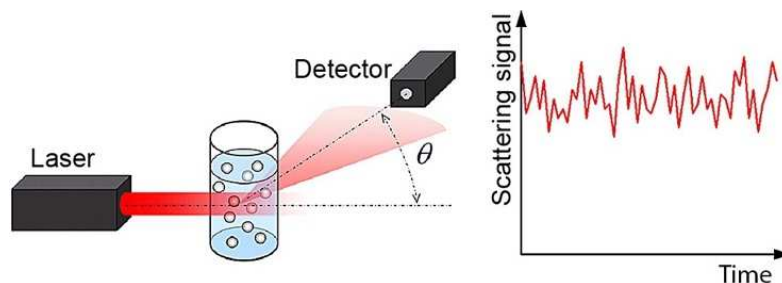
4.3.1. Análise de tamanho de partícula e índice de polidispersividade (PDI)

Para a determinação do tamanho de partícula e do índice de polidispersão (PDI), que representa a faixa de distribuição de tamanhos de partícula, utilizou-se a técnica de espalhamento dinâmico da luz (DLS, do inglês *dynamic light scattering*). Para tanto, utilizando o equipamento Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments), empregou-se um feixe de laser operando a 10 mV HeNe, com comprimento de onda de 633 nm, ângulo de incidência de 175° e temperatura à 25°C. Para a realização da análise, as formulações foram diluídas em água ultrapura (1:10) e dispostas em cubetas próprias.

Em princípio, a técnica se baseia no registro de flutuações no sinal de espalhamento dos feixes luminosos resultantes do rearranjo espacial das partículas em suspensão ocasionado pelo movimento browniano (Figura 15) (BABICK, 2020). Considerando a relação inversamente proporcional entre o tamanho das partículas e a velocidade com a qual se movimentam no meio de suspensão, a taxa de flutuação no sinal de espalhamento é então correlacionada ao seu raio hidrodinâmico e às suas diferentes populações, permitindo a

determinação do tamanho de partícula e da polidispersividade, respectivamente (BRAUN et al., 2011; RAMOS, 2017).

Figura 15. Princípio da técnica de espalhamento dinâmico de luz no equipamento Zetasizer Nano.



Fonte: (BABICK, 2020).

4.3.2. Determinação de potencial zeta (ζ)

À semelhança, o potencial zeta (ζ) das nanopartículas, que se correlaciona à sua carga elétrica residual superficial, foi determinado no equipamento Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments) utilizando a mesma amostra empregada nas análises de determinação de tamanho. No entanto, neste caso, avaliou-se a mobilidade eletroforética das nanopartículas, em cubetas equipadas com eletrodos, quando estas eram submetidas a um campo elétrico. Desse modo, as partículas carregadas eletricamente migraram para os eletrodos de carga oposta a uma velocidade proporcional à magnitude de sua carga (DISALVO; BOUCHET, 2014).

4.3.3. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

As curvas calorimétricas de varredura diferencial (DSC) de amostras de AICIPc livre (matéria prima-pura), lipossoma otimizado branco (isento de fármaco) e lipossoma otimizado contendo AICIPc foram obtidas usando um equipamento de análise térmica simultânea (Jupiter STA 449, Netzsch). A amostra de aproximadamente 6 mg foi adicionada a cadinhos de alumínio selados com tampas perfuradas. A medição foi feita a partir da temperatura ambiente (25 °C, aproximadamente) até a marca de 400 °C, utilizando uma taxa de aquecimento de 10 K.min⁻¹. Os sensores e os cadinhos estavam sob fluxo constante de nitrogênio (70 ml/min) durante o experimento (REIS et al., 2019).

4.3.4. Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros de infravermelho com transformada de Fourier (IR) para o fármaco livre, para lipossomas otimizados com e sem a AICIPc, bem como para o tampão no qual as nanopartículas encontram-se dispersas foram registrados usando um espectrômetro Bruker VERTEX 70V. Os espectros foram obtidos na faixa de 4000 a 150 cm^{-1} , com resolução de 2 cm^{-1} , pelo método de reflectância total atenuada (RTA) em um acessório de platina baseado em um cristal de diamante (ALMEIDA et al., 2018).

4.3.5. Microscopia de força atômica (MFA)

Uma alíquota da dispersão lipossomal otimizada foi depositada sobre uma superfície metálica e mantida em repouso a 36 °C. A amostra foi firmemente fixada à superfície do disco para evitar vibrações, que degradam a resolução da imagem. Para a realização da análise, utilizou-se o equipamento TT-AFM (AFM Workshop - EUA) em modo de contato intermitente, empregando pontas de silicone TED PELLA (TAP300-G10) com amplitude de frequência de aproximadamente 237 kHz. O programa Gwyddion 2.45 foi utilizado para processar as imagens e obter o tamanho, em nanômetros, das nanopartículas. A análise estatística foi realizada utilizando o software GraphPad Prism 6 (WU et al., 2019).

4.3.6. Preparo de curva analítica de AICIPc

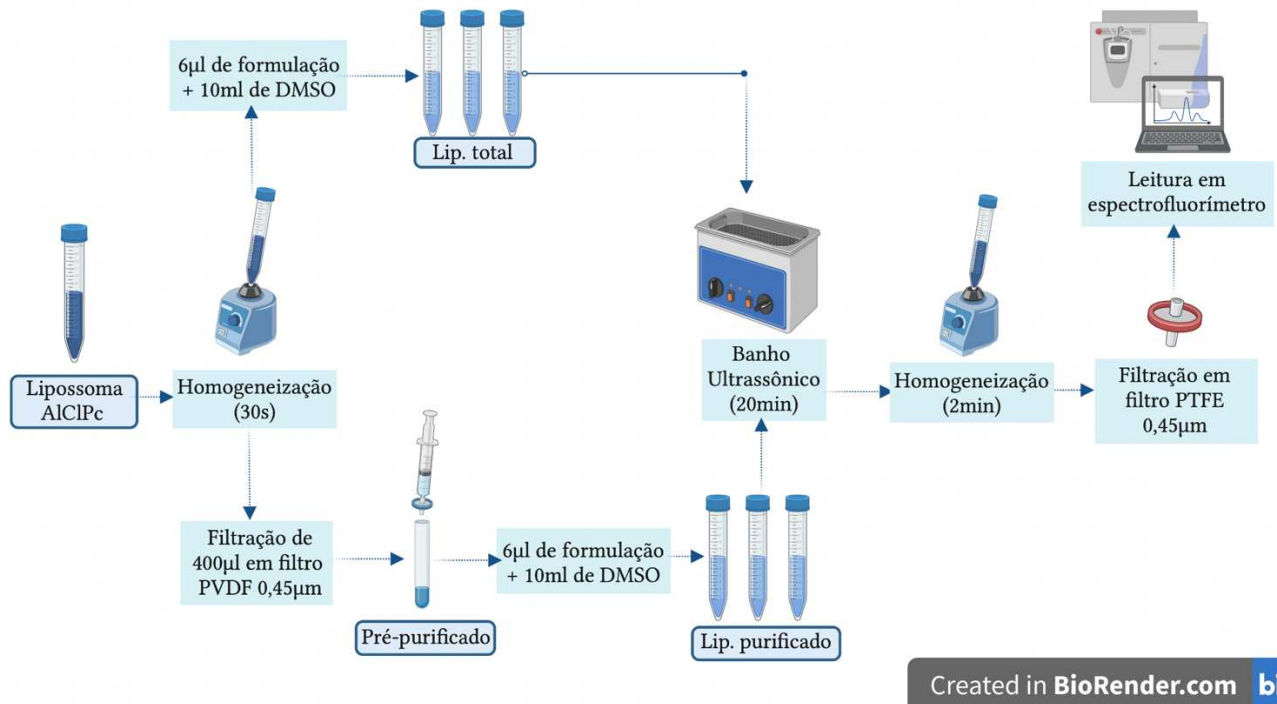
Para tornar possível a determinação da porcentagem de fármaco efetivamente encapsulada nos lipossomas, preparou-se, inicialmente, uma curva analítica de calibração de AICIPc em DMSO às concentrações de 30; 50; 100; 150; 200 ng/ml, em triplicata, a partir de uma solução estoque de fármaco de 20 $\mu\text{g/ml}$. As soluções foram analisadas em espectrofluorímetro (RF6000 – Shimadzu) com comprimento de onda de excitação (λ_{ex}) fixado em 615 nm e comprimento de onda de emissão (λ_{em}) entre 635 a 750 nm, de acordo com a metodologia previamente validada (SIQUEIRA-MOURA et al., 2010). Os picos de fluorescência obtidos foram correlacionados às respectivas concentrações e plotados em Excel® para a confecção de um gráfico de dispersão contendo o coeficiente de correlação (R^2) e a equação da reta, utilizada, posteriormente, para a determinação da concentração de fármaco presente nas amostras.

4.4.7. Eficiência de encapsulação de AlClPc

A eficiência de encapsulação (EE%) de AlClPc foi definida através da metodologia representada na Figura 16, de acordo com o método proposto por Eloy et al. (2016) e Siqueira-Moura et al. (2010), com modificações (ELOY et al., 2016; SIQUEIRA-MOURA et al., 2010). Inicialmente, a formulação foi homogeneizada por 30 segundos em agitador vórtex. Para a obtenção das amostras contendo a fração total de fármaco (Lip. total), em triplicata, 6 µl da formulação (equivalente à concentração teórica de 1,47 µg de AlClPc) foram solubilizados em 10 ml de DMSO aferidos em balão volumétrico. Em contrapartida, para a obtenção das amostras contendo a fração lipossomal do fármaco, 400 µl da formulação foram previamente filtrados em filtros de seringa PVDF de 0,45 µm de porosidade para a remoção do fármaco não encapsulado (pré-purificado). Da alíquota pré-purificada da formulação, do mesmo modo, em triplicata, 6 µl foram solubilizados em 10ml de DMSO (lip. purificado). Em seguida, para garantir o rompimento das vesículas lipídicas e liberação da fração encapsulada do fármaco, ambas as amostras (lip. total e lip. purificado) foram submetidas a 20 minutos de sonicação em banho ultrassônico (Ultronique – Q9.5/25^a) seguidos de 2 minutos de agitação mecânica em vórtex. Por fim, as amostras foram filtradas em filtro PTFE (0,45 µm) e lidas em espectrofluorímetro sob os mesmos parâmetros previamente citados. A porcentagem de AlClPc encapsulada nos lipossomas foi calculada de acordo com a Equação (3), a partir da razão entre a quantidade de fármaco na fração lipossomal e a quantidade de fármaco na fração total da formulação.

$$EE\% = \frac{\text{quantidade de AlClPc purificado } (\mu\text{g})}{\text{quantidade de AlClPc total } (\mu\text{g})} \times 100 \quad (3)$$

Figura 16. Procedimento do ensaio de determinação da eficiência de encapsulação de AICIPc.

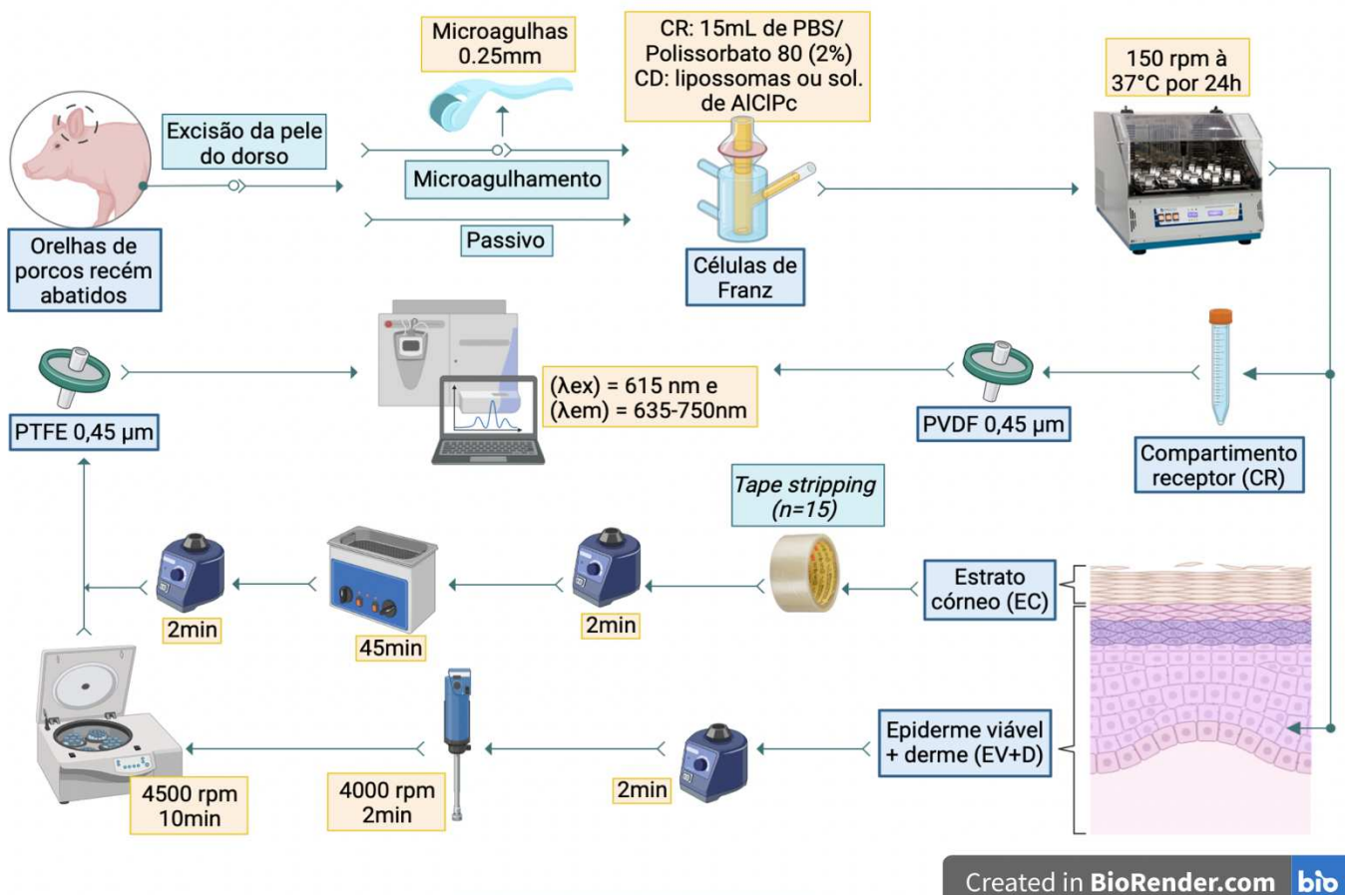


Fonte: Elaborada pelo autor utilizando o software BIORENDER, 2022.

4.4. Avaliação da penetração e permeação cutânea *in vitro*

Os estudos de permeação cutânea *in vitro* foram desenvolvidos utilizando pele *full thickness* da porção posterior de orelhas de suínos, obtidas de animais recém abatidos em um matadouro local. A Figura 17 sumariza a metodologia adotada para estes ensaios, que será descrita dos tópicos “4.4.3” e “4.4.4”. A pele removida foi cuidadosamente dessecada para a remoção do tecido subcutâneo gorduroso e armazenada à temperatura média de -20°C para uso posterior dentro do período de até 3 meses, visando a manutenção de sua adequabilidade para a realização dos ensaios (PETRILLI et al., 2017). Os estudos de penetração e permeação cutânea da AICIPc foram conduzidos de forma independente utilizando como grupos de amostra a formulação ideal escolhida de lipossomas carregados com o fármaco e a solução de AICIPc em propilenoglicol (PG), representando o fármaco livre, ambos com $n = 8$.

Figura 17. Representação esquemática da metodologia adotada para o ensaio de penetração cutânea. PBS: Tampão fosfato pH 7,4.



Fonte: elaborado pelo autor utilizando o software BIORENDER, 2022.

4.4.1. Quantificação de AICIPc em pele

Para que a quantificação do fármaco presente nas amostras de pele pudesse ser realizada, uma curva de calibração foi preparada em matriz biológica, visando mitigar os possíveis interferentes analíticos provenientes desta. Para tanto, fragmentos de pele de aproximadamente $0,95 \text{ cm}^2$ de área foram picotados e contaminados com uma alíquota de cada uma das concentrações da curva de calibração de AICIPc, descrita no tópico “4.3.6”, em triplicata. As amostras foram mantidas na capela de exaustão por 1h para secagem. Em seguida, 5 ml de DMSO foram adicionados às amostras que, em sequência, foram levadas ao dispersor ultra-turrax (IKA - T 25 Digital) em 4000 rpm por 2 min, à centrifugação em 4500 rpm por 10 min e, por fim, filtradas com filtro PTFE $0,45 \text{ }\mu\text{m}$. O mesmo procedimento foi realizado para amostras sem pele, a fim de comparar a porcentagem de recuperação de AICIPc obtida para ambas. As amostras foram lidas em espectrofluorímetro ($\lambda_{ex} = 615 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 635 - 750 \text{ nm}$) (QUIÑONES et al., 2022).

4.4.2. Avaliação da resistividade elétrica da pele

A fim de assegurar a satisfatória integridade da pele para os ensaios de penetração cutânea, determinou-se a sua resistividade (R), isto é, a magnitude com a qual o tecido se opõe à passagem de corrente elétrica, com base na metodologia proposta por Thang et al. (2001) (TANG et al., 2001). Para tanto, após o seu descongelamento em temperatura ambiente, a pele foi recortada e os fragmentos foram montados em células de difusão de Franz (Figura 17), com uma porção de 0,95 cm² de área de estrato córneo voltada para o compartimento doador (CD). Ambos os compartimentos doador e receptor (CR) foram então preenchidos com PBS (pH 7,4), colocados em contato com eletrodos de Ag/AgCl e submetidos à passagem de corrente elétrica de 100 mV de potência e 10Hz de frequência. Para a mensuração da corrente elétrica alcançada através da pele, utilizou-se um multímetro (Minipa ET-2082E). A resistência elétrica da pele foi calculada de acordo com a lei de Ohm, utilizando a equação 4, e aplicada à equação 5 para a obtenção de sua resistividade. Amostras de pele com R inicial inferior à 35 kΩ.cm² foram consideradas inadequadas para os estudos de permeação cutânea e, por esse motivo, não foram utilizadas (CRISÓSTOMO et al., 2022; TANG et al., 2001).

$$\text{Resistência (mV)} = \text{tensão} \times 10^{-3} / \text{corrente medida} \times 10^{-6} \quad (4)$$

$$\text{R (k}\Omega\text{.cm}^2\text{)} = \text{resistência (mV)} \times \text{área da pele disponível para permeação (cm}^2\text{)} \quad (5)$$

4.4.3. Penetração cutânea passiva

Para o estudo da penetração cutânea passiva da AICIPc, 200 µl (equivalente à quantidade teórica de 45 µg de AICIPc) de amostra (lipossoma carregado com AICIPc ou solução de AICIPc) foram adicionados ao CD da célula de Franz, enquanto o CR foi preenchido com 15 ml de solução de Polissorbato 80 (Tween 80) em tampão PBS pH 7,4 à 2% de concentração para obtenção das *sink conditions*, conforme previamente estudado por nosso grupo de pesquisa. As células foram mantidas sob agitação contínua à 150 rpm e temperatura de 37°C por 24 horas. Ao final das 24h ininterruptas de experimento, o conteúdo do compartimento receptor foi recolhido e filtrado em filtros PVDF 0,45 µm. Em seguida, a pele foi removida das células de difusão, delicadamente lavada com água destilada, seca com papel toalha e fixada

em um suporte para a remoção do estrato córneo (EC). Para tanto, empregou-se a técnica de *tape stripping*, que consiste na adesão e remoção de 15 fitas adesivas (Scotch® 3M) em sucessão, na qual a primeira fita é descartada e as demais são submersas em tubo falcon contendo 5 ml de DMSO (ALMEIDA et al., 2018; PETRILLI et al., 2017).

A pele remanescente, correspondente às camadas da epiderme viável e derme (EV+D), foi picotada em pequenos fragmentos e, do mesmo modo, adicionada a 5 ml de DMSO em tubo falcon. Após a agitação de ambas em vórtex por 2 min, as amostras de EC foram levadas ao banho de ultrassom por 45 min, enquanto as amostras de EV+D foram submetidas ao dispersor ultra-turrax (IKA - T 25 Digital) à 4000 rpm por 2 min e, em seguida, à centrifugação à 4500 rpm por 10 min. Por fim, as amostras de EC e EV+D foram filtradas em filtro PTFE 0,45 µm e, junto ao conteúdo do CR, lidas em espectrofluorímetro para a quantificação da AICIPc sob as mesmas condições de análise previamente citadas. Para a quantificação do fármaco no CR, utilizou-se uma curva analítica de AICIPc preparada em PBS pH 7,4 + Tween 80 (2%) às concentrações de 0,05 µg/ml - 0,60 µg/ml ($R^2 = 0,9987$), em triplicata, seguindo metodologia previamente validada.

4.4.4. Penetração cutânea precedida por microagulhamento

Com o objetivo de avaliar a influência do microagulhamento prévio da pele na penetração e permeação cutânea do fármaco, adotou-se a metodologia proposta por Bradan, Kuntsche e Fahr (2009), com modificações (BADRAN; KUNTSCHKE; FAHR, 2009). Após o seu descongelamento, a pele da orelha de porco foi fixada em um suporte com o auxílio de agulhas para evitar a formação de “pregas” durante a realização do procedimento, sem que, no entanto, fosse demasiadamente estirada a ponto de ter sua textura de superfície modificada. Posteriormente, um derma roller (*Smart GR*, 540 agulhas) com agulhas de 0,25 mm de espessura foi rolado sobre a pele por três vezes consecutivas em uma única direção. Em seguida, a pele foi montada em células de difusão de Franz para a determinação de sua resistividade e submetida ao ensaio de penetração cutânea seguindo os mesmos procedimentos descritos previamente nos itens “4.4.1” e “4.4.2”, respectivamente.

4.5. Análises estatísticas

Os resultados obtidos nos ensaios de penetração cutânea foram submetidos à análise *two-way* ANOVA com pós teste de tukey ($p \leq 0,05$) utilizando o software *Graphpad Prism 6*.

Para o planejamento fatorial, empregando o software MiniTab® 16.0, análises de regressão quadrática foram utilizadas para gerar equações polinomiais de segundo grau aplicadas aos dados experimentais obtidos. À semelhança, o nível de significância estatístico adotado para o modelo matemático foi de $p < 0,05$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Desenvolvimento e caracterização físico-química de lipossomas contendo AICIPc obtidos por planejamento fatorial Box-Benhken

A Tabela 4 apresenta as formulações preparadas de acordo com o planejamento fatorial de Box-Behnken e seus respectivos valores de variáveis dependentes obtidos: tamanho de partícula (Y_1), porcentagem de encapsulação (Y_2) e índice de polidispersidade (Y_3). Os valores de eficiência de encapsulação variaram de 9,17% a 77,24%, o tamanho de partícula de 110,93 nm a 374,97 nm, e o PDI de 0,265 a 0,468. Portanto, observou-se que variações nas variáveis independentes implicaram em uma alta variabilidade das respostas obtidas para as formulações sintetizadas. Tal observação nos sugere que os componentes adotados como fatores, bem como a proporção na qual estes estão presentes na formulação, exercem grande impacto nos parâmetros críticos para a qualidade do produto obtido.

Tabela 4. Relação entre as variáveis independentes, em seus níveis distintos, e os valores reais obtidos para as variáveis dependentes adotadas.

Nº da formulação	X ₁ = AO (mg)	X ₂ = AICIPc (mg)	X ₃ = COL (mg)	Y ₁ = Tamanho (nm)	Y ₂ = EE (%)	Y ₃ = PDI
1	0	1	4,92	110,93	40,95	0,348
2	3,59	1	4,92	151,16	77,24	0,265
3	0	5	4,92	240,93	12,72	0,404
4	3,59	5	4,92	159,5	18,28	0,368
5	0	2,5	2,46	147,4	52,54	0,394
6	3,59	2,5	2,46	142,9	62,32	0,292
7	0	2,5	7,38	176,47	9,17	0,430
8	3,59	2,5	7,38	140,83	72,19	0,274
9	1,8	1	2,46	163,87	46,78	0,419
10	1,8	5	2,46	374,97	26,06	0,468
11	1,8	1	7,38	121,47	26,81	0,335
12	1,8	5	7,38	182,27	43,30	0,362
13	1,8	2,5	4,92	133,1	42,22	0,333
14	1,8	2,5	4,92	158,1	65,50	0,379
15	1,8	2,5	4,92	145,3	57,28	0,362

Fonte: elaborado pelo autor, 2022.

Sabidamente determinante para a estabilidade da formulação e para a eficiência de encapsulação das nanopartículas, o tamanho destas também influencia diretamente a sua penetração e permeação cutâneas em sistemas tópicos (BAHARI; HAMISHEHKAR, 2016; DANAIE et al., 2018; LOPES et al., 2019; MANIKKATH et al., 2018). A relação entre o tamanho de partícula de lipossomas e a entrega de substâncias por estes carregadas às diferentes camadas da pele foi investigada em um trabalho prévio que demonstrou que vesículas de diâmetro ≤ 300 nm alcançavam adequada deposição de fármaco tanto na epiderme viável quanto na derme (VERMA et al., 2003). Desse modo, considerando os tamanhos de partícula obtidos neste estudo, com a exceção de uma única formulação (Nº 10, com 374,97 nm), os lipossomas desenvolvidos adequam-se à proposta do trabalho, que visa a pele como via de administração. Utilizando uma composição lipídica similar, com SPC:COL:DSPE-PEG₂₀₀₀ (ELOY et al., 2016) e SPC: COL (PETRILLI et al., 2017), e o mesmo método de preparo aqui empregado, Eloy et al. (2016) e Petrilli et al. (2016) desenvolveram lipossomas de aproximadamente 124 nm e 130 nm, respectivamente (ELOY et al., 2016; PETRILLI et al., 2017). À semelhança, lipossomas de fosfaditilcolina e COL carregados com AICIPc desenvolvidos em outro trabalho apresentaram 120 nm de diâmetro (SILVA; FRANCHI; TEDESCO, 2016).

Observa-se, portanto, que 9 das 15 formulações desenvolvidas obtiveram tamanhos de até 150 nm, aproximadamente, em sintonia com os valores obtidos por demais estudos. Outro aspecto observado diante dos resultados obtidos é que as três formulações com os maiores tamanhos de partícula (Nº 10, com 374,97; Nº 3, com 240,93 e Nº 12, com 182,27) foram produzidas com os níveis mais altos de quantidade de fármaco, o que sugere que a incorporação deste aos lipossomas levou ao aumento do seu tamanho. Tal comportamento também foi observado por outros autores quando a AICIPc foi incorporada em lipossomas (CALORI, 2016; SILVA; FRANCHI; TEDESCO, 2016), em nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) (ALMEIDA et al., 2018; MARTINS et al., 2012) e em nanoemulsões (CANDIDO et al., 2018). As conclusões obtidas por Calori et al. (2016) podem embasar a ocorrência de tal fenômeno. Os autores avaliaram as propriedades de interação da AICIPc em vesículas lipídicas usando 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DSPC) e 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DOPC), que apresentaram tamanho médio de 100 nm. Observou-se que AICIPc interage fortemente com as vesículas lipídicas (VL), mais especificamente através de interações entre o alumínio e o grupo fosfato, apresentando altos valores de constante de ligação. Para as amostras com proporções de DSPC/DOPC/Colesterol iguais a 34,5/34,5/31 e 21/48/31, respectivamente, a

interação entre o fármaco e a matriz lipídica resultou em um aumento de tamanho de 8% e 5%, para LV IV, respectivamente (CALORI; TEDESCO, 2016).

O PDI, por sua vez, reflete o perfil de distribuição da população de nanopartículas em uma amostra de acordo com os diferentes tamanhos apresentados por estas, e pode variar de 0, para amostras perfeitamente homogêneas ou monodispersas, a 1, para amostras altamente heterogêneas ou polidispersas (GUIMARÃES; CAVACO-PAULO; NOGUEIRA, 2021). Para a encapsulação e entrega de fármacos utilizando lipossomas, valores de PDI $\leq 0,3$ são considerados adequados e indicativos de amostras homogêneas (DANAEI et al., 2018). Neste trabalho, as formulações produzidas apresentaram valores de PDI de 0,265 a 0,468, indicando a presença de populações homogêneas e heterogêneas de nanocarreadores e, a este respeito, alguns fatores podem ser pontuados.

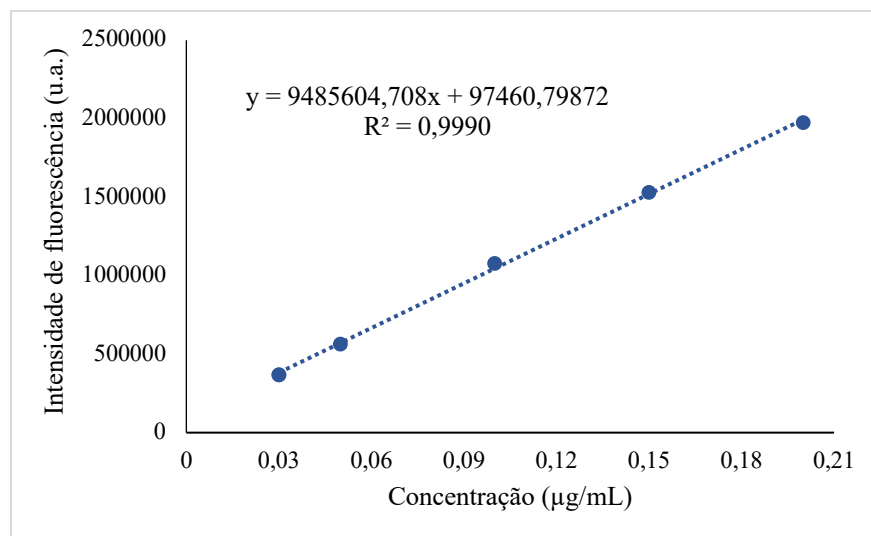
A princípio, o método de hidratação do filme lipídico tem como uma de suas limitações a produção de populações heterogêneas de lipossomas, característica também observada em outros trabalhos que o aplicaram utilizando composição lipídica similar (ELOY et al., 2016; GUIMARÃES; CAVACO-PAULO; NOGUEIRA, 2021; PETRILLI et al., 2017). Ademais, a variação entre os valores de PDI encontrados foram obtidas mediante a modificação da proporção entre colesterol, ácido oleico e fármaco dentro da matriz lipídica, o que indica que tais componentes podem ter exercido influência sobre este parâmetro. Para o colesterol, por exemplo, observou-se uma correlação entre suas menores concentrações e valores de PDI mais elevados, em concordância com os resultados obtidos por MOHAMMADI et al., 2016; FARZANEH et al., 2018; MARITIM; BOULAS; LIN, 2021. O favorecimento de menores valores de PDI na presença do colesterol podem ser explicados pela ocorrência de interações repulsivas de curto alcance entre membranas de fosfatidilcolina quando este se faz presente, o que dificulta a agregação de partículas e propicia a homogeneidade do sistema (MARITIM; BOULAS; LIN, 2021). Em adição, a tendência a auto agregação quando em meio aquoso manifestada pelo próprio fármaco, comum às ftalocianinas, também pode justificar as variações nos valores de PDI, uma vez que a AICIPc não é incorporada às vesículas lipídicas em sua totalidade (ALMEIDA et al., 2018; RIBEIRO et al., 2019).

O potencial zeta (ζ) é uma medida da magnitude de forças de repulsão ou atração entre partículas de acordo com a carga elétrica que apresentam, sendo um parâmetro crítico para a estabilidade do nanossistema (ALMEIDA et al., 2018). Lipossomas com ζ neutro ou de baixo valor em módulo sugerem formulações que tendem à menor estabilidade eletrostática, já que as forças repulsivas entre as partículas em suspensão podem não ser suficientes para impedir sua agregação natural (GUIMARÃES; CAVACO-PAULO; NOGUEIRA, 2021).

Neste trabalho, o ζ médio encontrado para os lipossomas de SPC: COL: DSPE-PEG₂₀₀₀: AO carregados com a AICIPc foi de -15,24 mV. Tal valor é superior, em módulo, aos obtidos em outros estudos que empregaram lipossomas à base de colesterol e fosfatidilcolina, na presença ou não do DSPE-PEG₂₀₀₀, mas igualmente negativo (ELOY et al., 2016; PETRILLI et al., 2017; SILVA; FRANCHI; TEDESCO, 2016). Enquanto o lipídio peguilado confere neutralidade às vesículas nas quais está inserido, a natureza e a intensidade da carga superficial dos lipossomas desenvolvidos podem ser atribuídas à presença do AO na bicamada lipídica, também descritas por Pinilla et al. (2019), Almeida et al. (2018) e Branco et al. (2020) (ALMEIDA et al., 2018; BRANCO; SEN; RINALDI, 2020; PINILLA; THYS; BRANDELLI, 2019). Abdelalim et al. (2020) descreve que, dentro de uma mistura fosfolipídica, o AO tem seu pKa reduzido para abaixo de 6,0, estando, portanto, em sua forma ionizada em pH 7,4, o que implica em nanopartículas de carga superficial negativa, e que pode aumentar em módulo à medida em que se aumenta também a proporção de AO na formulação (ABDELALIM; ELNAGGAR; ABDALLAH, 2020).

A incorporação de uma quantidade de fármaco adequada à manifestação de sua atividade terapêutica é um critério chave para a aplicação médica de nanopartículas. Por esse motivo, outro parâmetro fundamental de caracterização físico-química de lipossomas é sua eficiência de encapsulação (EE%), que pode ser impactada pela sua composição lipídica e método de síntese, por exemplo (GUIMARÃES; CAVACO-PAULO; NOGUEIRA, 2021). Neste trabalho, a AICIPc, um fármaco lipofílico que é incorporado à bicamada lipídica, foi encapsulado nos lipossomas com EE% variando de 9,17% a 77,24%. A curva de calibração utilizada para a quantificação do fármaco presente nas amostras apresentou $R^2 = 0,9990$ (Figura 18). Nota-se que as porcentagens de encapsulação de AICIPc obtidas apresentaram uma correlação direta com a proporção de ácido oleico empregada, isto é, os maiores percentuais de encapsulação do fármaco foram exibidos pelas formulações com maiores concentrações de AO (Nº 2, com 77,24%, e Nº 8, com 72,19%). Essa relação também pode ser observada ao comparar formulações com altos níveis de AO com formulações que não o contém (nível baixo = 0%), mantendo-se a quantidade de AICIPc constante e composição similar de colesterol, em geral, em níveis médio e baixo.

Figura 18. Curva de calibração para a cloro-alumínio ftalocianina em DMSO obtida em espectrofluorímetro (λ_{ex} = 615 nm , λ_{em} = 635 - 750nm).



Fonte: elaborado pelo autor, 2022.

O mesmo comportamento foi descrito por outros autores. Empregando carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN), Almeida et al. (2018) descreveram um aumento da EE% de AICIPc de 88,2% para 95,8% quando a proporção de AO foi elevada de 20% para 40% (ALMEIDA et al., 2018). Utilizando micropartículas lipídicas de ácido esteárico, Ribeiro et al. (2012) obtiveram EE% de glicose, uma molécula hidrofílica, de 75%. Na presença do AO, em contraste, o percentual atingiu 96% (RIBEIRO; BARRERA ARELLANO; FERREIRA GROSSO, 2012). Por ser um lipídio de natureza líquida e por possuir uma insaturação que o confere conformação não linear, o AO, ao ser incorporado em vesículas, modifica o padrão de empacotamento, isto é, de cristalização dos lipídios que a compõem. Desse modo, as imperfeições produzidas na bicamada lipídica favorecem sua flexibilidade e a acomodação de maiores quantidades de fármacos hidrofóbicos, como a AICIPc (ALMEIDA et al., 2018; RIBEIRO; BARRERA ARELLANO; FERREIRA GROSSO, 2012). A relação entre a flexibilidade da bicamada lipídica e a acomodação da AICIPc também pode ser analisada pela ótica proposta por Calori e Tedesco (2016). Trabalhando com vesículas lipídicas com diferentes concentrações de colesterol, os autores demonstraram que, com o aumento do grau de fluidez da bicamada, mediante redução na proporção de colesterol, a AICIPc apresentava constantes de ligação mais altas aos lipídeos que a compõem (CALORI; TEDESCO, 2016).

Visando uma melhor compreensão da influência das variações dos fatores X_1 (AO), X_2 (AICIPc) e X_3 (COL) no tamanho de partícula (Y_1), eficiência de encapsulação (Y_2) e PDI (Y_3) obtidos para cada uma das 15 formulações, Y_1 , Y_2 e Y_3 foram submetidos à regressão

múltipla, gerando equações polinomiais de segunda ordem. Como resultado, as seguintes expressões matemáticas foram obtidas:

$$Y_1 = 156.565 - 13.855X_1 + 51.309X_2 - 31.552X_3 - 19.325X_1^2 + 28.392X_2^2 + 25.712X_3^2 - 29.494X_1X_2 - 7.837X_1X_3 - 44.377X_2X_3 \quad (6)$$

Com o parâmetro de ajuste R-Sq= 84,84%

$$Y_2 = 52.961 + 13.284X_1 - 11.418X_2 - 3.298X_3 - 2.166X_1^2 - 13.498X_2^2 - 3.751X_3^2 - 8.370X_1X_2 + 13.315X_1X_3 + 9.952X_2X_3 \quad (7)$$

Com o parâmetro de ajuste R-Sq= 80,39%

$$Y_3 = 0.3649 - 0.0452X_1 + 0.0293X_2 - 0.0231X_3 - 0.0303X_1^2 + 0.0116X_2^2 + 0.0194X_3^2 + 0.0155X_1X_2 - 0.0135X_1X_3 - 0.0116X_2X_3 \quad (8)$$

Com o parâmetro de ajuste R-Sq= 80,74%

O coeficiente de determinação (R-Sq ou R^2) é definido matematicamente como a razão entre as variações que podem ser explicadas e/ou previstas pelo modelo matemático e a variação total. Por esse motivo, é utilizado como medida do grau de ajuste do modelo (YU; CABOOTER; DEWIL, 2018). Com base nos valores do coeficiente de determinação (R-Sq ou R^2), a adequação da regressão ao modelo de resposta Y_1 (tamanho de partícula) foi mais evidente, com R-Sq = 84,84%, apesar de também ter se mostrado satisfatórias para os modelos de Y_2 (eficiência de encapsulação) e Y_3 (PdI), com R-Sq igual a 80,39% e 80,74%, respectivamente. Através da análise, em módulo e magnitude, dos coeficientes obtidos para cada uma das interações de fatores X_i , é possível perceber se houve sinergismo (módulo positivo) ou antagonismo (módulo negativo) entre estes e a resposta desejada (DAS; MISHRA, 2017). Em adição, as tabelas 5, 6 e 7 apresentam os valores de significância (P) atribuídos a cada um dos coeficientes de regressão presentes nas equações quadráticas expostas acima.

Para a resposta de tamanho de partícula (Y_1), por exemplo, têm-se que os termos X_2 , X_2^2 , X_3^2 exerceram impacto positivo, isto é, um aumento da magnitude destes fatores, ou interação de fatores, leva ao aumento de Y_1 . Para os demais termos, com módulo negativo (X_1 ,

X_3 , X_1^2 , X_1X_2 , X_1X_3 e X_2X_3), o seu aumento implica em redução de Y_1 . No entanto, apenas o coeficiente de regressão para X_2 (AICIPc) demonstrou significância estatística ($p < 0,05$) dentro do modelo matemático aplicado. Para a eficiência de encapsulação (Y_2), X_1 , X_1X_3 e X_2X_3 apresentaram efeito sinérgico. Curiosamente, apesar de a interação entre X_2X_3 (AICIPc e colesterol) terem exercido impacto positivo na eficiência de encapsulação do fármaco, os termos X_2 e X_3 sozinhos apresentaram efeito antagônico a Y_2 , assim como X_1^2 , X_2^2 , X_3^3 e X_1X_2 . Neste caso, no entanto, para nenhum dos termos os coeficientes de regressão demonstraram relevância estatística. Por fim, sobre a resposta de índice de polidispersividade (Y_3), X_2 , X_2^2 , X_3^2 e X_1X_2 exerceram efeito sinérgico, ao passo que X_1 , X_3 , X_1^2 , X_1X_3 e X_2X_3 se mostraram antagônicos, onde apenas o coeficiente de X_1 exibiu $p < 0,05$. No entanto, para considerar o efeito das variáveis independentes (X_{1-3}) e das interações entre estas, expostas nas tabelas 5-7, sobre as respostas (Y_{1-3}) adotadas neste trabalho, é preciso que discorramos acerca de alguns conceitos.

Tabela 5. Coeficientes de Regressão *Full Quadratic* para tamanho de partícula (Y_1)

Coeficientes de regressão estimados para tamanho de partícula (Y_1)				
Termo	Coeficiente	Coeficiente SE	T	P
Constante	156,565	25,31	6,185	0,002
X_1 (AO)	-13,855	15,02	-0,922	0,399
X_2 (AICIPc)	51,309	14,80	3,467	0,018
X_3 (COL)	-31,552	15,02	-2,100	0,090
X_1 (AO)* X_1 (AO)	-19,325	21,78	-0,887	0,416
X_2 (AICIPc)* X_2 (AICIPc)	28,392	23,57	1,205	0,282
X_3 (COL)* X_3 (COL)	25,712	21,78	1,180	0,291
X_1 (AO)* X_2 (AICIPc)	-29,494	20,61	-1,431	0,212
X_1 (AO)* X_3 (COL)	-7,837	20,93	-0,374	0,723
X_2 (AICIPc)* X_3 (COL)	-44,377	20,61	-2,153	0,084

Fonte: elaborado pelo autor, 2022.

Tabela 6. Coeficientes de Regressão *Full Quadratic* para eficiência de encapsulação (Y_2)

Coeficientes de regressão estimados para eficiência de encapsulação (Y_2)				
Termo	Coeficiente	Coeficiente SE	T	P

Constante	52,961	9,605	5,514	0,003
X ₁ (AO)	13,284	5,701	2,330	0,067
X ₂ (AICIPc)	-11,418	5,616	-2,033	0,098
X ₃ (COL)	-3,298	5,701	-0,578	0,588
X ₁ (AO)* X ₁ (AO)	-2,166	8,267	-0,262	0,804
X ₂ (AICIPc)* X ₂ (AICIPc)	-13,498	8,944	-1,509	0,192
X ₃ (COL)* X ₃ (COL)	-3,751	8,267	-0,454	0,669
X ₁ (AO)* X ₂ (AICIPc)	-8,370	7,821	-1,070	0,333
X ₁ (AO)* X ₃ (COL)	13,315	7,942	1,676	0,154
X ₂ (AICIPc)* X ₃ (COL)	9,952	7,821	1,272	0,259

Fonte: elaborado pelo autor, 2022.

Tabela 7. Coeficientes de Regressão *Full Quadratic* para índice de polidispersividade (Y₃)

Coeficientes de regressão estimados para índice de polidispersividade (Y₃)				
Termo	Coeficiente	Coeficiente SE	T	P
Constante	0,36492	0,02546	14,332	0,000
X ₁ (AO)	-0,04519	0,01511	-2,991	0,030
X ₂ (AICIPc)	0,02932	0,01489	1,969	0,106
X ₃ (COL)	-0,02307	0,01511	-1,527	0,187
X ₁ (AO)* X ₁ (AO)	-0,03034	0,02191	-1,384	0,225
X ₂ (AICIPc)* X ₂ (AICIPc)	0,01158	0,02371	0,488	0,646
X ₃ (COL)* X ₃ (COL)	0,01942	0,02191	0,886	0,416
X ₁ (AO)* X ₂ (AICIPc)	0,01553	0,02073	0,749	0,488
X ₁ (AO)* X ₃ (COL)	-0,01348	0,02105	-0,640	0,550
X ₂ (AICIPc)* X ₃ (COL)	-0,01160	0,02073	-0,560	0,600

Fonte: elaborado pelo autor, 2022.

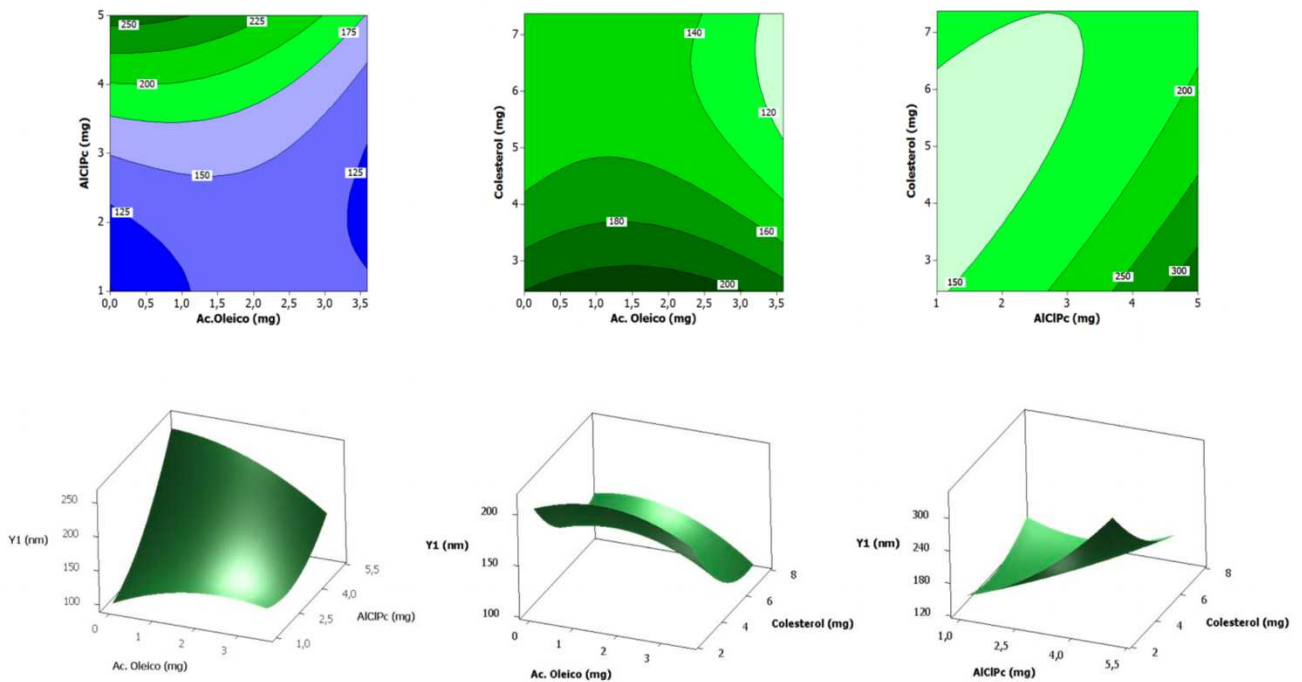
O nível de significância de um teste, representado por P ou pela letra grega α , representa a máxima probabilidade de se rejeitar uma hipótese nula quando esta é verdadeira, o que se caracterizaria como um erro do tipo I (PERECIN; CARGNELUTTI FILHO, 2008). De forma prática, portanto, o α reflete o risco máximo de se cometer um erro do tipo I que o analista considera aceitável para a adequabilidade da análise. Comumente, o nível de significância mais adotado é o de 5% ($p < 0,05$), mas os níveis de 1% ($p < 0,01$) e 10% ($p < 0,1$) também são amplamente utilizados, de acordo com a finalidade para a qual o modelo

matemático está sendo aplicado (KIM, 2015). Portanto, a determinação de α é um parâmetro crítico de análises fatoriais, e exerce impacto direto sobre o poder de inferência fornecido por estas. Todavia, critérios como tamanho do grupo amostral e magnitude da variação dos níveis adotados para os fatores independentes podem afetar o valor de P obtido (EDLER; KITSOS, 2005). Desse modo, ainda que, através do modelo matemático aplicado, algumas interações entre fatores independentes não tenham se provado significativas para as respostas obtidas, estas não devem ser totalmente desconsideradas, sob o risco de que informações valiosas sejam perdidas (KIM, 2015; PERECIN; CARGNELUTTI FILHO, 2008; SUDHAKAR; KRISHNA; MURTHY, 2016).

Por outro lado, a análise das interações entre os diferentes fatores e seu impacto sobre as respostas almeçadas pode ainda ser feita através de gráficos de contorno e de superfície de resposta, como mostram as Figuras 19-21, gerados a partir das equações polinomiais obtidas. Os gráficos demonstram o efeito da interação entre pares de variáveis independentes, de suas concentrações mais baixas às mais altas, sobre cada uma das três variáveis dependentes, enquanto o terceiro fator é mantido no nível 0 (médio) (DAS; MISHRA, 2017).

Na Figura 19, os gráficos de contorno para a interação entre o fármaco e o ácido oleico (AO) e entre o fármaco e o colesterol (COL) corroboram o intenso efeito do teor de fármaco sobre o tamanho de partícula dos lipossomas, abordado anteriormente. Em ambos os gráficos, quando a quantidade de AO e COL são mantidas em níveis baixos, o aumento da concentração de AICIPc leva ao aumento progressivo de Y_1 . Cabe ressaltar que, para a o efeito de X_2 (AICIPc) sobre o tamanho de partícula, o coeficiente de regressão se mostrou estatisticamente significativo ($p = 0,018$). Em adição, o gráfico de contorno para COL (X_3) e AO (X_1) sugere um efeito de X_3 sobre Y_1 não revelado anteriormente. Observa-se que o aumento no teor de colesterol favorece a redução do tamanho de partícula dos lipossomas, em concordância com os resultados obtidos por Sudhakar et al. (2016). Por aumentar a rigidez da bicamada lipídica, o colesterol comumente é relacionado à estabilidade de lipossomas. Adicionalmente, por tornar a vesícula mais rígida e lipofílica, o aumento no teor de colesterol reduz o *uptake* de água pelos lipossomas, o que favorece menores tamanhos de partícula (MARITIM; BOULAS; LIN, 2021; SUDHAKAR; KRISHNA; MURTHY, 2016).

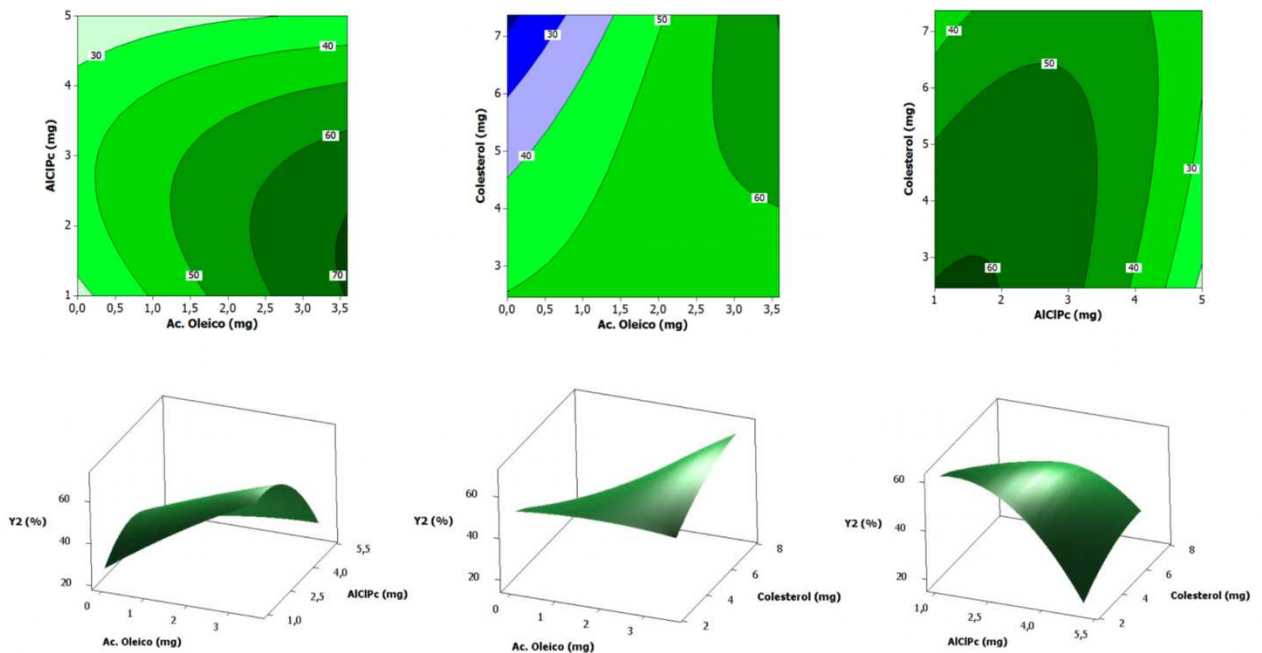
Figura 19. Gráficos de contorno (acima) e superfície de resposta (abaixo) para o efeito das variáveis independentes sobre o tamanho de partícula dos lipossomas (Y_1).



Fonte: elaborado pelo autor, 2022.

Anteriormente, abordou-se a maior fluidez e desorganização que o AO confere à bicamada lipídica, ao passo que o colesterol exerce o efeito contrário. Neste cenário, e considerando que o fármaco é incorporado no interior da bicamada, a Figura 20 nos permite estudar com maior clareza o efeito da interação entre estes fatores e a eficiência de encapsulação (EE%) dos lipossomas (Y_2) (ALMEIDA et al., 2018; MARITIM; BOULAS; LIN, 2021; RIBEIRO; BARRERA ARELLANO; FERREIRA GROSSO, 2012). O gráfico de contorno para a AICIPc versus o AO demonstra que a maior EE% (70%) é obtida em regiões onde há máximo teor de ácido graxo e até 2 mg de fármaco, aproximadamente. Em contraste, os gráficos para colesterol versus AO e AICIPc versus colesterol revelam que tanto o aumento no teor de fármaco quanto de colesterol exerce um impacto negativo sobre a EE% dos lipossomas. Diante dos resultados, podemos sugerir, como hipótese, que a incorporação do fármaco à bicamada demanda um grau de desorganização suficiente para permitir a acomodação do maior teor possível de fármaco e, ao mesmo tempo, impedir que a AICIPc escape com facilidade da vesícula lipídica.

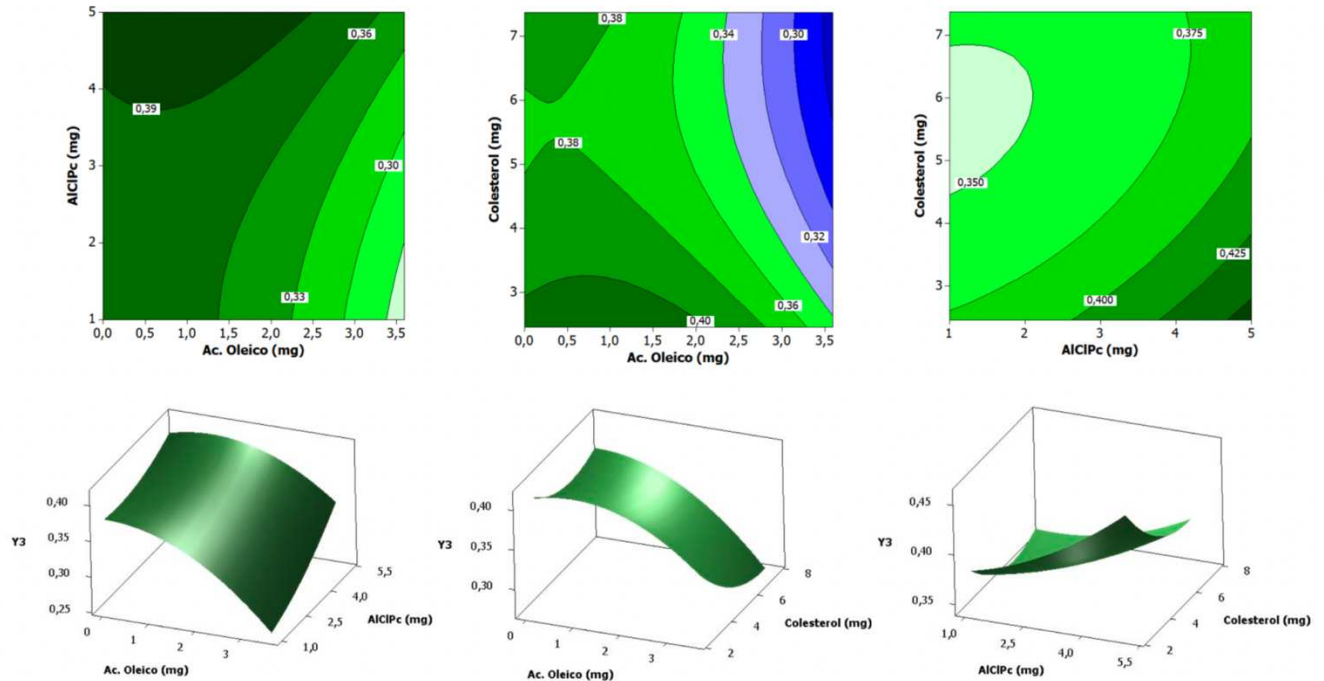
Figura 20. Gráficos de contorno (acima) e superfície de resposta (abaixo) para o efeito das variáveis independentes sobre a eficiência de encapsulação dos lipossomas (Y_2).



Fonte: elaborado pelo autor, 2022.

Os gráficos expostos na Figura 21, por sua vez, contribuem para a relevância das hipóteses, discutidas anteriormente, de que a parcela não encapsulada de fármaco e o teor de colesterol nos lipossomas impactam de forma negativa e positiva, respectivamente, o índice de polidispersividade das formulações. No entanto, a análise dos gráficos de contorno do fármaco versus o AO e do colesterol versus o AO nos permitem acrescentar novas considerações. O aumento gradual no teor do ácido graxo favoreceu a obtenção de populações mais homogêneas de nanopartículas. Como afirmado por Abdelalim et al. (2020), em uma mistura lipídica, a redução no pKa do AO contribuiu para a presença de sua forma ionizada quando em pH 7,4, no qual a formulação se encontra (ABDELALIM; ELNAGGAR; ABDALLAH, 2020). Desse modo, discutiu-se anteriormente a respeito da influência que tal fator poderia exercer sobre o potencial zeta negativo da nanopartícula. Todavia, ao favorecer o aumento da carga superficial dos lipossomas e, por consequência, prevenir a agregação entre estas, o AO pode ter cooperado também para a obtenção de menores valores de PdI (ZHANG et al., 2020). Ademais, o menor índice de polidispersão apresentado no gráfico de contorno para colesterol versus AO (0,3) é obtido quando ambos os fatores estão em suas quantidades máximas, o que pode sugerir um efeito sinérgico entre mecanismos (ABDELALIM; ELNAGGAR; ABDALLAH, 2020).

Figura 21. Gráficos de contorno (acima) e superfície de resposta (abaixo) para o efeito das variáveis independentes sobre o índice de polidispersidade (Y_3)



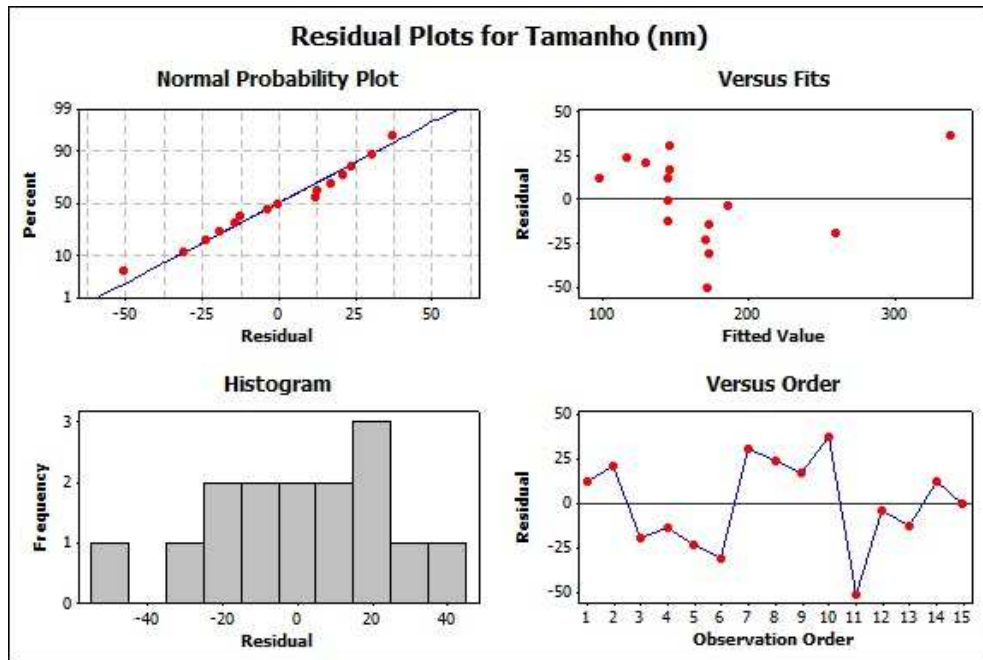
Fonte: elaborado pelo autor, 2022.

Com o propósito de avaliar a capacidade do modelo matemático de se aproximar suficientemente das respostas adotadas, gráficos de resíduos foram gerados. Os resíduos, portanto, são uma medida de quão bem a regressão quadrática se adequou à previsibilidade dos resultados obtidos. Para a avaliação da normalidade dos resíduos, isto é, sua distribuição homogênea em torno de um ponto central, podem ser utilizados gráficos de probabilidade normal ou histogramas. No primeiro gráfico, a normalidade dos resíduos é observada quando os pontos se distribuem próximos da linha traçada para residual versus percentual. Já no histograma, a distribuição normal é atestada quando 95% dos resultados estão no centro do eixo residual, isto é, apresentando uma curva em forma de “sino”. Todavia, como a aparência dos gráficos de histograma depende do tamanho do grupo amostral e do número de intervalos adotados para o agrupamento dos dados, estes não são recomendados para a análise de menos de 20 pontos (ELOY et al., 2020; HASSAN et al., 2019). As Figuras 22-24 contém os gráficos de resíduos para as respostas de tamanho de partícula (Y_1), eficiência de encapsulação (Y_2) e Pdl (Y_3). Apesar de os histogramas não se mostrarem simétricos, nos gráficos de probabilidade normal percebe-se, com nitidez, que os pontos acompanham a tendência da linha central. Desse

modo, todas as respostas apresentam distribuição normal e indicam homocedasticidade (FERREIRA et al., 2007).

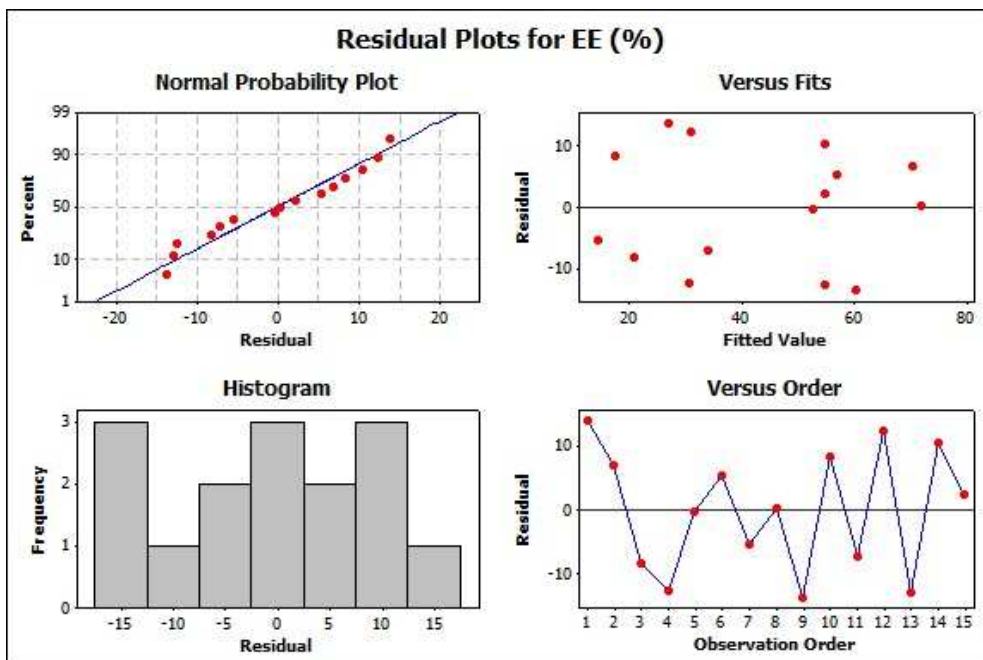
Os gráficos de resíduos versus valores ajustados permitem avaliar a aleatoriedade na distribuição dos resíduos e a constância de sua variação. À semelhança, os gráficos de resíduos versus ordem são valiosos para a verificação da independência entre os resíduos, ou seja, garantir que estes não possuem correlação entre si. Nestes, os pontos referentes aos dados são apresentados na ordem temporal em que foram coletados. Analisando as Figuras 22-24, é possível observar que, para as respostas de eficiência de encapsulação (Y_2) e PDI (Y_3), os gráficos indicam aleatoriedade na dispersão dos resultados. Para a resposta de tamanho de partícula (Y_1), o gráfico de valores ajustados apresenta concentração majoritária de pontos à esquerda. Como possível justificativa, cabe pontuar que, em decorrência do pequeno número de amostras, o distanciamento de dois pontos de resíduos em relação aos demais, os chamados *outlyners*, podem resultar em distribuição aparentemente não-aleatória dos dados. Todavia, o gráfico de ordem para Y_1 não permite identificar correlação entre os resíduos, o que indica distribuição homogênea destes (ELOY et al., 2020; FERREIRA et al., 2007).

Figura 22. Gráficos de resíduos para tamanho de partícula (Y1).



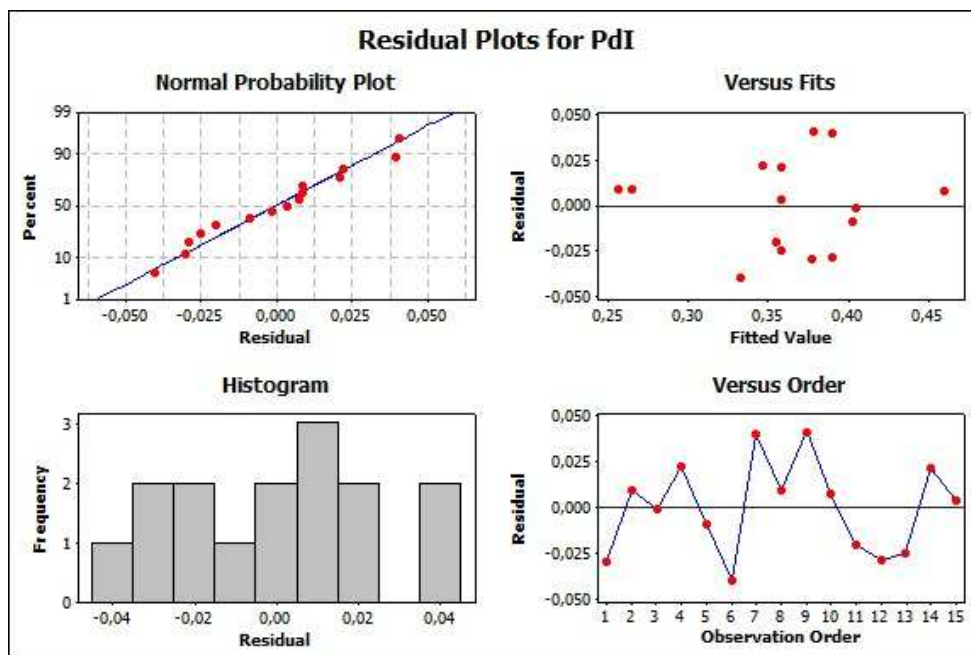
Fonte: elaborada pelo autor, 2022.

Figura 23. Gráficos de resíduos para eficiência de encapsulação (Y2).



Fonte: elaborada pelo autor, 2022.

Figura 24. Gráficos de resíduos para índice de polidispersividade (Y3).

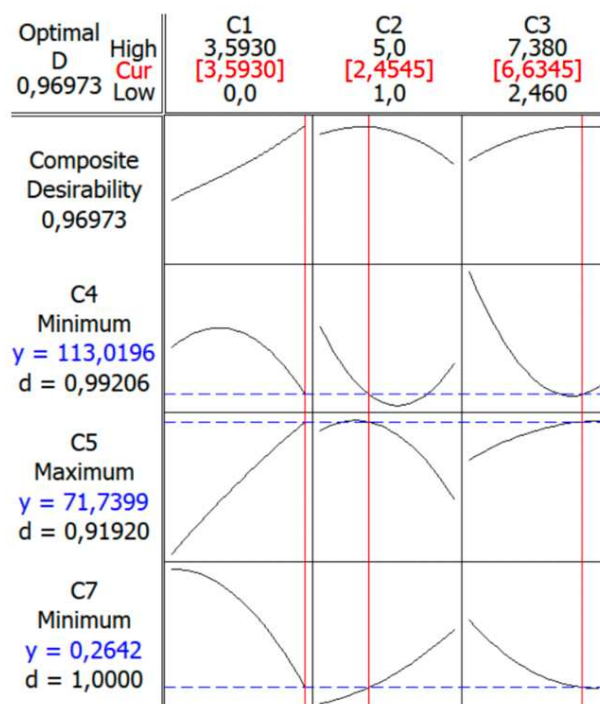


Fonte: elaborada pelo autor, 2022.

5.1.1. Formulação lipossomal otimizada

A fim de obter uma formulação otimizada para as respostas Y_1 , Y_2 e Y_3 , os valores de tamanho, PdI e eficiência de encapsulação obtidos experimentalmente para as formulações produzidas foram submetidas à função *desirability*, utilizando o software Minitab. Tal abordagem consiste na conversão de cada resposta Y_i em uma função de desejabilidade individual d_i , que pode variar de 0, indicando um valor indesejável para Y_i , a 1, quando há máxima probabilidade de se atingir a resposta desejada (DAS; MISHRA, 2017). Isto posto, como parâmetros desejáveis para a formulação ideal, foram adotados mínimos tamanhos de partícula e PdI, e máxima eficiência de encapsulação. Como mostra a Figura 25, os valores ótimos previstos para a formulação ideal foram: tamanho de partícula (Y_1) = 113,01 nm, eficiência de encapsulação (Y_2) = 71,74% e PdI (Y_3) = 0,264. Para alcançar tais respostas, os valores indicados para o teor de ácido oleico (X_1), fármaco (X_2) e colesterol (X_3) foram de 3,59 mg, 2,45 mg e 6,63 mg, respectivamente.

Figura 25. Otimização obtida por planejamento fatorial para lipossomas contendo AICIPc. Quantidades de ácido oleico (C1), AICIPc (C2) e colesterol (C3) indicadas para a obtenção de mínimos tamanho de partícula (C4) e PDI (C7), e máxima EE% (C5).



Fonte: elaborado pelo autor, 2022.

Portanto, como etapa final na aplicação da otimização do planejamento fatorial, é necessário obter experimentalmente a formulação resultante, bem como as caracterizações desta formulação para que a adequação do modelo matemático escolhido seja validada (SUDHAKAR; KRISHNA; MURTHY, 2016). A Tabela 8 exibe as respostas previstas e as obtidas experimentalmente para a formulação otimizada, bem como o erro relativo obtido para cada parâmetro. Para Y_1 , o erro relativo obtido foi igual a 26,23%. As contribuições de Calori (2016), descritas anteriormente, podem auxiliar na compreensão de tal fato, uma vez que foi demonstrada a forte interação da AICIPc com vesículas lipídicas de DSPC e DOPC, com altos valores de constante de ligação. Desse modo, por acomodar-se no interior das vesículas lipídicas, a incorporação da AICIPc na bicamada leva ao aumento do diâmetro dos nanocarreadores (CALORI, 2016). Ademais, a formulação otimizada apresentou um PDI de 0,309 que, apesar de estar 14,41% acima do previsto, demonstra que esta manteve-se homogênea. Destaca-se, por fim, que um erro baixíssimo foi obtido para a eficiência de encapsulação (3,83%), equivalente a 69,09%, à semelhança dos percentuais alcançados por Lopes et al. (2019) e Silva, Franchi e Tedesco (2016). A Tabela 9 sumariza os resultados das

caracterizações físico-químicas para a formulação otimizada contendo ou não o fármaco. Desse modo, podemos afirmar que o planejamento fatorial Box-Benhken foi bem-sucedido na otimização do desenvolvimento de uma formulação lipossomal baseada em SPC:COL:AO:DSPE-PEG₂₀₀₀, na proporção molar de 70:18:13,4:1,7, e contendo 2,45 mg de AIClPc, com máxima eficiência de encapsulação e mínimos tamanho de partícula e PdI.

Tabela 8. Correlação entre resultados previstos e os resultados experimentais para a formulação otimizada.

Variáveis dependentes	Resultados experimentais	Valores previstos	Erro relativo (%)
Tamanho (nm)	153,20 ± 13,39	113,02	26,23
PdI	0,309 ± 0,03	0,264	14,41
EE (%)	69,09 ± 3,31	71,74	3,83

Fonte: elaborado pelo autor, 2022.

Tabela 9. Valores médios de tamanho, PdI e eficiência de encapsulação experimentais para o lipossoma ideal contendo (Lip. AIClPc) ou não (Lip. Branco) o fármaco.

	Tamanho (nm)	PdI	Potencial Zeta (mV)	EE (%)
Lip. Branco	84,58 ± 1,31	0,210 ± 0,007	-16,56 ± 1,195	–
Lip. AIClPc	153,20 ± 13,39	0,309 ± 0,03	-15,24	69,09 ± 3,31

Fonte: elaborado pelo autor, 2022.

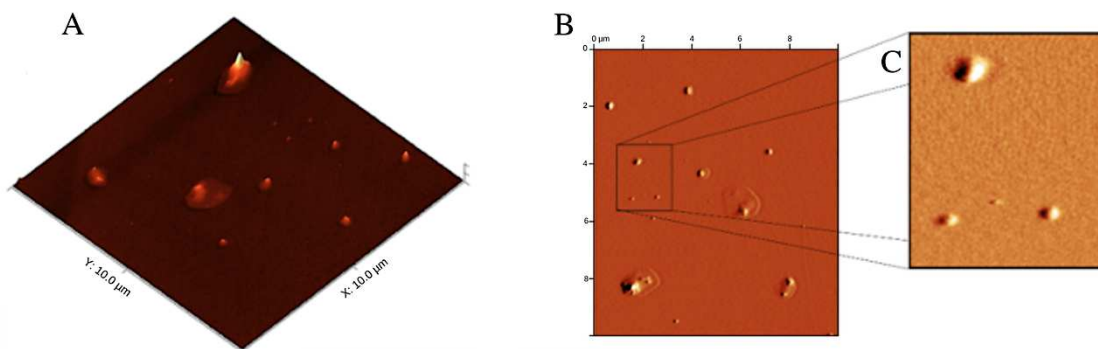
5.2. Microscopia de Força Atômica (MFA)

Na microscopia de força atômica (MFA), a superfície de uma amostra é submetida à varredura por uma sonda capaz de se defletir de acordo com as características topográficas apresentadas por esta e, assim, gerar imagens de boa resolução em escala atômica. Por esse motivo, tem sido amplamente utilizada para a análise morfológica de nanocarreadores, como lipossomas. Adicionalmente, a MFA fornece informações a respeito da distribuição de tamanho, homogeneidade e estabilidade das nanopartículas (ROBSON et al., 2018).

A Figura 26 apresenta imagens em 2D e 3D dos lipossomas desenvolvidos, evidenciando que estes possuem morfologia esférica ou quase esférica, à semelhança dos resultados obtidos por WU et al. (2019). Em adição, não é possível observar agregação aparente das vesículas, o que corrobora a hipótese de estabilidade proveniente da repulsão eletrostática e do impedimento estérico entre os lipossomas (ABDELALIM; ELNAGGAR; ABDALLAH,

2020). Conforme descrito na literatura, as regiões mais claras referem-se a domínios mais altos e ordenados, associados à bicamada lipídica em sua fase gel, enquanto as regiões mais escuras correspondem a domínios mais baixos e desordenados da bicamada lipídica, associados à fase fluida (GOTO; SIQUEIRA-MOURA; TEDESCO, 2017; RUOZI et al., 2007).

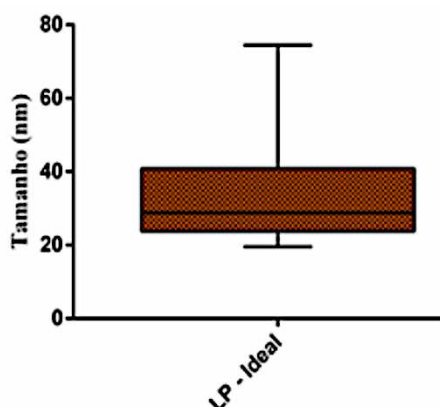
Figura 26. Microscopia de Força Atômica (MFA) da amostra LP-ideal: imagem 3D – 10×10 μm (A), imagem 2D – 10×10 μm (B), imagem 2D – 2×2 μm (C). Imagens com resolução de 512 pixels.



Fonte: elaborada pelo autor, 2022.

Ademais, MFA forneceu evidências adicionais a respeito do tamanho nanométrico dos lipossomas. Todavia, como mostra a Figura 27, o tamanho médio encontrado para os nanocarreadores foi de 20-40 nm, em divergência com os valores obtidos através da técnica de espalhamento dinâmico da luz (DLS). Apesar de ambas as técnicas fornecerem informações a respeito do tamanho e distribuição de populações de nanopartículas, o DLS e a MFA empregam diferentes metodologias e avaliam aspectos distintos. No DLS, o movimento browniano de partículas ou entidades individuais em dispersão é quantificado e utilizado para determinar o seu diâmetro hidrodinâmico. Desse modo, o resultado fornecido por esta técnica reflete as dimensões externas das vesículas, levando em consideração as moléculas de água que se adsorvem a estas (BABICK, 2020). Na MFA, por outro lado, a amostra proveniente da dispersão lipossomal é adsorvida a uma superfície, usualmente de silicone ou mica, e a determinação do tamanho das nanopartículas é baseada em forças de repulsão e atração entre a amostra e a sonda (ROBSON et al., 2018).

Figura 27. Tamanho médio do lipossoma ideal (LP – Ideal), em que barras expressam tamanho máximo e mínimo obtidos.



Fonte: elaborada pelo autor, 2022.

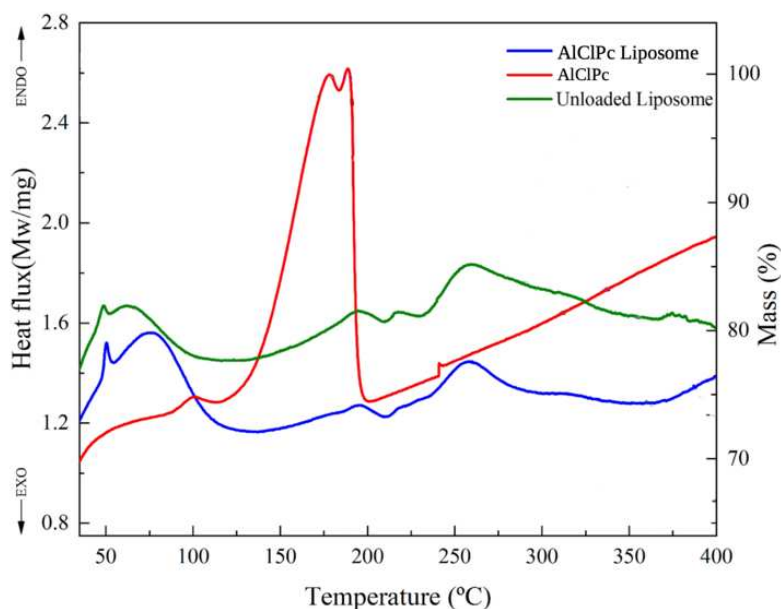
5.3. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

A técnica de calorimetria exploratória diferencial (DSC) permite medir o fluxo de calor absorvido ou liberado por um determinado material em função do tempo ao longo de uma faixa pré-estabelecida de variação de temperatura. Os processos de absorção (endotérmico) ou liberação (exotérmico) de calor pela amostra podem estar relacionados a eventos físicos, como mudança de fase, ou químicos, como degradação, respectivamente (DEMETZOS, 2008). Em membranas fosfolipídicas, especificamente, o principal processo de transição de fase ocorre quando a matriz lipídica sai de um estado com maior cristalinidade, isto é, mais ordenado, para um estado de menor cristalinidade e, portanto, mais fluido e desordenado. Desse modo, alterações na organização da bicamada, por incorporação de novos compostos, por exemplo, geram modificações no comportamento termotrópico das vesículas lipídicas que podem ser percebidos por DSC (ALMEIDA et al., 2012).

Isto posto, neste trabalho, curvas de DSC foram geradas com o objetivo de avaliar o comportamento dos lipossomas após a incorporação do fármaco hidrofóbico e a interação entre este e a matriz lipídica, como um reflexo da estabilidade do nanocarreador. A Figura 28 apresenta as curvas da análise calorimétrica para o fármaco livre (vermelho), lipossoma branco (verde), isto é, não carregado com o fármaco, e para o lipossoma contendo AICIPc (azul). A análise térmica do fármaco livre revelou um amplo evento endotérmico com pico em 144°C acompanhado de perda de massa que, dada a alta estabilidade térmica do composto, pode estar relacionado à desidratação da amostra ou à instabilidade de impurezas presentes na matéria-prima, como observado por Reis et al. (2019) (REIS et al., 2019). Ambos os lipossomas apresentaram eventos abaixo de 100°C. Eloy et al. (2016) desenvolveram lipossomas de

SPC:Chol:DSPE-PEG₂₀₀₀ carregados com paclitaxel e rifampicina. Espectros gerados por DSC no estudo revelaram amplas bandas endotérmicas próximas a 50°C, às quais os autores atribuíram à perda de água (ELOY et al., 2016). O comportamento térmico do lipossoma contendo AICIPc sugere ainda um encapsulamento bem-sucedido do fármaco, dada a ausência dos picos característicos deste quando analisado na forma de matéria prima pura. Tal resultado nos permite inferir que a AICIPc se encontra molecularmente dispersa ou em seu estado amorfo no interior da bicamada, como demonstrado por outros estudos (ALMEIDA et al., 2018; GOTO; SIQUEIRA-MOURA; TEDESCO, 2017; REIS et al., 2019), o que será corroborado pelos resultados obtidos por FTIR, expostos a seguir.

Figura 28. Curvas de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) para a AICIPc livre (vermelho), lipossoma branco (verde) e lipossoma contendo AICIPc (azul).



Fonte: Elaborado pelo autor.

5.4. Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

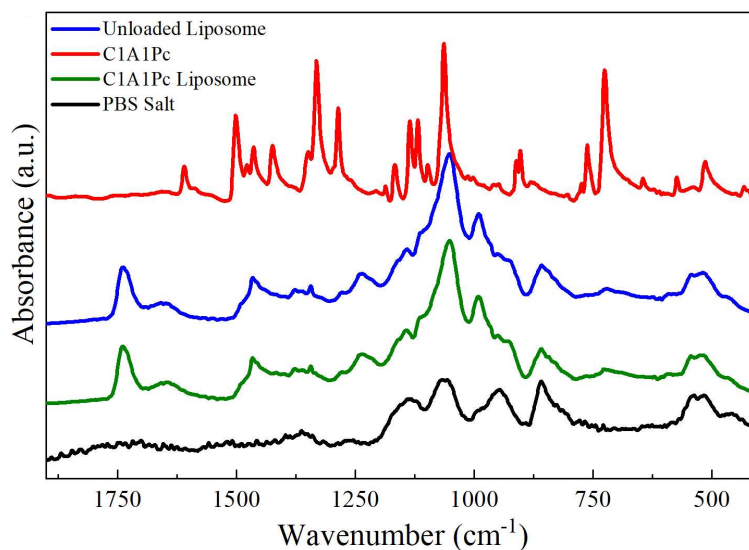
A análise de FTIR permite identificar e avaliar as interações intermoleculares entre diferentes compostos através de deslocamentos ou estiramentos das bandas nos espectros que correspondem a grupos químicos específicos (SEOUDI; EL-BAHY; EL SAYED, 2005). Desse modo, aplicado a sistemas de entrega de fármacos, os espectros obtidos permitem o estudo das interações entre este e os excipientes da formulação, bem como a elucidação da natureza do fármaco após a encapsulação (ELOY et al., 2016; ROSTAMABADI et al., 2020). Na Figura 29 são apresentados os espectros obtidos para o lipossoma branco, lipossoma

contendo AICIPc, para a AICIPc livre, bem como para os sais do tampão fosfato pH 7,4, utilizado para a dispersão lipossomal.

A análise da AICIPc livre, em vermelho, revelou diversas bandas concentradas, principalmente, na faixa de 400 cm^{-1} a 1750 cm^{-1} , em concordância aos resultados obtidos em outros trabalhos. Dentre os mais significativos, estão os picos próximos a 1463 cm^{-1} e 1418 cm^{-1} , que se relacionam ao alongamento do isoindol por meio das ligações C-H planares, e em 1332 cm^{-1} e 1284 cm^{-1} , aproximadamente, referentes aos estiramentos de C-C e C-N do isoindol, respectivamente (ALMEIDA et al., 2018; CROUS; DHILIP KUMAR; ABRAHAMSE, 2019; SEOUDI; EL-BAHY; EL SAYED, 2005). Em suma, o espectro IR do fármaco está em boa concordância com a matéria-prima caracterizada por El-Nahass e colaboradores (2015) (EL-NAHASS et al., 2015).

Já o espectro do lipossoma branco, em azul, revelou um pico em 1734 cm^{-1} , que se relaciona ao modo vibracional do grupo carbonila, C=O, além de bandas em 1250 cm^{-1} a 1080 cm^{-1} , referentes aos modos vibracionais de PO do grupo funcional principal dos componentes da matriz lipídica (CHEN; TRIPP, 2008; HOU et al., 2013; MICHELETTO et al., 2015). Para o lipossoma contendo o fármaco fotossensibilizante, em verde, um espectro muito semelhante ao do lipossoma branco foi obtido. No entanto, os modos vibracionais tornaram-se mais amplos com a incorporação da AICIPc, o que sugere a perda da ordem cristalina e a formação de uma fase amorfa. Ademais, posto que os picos característicos da AICIPc não estão presentes no espectro dos lipossomas após a incorporação, é possível inferir que houve um encapsulamento bem-sucedido do fármaco à bicamada lipídica dos nanocarreadores (CHEN; TRIPP, 2008; GOTO; SIQUEIRA-MOURA; TEDESCO, 2017). Nota-se ainda que várias das bandas nos espectros dos lipossomas com e sem o fármaco podem ser atribuídas à solução salina tamponada com fosfato (PBS), em preto, usada como meio de preparação dos lipossomas.

Figura 29. Espectros de infravermelho para a AIClPc livre (vermelho), lipossoma branco (azul), lipossoma contendo a AIClPc (verde) e sais de PBS (preto).

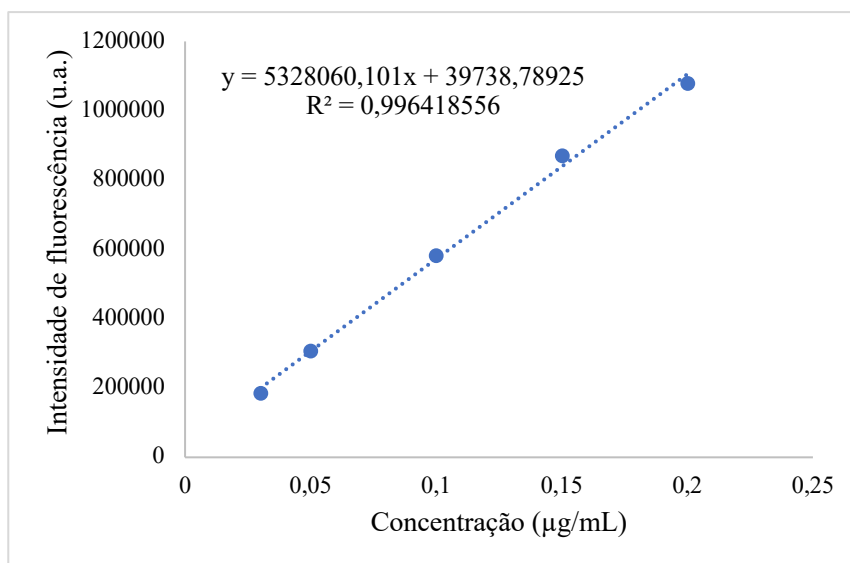


Fonte: Elaborado pelo autor.

5.5. Avaliação da penetração e permeação cutânea *in vitro*

Acerca do estudo de penetração e permeação cutânea da AIClPc, a Tabela 10 apresenta a quantidade de fármaco recuperada do estrato córneo e da epiderme viável ao final das 24h de tratamento da pele com o fármaco livre, representado por uma solução de AIClPc em propilenoglicol (PG), e encapsulado, de forma passiva ou precedida de microagulhamento. A Figura 30 apresenta a curva de calibração utilizada para a quantificação do fármaco recuperado das amostras cutâneas. Para ambos os grupos experimentais testados, nem a penetração passiva nem a submissão prévia da pele ao microagulhamento foram capazes de gerar concentrações detectáveis de fármaco no compartimento receptor. Os resultados obtidos indicam que a AIClPc não apresentou, neste trabalho, permeação através da pele, ficando retida no estrato córneo e nas camadas viáveis da derme, à semelhança dos resultados obtidos por Almeida et al. (2018). Posto que a formulação foi desenvolvida visando potencial aplicação no tratamento local de tumores cutâneos para evitar a exposição sistêmica do organismo ao fármaco, este achado é benéfico e particularmente promissor, pois indica o seu baixo potencial de atingir a grande circulação (ALMEIDA et al., 2018). Por outro lado, como mostra a Tabela 10, a encapsulação da AIClPc nas vesículas lipídicas, por si só, aumentou em ~20 vezes e 8 vezes a penetração do fármaco no EC e na EV+D ($p < 0,05$), respectivamente, no método de penetração passiva, o que pode ser atribuído a diferentes fatores.

Figura 30. Curva de calibração matrizada para a cloro-alumínio ftalocianina obtida em espectrofluorímetro (λ_{ex} = 615 nm, λ_{em} = 635 – 750 nm).



Fonte: elaborada pelo autor, 2022.

Tabela 10. Concentrações de AlClPc, em ng/cm^2 , para a solução de fármaco e lipossoma recuperadas do estrato córneo, na epiderme viável e no compartimento receptor por penetração passiva e precedida por microagulhamento.

Método	Formulação	Estrato Córneo (ng/cm^2)	Epiderme Viável (ng/cm^2)	Receptor
Passivo	Solução AlClPc	$599,73 \pm 152,06$	$690,43 \pm 170,96$	#
	Lipossoma	$12065,7 \pm 4426,72$	$5645,76 \pm 1078,37$	#
Microagulhas	Solução AlClPc	$919,47 \pm 160,00$	$1433,48 \pm 532,65$	#
	Lipossoma	$12508,24 \pm 2944,18$	$7255,55 \pm 2717,227$	#

valores abaixo do limite de quantificação.

O primeiro e mais significativo deles é que a incorporação da AlClPc à bicamada lipídica dos lipossomas contorna os altos coeficientes de partição octanol/água ($\log P = 7,3$) e tendência à auto agregação que o fármaco demonstra quando em meio aquoso e biológico (ALMEIDA et al., 2018; NUNES; SGUILLA; TEDESCO, 2004; SIQUEIRA-MOURA et al., 2010; REIS et al, 2019). Somados ao alto peso molecular da AlClPc ($574,96 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$), tais fatores dificultam severamente seu transporte através da barreira da pele (ALMEIDA et al., 2018; VILSINSKI et al., 2018; REIS et al, 2019). Reis et al. (2019) desenvolveram complexos dispersíveis em meio aquoso formados pela conjugação da AlClPc a moléculas de hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP- β CD). No estudo, a penetração cutânea dos complexos foi avaliada em pele de orelha de suínos de forma passiva ou associada à métodos de promoção da

absorção. Um deles consistiu no tratamento prévio da pele por *tape-stripping*, isto é, a remoção do EC, gerando concentrações de AICIPc, recuperado das camadas remanescentes (EV+D), inferiores ao limite de detecção do trabalho. Por outro lado, os ensaios de penetração passiva permitiram quantificar o fármaco acumulado apenas no EC, bem como aquele recuperado da pele íntegra, ou seja, contendo EC e demais camadas viáveis. Neste último caso, não houve quantificação de AICIPc nas porções do EC e da EV + D em separado. Como resultado, considerando que a quantidade de fármaco que penetrou o EC foi a mesma recuperada da pele íntegra, os autores consideraram que não houve penetração de AICIPc nas camadas viáveis da pele (EV+D), corroborando os resultados obtidos nos ensaios precedidos por *tape-stripping*. Os autores apontaram que, para que possa interagir com a barreira cutânea, o fármaco precisa ser liberado pelo complexo, o que poderia lhe garantir alguma penetração no EC, dado o seu perfil hidrofóbico, mas inviabilizaria sua penetração nas camadas mais profundas, e de maior hidrofiliidade, da pele (REIS et al., 2019).

Os resultados obtidos neste estudo, quando confrontados com os descritos por Reis e colaboradores (2019), sugerem que a encapsulação da AICIPc nos lipossomas foi determinante para o seu acúmulo em todas as camadas da pele, mas principalmente da EV+ D (REIS et al., 2019). A melhora da penetração de fármacos hidrofóbicos mediante a sua encapsulação em lipossomas já foi descrita por outros trabalhos, mas o mecanismo pelo qual tais nanocarreadores exercem esse efeito não está completamente elucidado (ALMEIDA et al., 2018; BAHRAMIZADEH et al., 2019; ELMOWAFY, 2021; GUPTA et al., 2005; LEE; TSAI, 2010). A hipótese mais aceita, no entanto, é a de que, ao serem administrados topicamente, os nanocarreadores lipídicos se fundam à barreira cutânea (CHEN; FENG; MENG, 2019). Ao se misturarem aos lipídeos endógenos do EC, os lipídeos provenientes dos lipossomas liberam o fármaco incorporado à bicamada lipídica e permitem que este se difunda mais facilmente para as camadas viáveis da pele (ELMOWAFY, 2021; PERALTA et al., 2018).

Yokomizo e Sagitani (1996) publicaram uma sequência de estudos que investigavam o efeito de diferentes fosfolipídios sobre a permeabilidade dérmica a fármacos. Neles, o SPC, assim como outros ácidos graxos de cadeia insaturada, potencializou a penetração cutânea da indometacina e da prednisolona, ambos fármacos hidrofóbicos. Os autores propuseram que, em decorrência da similaridade estrutural entre estes, principalmente no que diz respeito às saturações e insaturações das longas cadeias alquil, os fosfolipídios exógenos são capazes de desestabilizar aqueles naturalmente presentes no EC. Em sequência, o fosfolipídio seria capaz de interagir com a epiderme viável, criando uma rota de penetração para fármacos lipofílicos (ELMOWAFY, 2021; YOKOMIZO; AND; SAGITANI, 1996;

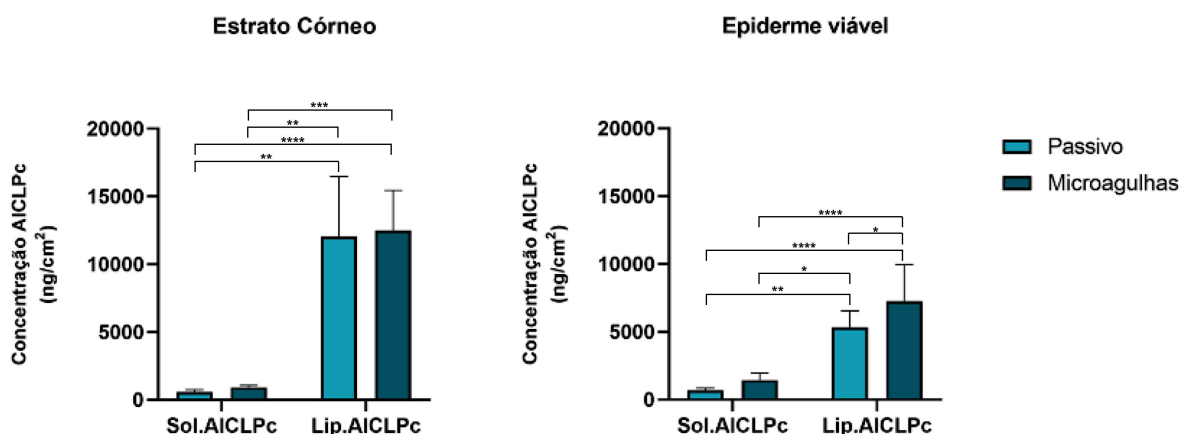
YOKOMIZO; SAGITANI, 1996). Tal rota de penetração foi posteriormente atribuída por diferentes autores, como Peralta et al. (2018), aos chamados “cânions”. Segundo estes, a matriz extracelular da camada epidérmica é formada por sulcos, ou cânions, preenchidos por uma fase lipídica similar àquela presente no EC, que se estendem até sua faixa basal e permitem a permeação de moléculas hidrofóbicas (PERALTA et al., 2018).

Com um mecanismo semelhante ao descrito anteriormente, o AO atua como um promotor químico de absorção e seu efeito na penetração cutânea de diferentes fármacos tem sido largamente investigado (ALMEIDA et al., 2018; ATEF et al., 2022; BAHRAMIZADEH et al., 2019). Trabalhando com carreadores lipídicos nanoestruturados contendo o AO, Almeida et al. (2018) investigaram a penetração cutânea da AICIPc em pele de orelha de suínos. Bahramizadeh et al. (2019) e Srisuk et al. (2012), por outro lado, empregaram o AO em lipossomas deformáveis carreados com metotrexato. Nestes trabalhos, a encapsulação dos fármacos nas respectivas nanopartículas impactou positivamente no seu perfil de penetração cutânea e, em todos eles, tal resultado foi relacionado à presença do AO na formulação (ALMEIDA et al., 2018; BAHRAMIZADEH et al., 2019; SRISUK et al., 2012). Nos lipossomas, em particular, isso ocorre porque, além de fluidizar o EC, uma vez que reduz a temperatura de transição de fase dos lipídios que o compõem, o AO que é absorvido pela barreira cutânea, e que se funde a esta, permanece em um estado fluido e desorganizado. Desse modo, como abordado anteriormente, pequenas fendas são abertas na “argamassa” do modelo de “argamassa e tijolos” do EC, facilitando a passagem de compostos através deste (NAIK et al., 1995). Considerando o mecanismo proposto por Yokomizo e Sagitani (1996) e as considerações de Peralta et al. (2018), o AO poderia, portanto, facilitar também a difusão do fármaco para as camadas mais profundas da epiderme por vias intercelulares (PERALTA et al., 2018; YOKOMIZO; AND; SAGITANI, 1996; YOKOMIZO; SAGITANI, 1996).

No que concerne ao uso do método físico, não foram encontrados na literatura trabalhos prévios que tenham estudado a associação do microagulhamento a lipossomas contendo o ácido oleico (AO) no melhoramento da penetração cutânea da AICIPc, o que evidencia o caráter inovador deste estudo. A Figura 31 apresenta os gráficos obtidos para as concentrações recuperadas de fármaco livre ou encapsulado em ambas as camadas dérmicas, estrato córneo e camadas viáveis. Analisando o gráfico à esquerda, para o EC, observamos que o aumento nas concentrações recuperadas de AICIPc promovido pelo microagulhamento dentro de um mesmo grupo (solução de AICIPc ou lipossomas) não exibiu significância estatística. Por outro lado, para as camadas viáveis da epiderme e derme, o microagulhamento prévio da pele tratada com os lipossomas ou com a solução de AICIPc gerou um aumento de

aproximadamente 1,3 vezes e 2 vezes, respectivamente, na penetração da AICIPc, que se mostraram significativos estatisticamente ($p < 0,05$).

Figura 31. Gráficos representativos das concentrações de AICIPc, em ng/cm^2 , recuperadas das diferentes camadas da pele após tratamento com a solução de fármaco ou lipossomas nos ensaios de penetração passiva ou precedida por microagulhamento. Os níveis de significância estatística foram obtidos em análise *two way* ANOVA com pós-teste de Tukey ($p \leq 0,05$).



Fonte: Elaborado pelo autor, 2022.

A escolha da pele de orelha de suínos para os estudos de permeação cutânea dos lipossomas contendo AICIPc baseou-se na sua similaridade anatômica, histológica e composicional com a pele humana, o que a consolidou como um excelente modelo animal para esta proposta (KNUDSEN et al., 2012; PRAÇA et al., 2018). Posto que a espessura total da epiderme humana é estimada em 50-120 μm , e em 30-140 μm para a pele de orelha de porcos, o comprimento de 250 μm foi adotado para as microagulhas utilizadas (PRAÇA et al., 2018). Desse modo, os resultados obtidos permitem inferir que o microagulhamento prévio gerou a formação de poros que se estenderam, em alguma extensão, até as camadas viáveis da pele. Crisóstomo et al. (2022) avaliaram o efeito do microagulhamento prévio na penetração cutânea de lipossomas compostos por SPC/COL e carregados com 5-FU. Utilizando agulhas de 200 μm e pele de orelha de porcos não-dermatomizada como modelo. Os autores descreveram um aumento de 1,27 vezes na quantidade de fármaco recuperado das camadas viáveis em comparação ao método passivo para este fármaco hidrofílico (CRISÓSTOMO et al., 2022). Em contraponto, Reis et al. (2019), citado anteriormente, também estudaram o impacto do microagulhamento na penetração cutânea dos complexos de hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP- β CD) e AICIPc. Neste, o pré-tratamento da pele com microagulhas de 0,5 mm, 1,0 mm ou 2,0 mm não foi capaz de gerar quantidades de AICIPc superiores a 1 nmol nos ensaios de

recuperação do fármaco das camadas dérmicas indistintamente após 12h de tratamento. Não houve quantificação do fármaco nas porções do EC e da EV + D em separado (REIS et al., 2019).

Um último aspecto a respeito dos resultados obtidos pode ser pontuado. Pajic et al. (2021) desenvolveram microagulhas dissolvíveis de 500 μm e investigaram o seu efeito na penetração cutânea do sertaconazol, um fármaco altamente lipofílico, utilizando pele *full-thickness* de orelha de porcos. Os autores demonstraram que o método físico aumentou em 1,9 vezes a penetração do fármaco comparado ao ensaio passivo, sem que, no entanto, tenha demonstrado significância estatística ($p < 0,05$) devido à grande variabilidade nos resultados (BUBIĆ PAJIĆ et al., 2021). Tal comportamento foi descrito em outros estudos que utilizaram a pele de suínos como modelo, e pode estar relacionado à dificuldade em controlar algumas características inerentes a estes animais em comparação àqueles criados em laboratório. Parâmetros como idade, gênero e condições de criação, por exemplo, além da própria espessura da pele quando não há dermatomização prévia, podem impactar a homogeneidade das amostras e, por consequência, dos resultados obtidos (BARBERO; FRASCH, 2009; BUBIĆ PAJIĆ et al., 2021; PRAÇA et al., 2018).

Face ao exposto, a encapsulação da AlClPc em lipossomas acrescidos de um promotor químico de absorção, o ácido oleico, obteve êxito em potencializar a sua penetração cutânea, o que indica que os nanocarreadores foram capazes de mitigar os desafios à absorção tópica do fármaco provenientes de suas características físico-químicas. Em adição, neste trabalho, associado ao uso dos lipossomas como sistema de liberação da AlClPc, o microagulhamento permitiu um aumento significativo da permeação do fármaco do estrato córneo às camadas viáveis da pele. Com o propósito de elucidar, de forma qualitativa, a extensão na qual a AlClPc permeou através da epiderme e derme, análises microscópicas poderiam ser utilizadas em etapas futuras do trabalho. Considerando as propriedades fotofísicas da cloro-alumínio ftalocianina, ensaios de microscopia de fluorescência, por exemplo, poderiam corroborar os resultados obtidos em nosso estudo (PRAÇA et al., 2018).

6. CONCLUSÃO

No presente trabalho, o planejamento fatorial de Box-Benhken foi aplicado com sucesso no desenvolvimento e otimização de uma formulação lipossomal contendo cloro-alumínio ftalocianina. As vesículas lipídicas apresentaram tamanho de partícula, eficiência de encapsulação, PDI e potencial zeta médios de $153,20 \pm 13,39$ nm, $69,09 \pm 3,31\%$, $0,309 \pm 0,03$ e $-15,24$ mV, respectivamente. A análise morfológica revelou vesículas em formato esférico ou quase esférico, enquanto as análises por DSC e FTIR sugeriram que o fármaco foi adequadamente incorporado à bicamada lipídica dos lipossomas, em seu estado amorfo ou molecularmente disperso.

No que concerne aos estudos *in vitro*, os ensaios de penetração cutânea revelaram que a AlClPc não apresentou absorção transdérmica, permanecendo retida às camadas epidérmica e dérmica da pele. Este dado é particularmente promissor, pois confirma o baixo potencial da formulação em ocasionar toxicidade sistêmica. A encapsulação do fármaco em lipossomas contendo ácido oleico aumentou em ~20 e 8 vezes sua penetração passiva no estrato córneo e na epiderme viável + derme, respectivamente. Quando precedido pelo tratamento da pele por microagulhamento, a quantidade de fármaco acumulada nas camadas viáveis sofreu um aumento adicional de 1,3 vezes. Tomados em conjunto, os resultados aqui apresentados confirmam a capacidade dos lipossomas de mitigar as características desfavoráveis à aplicação tópica da AlClPc. Ademais, confirmam o potencial do ácido oleico e do microagulhamento em potencializar a penetração cutânea de compostos.

REFERÊNCIAS

ABDEL FADEEL, D. A.; KAMEL, R.; FADEL, M. PEGylated lipid nanocarrier for enhancing photodynamic therapy of skin carcinoma using curcumin: in-vitro/in-vivo studies and histopathological examination. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, 1 dez. 2020.

ABDELALIM, L. R.; ELNAGGAR, Y. S. R.; ABDALLAH, O. Y. Oleosomes Encapsulating Sildenafil Citrate as Potential Topical Nanotherapy for Palmar Plantar Erythrodysesthesia with High Ex vivo Permeation and Deposition. **AAPS PharmSciTech**, v. 21, n. 8, 1 nov. 2020.

ABD-EL-AZIM, H. et al. Hollow microneedle assisted intradermal delivery of hypericin lipid nanocapsules with light enabled photodynamic therapy against skin cancer. **Journal of Controlled Release**, v. 348, p. 849–869, 1 ago. 2022.

ADNANE, F.; EL-ZAYAT, E.; FAHMY, H. M. The combinational application of photodynamic therapy and nanotechnology in skin cancer treatment: A review. **Tissue and Cell**, v. 77, 1 ago. 2022.

AKHTAR, N.; KHAN, R. A. Liposomal systems as viable drug delivery technology for skin cancer sites with an outlook on lipid-based delivery vehicles and diagnostic imaging inputs for skin conditions'. **Progress in Lipid Research**, v. 64, p. 192–230, 1 out. 2016.

ALEXIADES, M. Randomized, Controlled Trial of Fractional Carbon Dioxide Laser Resurfacing Followed by Ultrashort Incubation Aminolevulinic Acid Blue Light Photodynamic Therapy for Actinic Keratosis. **Dermatologic Surgery**, v. 43, n. 8, p. 1053–1064, 2017.

ALGORRI, J. F. et al. Photodynamic Therapy: A Compendium of Latest Reviews. 2021.

ALMEIDA, E. D. P. et al. Preparation and characterization of chloroaluminum phthalocyanine-loaded solid lipid nanoparticles by thermal analysis and powder X-ray diffraction techniques. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 108, n. 1, p. 191–196, abr. 2012.

ALMEIDA, E. D. P. et al. Skin permeation, biocompatibility and antitumor effect of chloroaluminum phthalocyanine associated to oleic acid in lipid nanoparticles. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 24, p. 262–273, 1 dez. 2018.

ALMEIDA, E. D. P. et al. Chitosan-functionalized nanostructured lipid carriers containing chloroaluminum phthalocyanine for photodynamic therapy of skin cancer. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 179, p. 221–231, 1 out. 2022.

ASH, C. et al. Effect of wavelength and beam width on penetration in light-tissue interaction using computational methods. **Lasers in Medical Science**, v. 32, n. 8, p. 1909–1918, 1 nov. 2017.

ATEF, B. et al. Exploring the potential of oleic acid in nanotechnology-mediated dermal drug delivery: An up-to-date review. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 67, 1 jan. 2022.

BABICK, F. Dynamic light scattering (DLS). Em: **Characterization of Nanoparticles: Measurement Processes for Nanoparticles**. [s.l.] Elsevier, 2020. p. 137–172.

BADRAN, M. M.; KUNTSCHE, J.; FAHR, A. Skin penetration enhancement by a microneedle device (Dermaroller®) in vitro: Dependency on needle size and applied formulation. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 36, n. 4–5, p. 511–523, 2 mar. 2009.

BAHARI, L. A. S.; HAMISHEHKAR, H. The impact of variables on particle size of solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers; A comparative literature review. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v. 6, n. 2, p. 143–151, 2016.

BAHRAMIZADEH, M. et al. Development, characterization and evaluation of topical methotrexate-entrapped deformable liposome on imiquimod-induced psoriasis in a mouse model. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 569, 5 out. 2019.

BANDER, T. S.; NEHAL, K. S.; LEE, E. H. Cutaneous Squamous Cell Carcinoma: Updates in Staging and Management. **Dermatologic Clinics**, v. 37, n. 3, p. 241–251, 1 jul. 2019.

BANERJEE, S. M. et al. Photodynamic therapy: Inception to application in breast cancer. **The Breast**, v. 31, p. 105–113, 1 fev. 2017.

BANGHAM, A. D.; HORNE, R. W. Negative staining of phospholipids and their structural modification by surface-active agents as observed in the electron microscope. **Journal of Molecular Biology**, v. 8, n. 5, p. 660–668, 1964.

BANGHAM, A. D.; STANDISH, M. M.; WATKINS, J. C. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. **Journal of Molecular Biology**, v. 13, n. 1, p. 238–252, 1965.

BARBERO, A. M.; FRASCH, H. F. Pig and guinea pig skin as surrogates for human in vitro penetration studies: A quantitative review. **Toxicology in Vitro**, v. 23, n. 1, p. 1–13, fev. 2009.
BAYDA, S. et al. The history of nanoscience and nanotechnology: From chemical-physical applications to nanomedicine. **Molecules**, v. 25, n. 1, 2020.

BELLEFROID, C. et al. In vitro skin penetration enhancement techniques: A combined approach of ethosomes and microneedles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 572, 15 dez. 2019.

BOLZINGER, M. A. et al. Penetration of drugs through skin, a complex rate-controlling membrane. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 17, n. 3, p. 156–165, jun. 2012.

BORGHETI-CARDOSO, L. N. et al. Nanotechnology approaches in the current therapy of skin cancer. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 153, p. 109–136, 1 jan. 2020.

BOZZUTO, G.; MOLINARI, A. Liposomes as nanomedical devices. **International Journal of Nanomedicine**, v. 10, p. 975–999, 2 fev. 2015.

BRANCO, I. G.; SEN, K.; RINALDI, C. Effect of sodium alginate and different types of oil on the physical properties of ultrasound-assisted nanoemulsions. **Chemical Engineering and Processing - Process Intensification**, v. 153, 1 jul. 2020.

BRAUN, A. et al. Validation of dynamic light scattering and centrifugal liquid sedimentation methods for nanoparticle characterisation. **Advanced Powder Technology**, v. 22, n. 6, p. 766–770, nov. 2011.

BRILKINA, A. A. et al. Photobiological properties of phthalocyanine photosensitizers Photosens, Holosens and Phthalosens: A comparative in vitro analysis. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 191, p. 128–134, 1 fev. 2019.

BUBIĆ PAJIĆ, N. et al. Comparative efficacy evaluation of different penetration enhancement strategies for dermal delivery of poorly soluble drugs – A case with sertaconazole nitrate. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 164, 1 set. 2021.

CALORI, I. R. **Preparação, caracterização e propriedades de lipossomas contendo o ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico e o agente fotossensibilizador AlClPc: Um novo sistema carreador específico com ação sinérgica aplicado a terapia fotodinâmica**. Dissertação de mestrado—São Paulo: Universidade de São Paulo, 2016.

CALORI, I. R.; TEDESCO, A. C. Lipid vesicles loading aluminum phthalocyanine chloride: Formulation properties and disaggregation upon intracellular delivery. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 160, p. 240–247, 1 jul. 2016.

CALORI, I. R.; TEDESCO, A. C. Aluminum chloride phthalocyanine in MCF-7: Rationally accounting for state of aggregation of photosensitizers inside cells. **Dyes and Pigments**, v. 173, 1 fev. 2020.

CANDIDO, N. M. et al. Combining photodynamic therapy and chemotherapy: Improving breast cancer treatment with nanotechnology. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 14, n. 5, p. 994–1008, 1 maio 2018.

CERON JAYME, C.; FERREIRA PIRES, A.; TEDESCO, A. C. Development of DNA polymer films as a drug delivery system for the treatment of oral cancer. **Drug Delivery and Translational Research**, v. 10, n. 6, p. 1612–1625, 1 dez. 2020.

CHAMPEAU, M. et al. Photodynamic therapy for skin cancer: How to enhance drug penetration? **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 197, 1 ago. 2019.

CHAN, W.-S. et al. Effect of Sulfonation on the Cell and Tissue Distribution of the Photosensitizer Aluminum Phthalocyanine. **CANCER RESEARCH**, v. 50, p. 4533–4538, 1990.

CHATURVEDI, S.; GARG, A. An insight of techniques for the assessment of permeation flux across the skin for optimization of topical and transdermal drug delivery systems: “Modelling the topical and transdermal drug delivery systems”. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 62, 1 abr. 2021.

CHEN, C. et al. Photodynamic-based combinatorial cancer therapy strategies: Tuning the properties of nanoplatform according to oncotherapy needs. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 461, 15 jun. 2022.

CHEN, C.; TRIPP, C. P. An infrared spectroscopic based method to measure membrane permeance in liposomes. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1778, n. 10, p. 2266–2272, out. 2008.

CHEN, D. et al. Photocyanine: A novel and effective phthalocyanine-based photosensitizer for cancer treatment. **Journal of Innovative Optical Health Sciences**, v. 13, n. 3, 1 maio 2020.

CHEN, Y.; FENG, X.; MENG, S. Site-specific drug delivery in the skin for the localized treatment of skin diseases. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 16, n. 8, p. 847–867, 2019.

CHILAKAMARTHI, U.; GIRIBABU, L. Photodynamic Therapy: Past, Present and Future. **Chemical Record**, v. 17, n. 8, p. 775–802, 1 ago. 2017.

CHOI, J. U. et al. Preparation and in vivo evaluation of cationic elastic liposomes comprising highly skin-permeable growth factors combined with hyaluronic acid for enhanced diabetic wound-healing therapy. **Acta Biomaterialia**, v. 57, p. 197–215, 15 jul. 2017.

CRAYTHORNE, E.; NICHOLSON, P. Diagnosis and management of skin cancer. **SKIN TUMOURS**, 2021.

CRISÓSTOMO, L. C. C. F. et al. Sorbitan Monolaurate–Containing Liposomes Enhance Skin Cancer Cell Cytotoxicity and in Association with Microneedling Increase the Skin Penetration of 5-Fluorouracil. **AAPS PharmSciTech**, v. 23, n. 6, 1 ago. 2022.

CROUS, A.; DHILIP KUMAR, S. S.; ABRAHAMSE, H. Effect of dose responses of hydrophilic aluminium (III) phthalocyanine chloride tetrasulphonate based photosensitizer on lung cancer cells. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 194, p. 96–106, 1 maio 2019.

CRÜNING, N.; MÜLLER-GOYMANN, C. C. Physicochemical characterisation of a novel thermogelling formulation for percutaneous penetration of 5-aminolevulinic acid. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 97, n. 6, p. 2311–2323, 2008.

CULLEN, J. K. et al. Topical treatments for skin cancer. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 153, p. 54–64, 1 jan. 2020.

DA SILVA, E. R. et al. Improving the topical delivery of zinc phthalocyanine using oleic acid as a penetration enhancer: in vitro permeation and retention. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 37, n. 5, p. 569–575, 2011.

D’ALESSANDRO, S.; PRIEFER, R. Non-porphyrin dyes used as photosensitizers in photodynamic therapy. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 60, 1 dez. 2020.
DANAELI, M. et al. Impact of particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems. **Pharmaceutics**, v. 10, n. 57, 18 maio 2018.

DAS, S.; MISHRA, S. Box-Behnken statistical design to optimize preparation of activated carbon from *Limonia acidissima* shell with desirability approach. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 5, n. 1, p. 588–600, 1 fev. 2017.

DASTIDAR, D. G.; GHOSH, D.; DAS, A. Recent developments in nanocarriers for cancer chemotherapy. **OpenNano**, v. 8, 1 nov. 2022.

DE SIQUEIRA, L. B. DE O. et al. Pharmaceutical nanotechnology applied to phthalocyanines for the promotion of antimicrobial photodynamic therapy: A literature review. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 39, 1 set. 2022.

DEAMER, D. W. From “banghasomes” to liposomes: a memoir of Alec Bangham, 1921-2010. **The FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 24, n. 5, p. 1308–1310, 2010.

DEMETZOS, C. Differential Scanning Calorimetry (DSC): A tool to study the thermal behavior of lipid bilayers and liposomal stability. **Journal of Liposome Research**, v. 18, n. 3, p. 159–173, set. 2008.

DISALVO, E. A.; BOUCHET, A. M. Electrophoretic mobility and zeta potential of liposomes due to arginine and polyarginine adsorption. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 440, p. 170–174, 5 jan. 2014.

DOBSON, J.; DE QUEIROZ, G. F.; GOLDING, J. P. Photodynamic therapy and diagnosis: Principles and comparative aspects. **Veterinary Journal**, v. 233, p. 8–18, 1 mar. 2018.

DONNELLY, R. F. et al. Microneedle-mediated intradermal nanoparticle delivery: Potential for enhanced local administration of hydrophobic pre-formed photosensitisers. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 7, n. 4, p. 222–231, dez. 2010.

DOPPALAPUDI, S. et al. Psoralen loaded liposomal nanocarriers for improved skin penetration and efficacy of topical PUVA in psoriasis. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 96, p. 515–529, 1 jan. 2017.

DOUGHERTY, T. J. et al. Photoradiation Therapy for the Treatment of Malignant Tumors. **Cancer Research**, v. 38, n. 8, p. 2628–2635, 1978.

DYMEK, M.; SIKORA, E. Liposomes as biocompatible and smart delivery systems – the current state. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 309, 1 nov. 2022.

ELMOWAFY, M. Skin penetration/permeation success determinants of nanocarriers: Pursuit of a perfect formulation. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 203, 1 jul. 2021.

EL-NAHASS, M. M. et al. Structural and optical properties of nanocrystalline aluminum phthalocyanine chloride thin films. **Materials Science in Semiconductor Processing**, v. 38, p. 177–183, 1 out. 2015.

ELOY, J. O. et al. Co-loaded paclitaxel/rapamycin liposomes: Development, characterization and in vitro and in vivo evaluation for breast cancer therapy. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 141, p. 74–82, 1 maio 2016.

ELOY, J. O. et al. EGFR-targeted immunoliposomes efficiently deliver docetaxel to prostate cancer cells. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 194, 1 out. 2020.

ELSADEK, N. E.; ABU LILA, A. S.; ISHIDA, T. Immunological responses to PEGylated proteins: Anti-PEG antibodies. Em: **Polymer-Protein Conjugates: From Pegylation and Beyond**. [s.l.] Elsevier, 2019. p. 103–123.

FADEL, M. et al. Topical colloidal indocyanine green-mediated photodynamic therapy for treatment of basal cell carcinoma. **Pharmaceutical Development and Technology**, v. 22, n. 4, p. 545–550, 19 maio 2017.

FAN, H. YANG et al. Light stimulus responsive nanomedicine in the treatment of oral squamous cell carcinoma. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 199, 1 ago. 2020.

FARZANEH, H. et al. A study on the role of cholesterol and phosphatidylcholine in various features of liposomal doxorubicin: From liposomal preparation to therapy. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 551, n. 1–2, p. 300–308, 15 nov. 2018.

FERREIRA, S. L. C. et al. Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods. **Analytica Chimica Acta**, v. 597, n. 2, p. 179–186, 10 ago. 2007.

FERRISSE, T. M. et al. Photodynamic therapy associated with nanomedicine strategies for treatment of human squamous cell carcinoma: A systematic review and meta-analysis. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 40, 1 fev. 2022.

GAJBHIYE, K. R. et al. PEGylated nanocarriers: A promising tool for targeted delivery to the brain. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 187, 1 mar. 2020.

GANBOLD, T. et al. Receptor-mediated delivery of therapeutic RNA by peptide functionalized curdlan nanoparticles. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 126, p. 633–640, 1 abr. 2019.

GIACONE, D. V. et al. Effect of nanoemulsion modification with chitosan and sodium alginate on the topical delivery and efficacy of the cytotoxic agent piplartine in 2D and 3D skin cancer models. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 165, p. 1055–1065, 15 dez. 2020.

GIODINI, L. et al. Nanocarriers in cancer clinical practice: a pharmacokinetic issue. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 13, n. 2, p. 583–599, 1 fev. 2017.

GOTO, P. L.; SIQUEIRA-MOURA, M. P.; TEDESCO, A. C. Application of aluminum chloride phthalocyanine-loaded solid lipid nanoparticles for photodynamic inactivation of melanoma cells. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 518, n. 1–2, p. 228–241, 25 fev. 2017.

GRIN, M. A.; SUVOROV, N. V.; MIRONOV, A. F. Natural chlorins as a promising platform for creating targeted theranostics in oncology. **Mendeleev Communications**, v. 30, n. 4, p. 406–418, 1 jul. 2020.

GUIMARÃES, D.; CAVACO-PAULO, A.; NOGUEIRA, E. Design of liposomes as drug delivery system for therapeutic applications. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 601, 15 maio 2021.

GUPTA, P. N. et al. Non-invasive vaccine delivery in transfersomes, niosomes and liposomes: A comparative study. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 293, n. 1–2, p. 73–82, 11 abr. 2005.

HAQUE, T. et al. Topical therapies for skin cancer and actinic keratosis. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 77, p. 279–289, 3 jul. 2015.

HASSAN, M. Z. et al. Optimization of tensile behavior of banana pseudo-stem (*Musa acuminata*) fiber reinforced epoxy composites using response surface methodology. **Journal of Materials Research and Technology**, v. 8, n. 4, p. 3517–3528, 1 jul. 2019.

HENDERSON, B. W.; DOUGHERTY, T. J. HOW DOES PHOTODYNAMIC THERAPY WORK? **Photochemistry and Photobiology**, v. 55, n. 1, p. 145–157, 1992.

HOPPER, C. Photodynamic therapy: A clinical reality in the treatment of cancer. **Lancet Oncology**, v. 1, n. 4, p. 212–219, 1 dez. 2000.

HOU, Z. et al. Phytosomes loaded with mitomycin C-soybean phosphatidylcholine complex developed for drug delivery. **Molecular Pharmaceutics**, v. 10, n. 1, p. 90–101, 7 jan. 2013.

HU, J. J.; LEI, Q.; ZHANG, X. Z. Recent advances in photonanomedicines for enhanced cancer photodynamic therapy. **Progress in Materials Science**, v. 114, 1 out. 2020.

HU, Y. et al. Probing and modulating the interactions of the DNAzyme with DNA-functionalized nanoparticles. **Chinese Chemical Letters**, v. 33, n. 6, p. 3026–3030, 1 jun. 2022.

IBARAKI, H. et al. Effects of surface charge and flexibility of liposomes on dermal drug delivery. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 50, p. 155–162, 1 abr. 2019.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. Câncer de pele não-melanoma. Fortaleza – CE: INCA, 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br>. Acesso em: 20 de setembro de 2022.

INOUE, J. et al. Improving the Efficacy of EGFR Inhibitors by Topical Treatment of Cutaneous Squamous Cell Carcinoma with miR-634 Ointment. **Molecular Therapy - Oncolytics**, v. 19, p. 294–307, 16 dez. 2020.

ISSA, M. C. A.; BOECHAT, M.; FASSINI, A. C. Terapia fotodinâmica no Brasil: 10 anos de história. **Surgical and Cosmetic Dermatology**, v. 8, n. 4, p. 17–22, 2016.

JAIN, A.; HURKAT, P.; JAIN, S. K. Development of liposomes using formulation by design: Basics to recent advances. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 224, 1 nov. 2019.

JING, Z. et al. Nanomedicines and nanomaterials for cancer therapy: Progress, challenge and perspectives. **Chemical Engineering Journal**, v. 446, 15 out. 2022.

KALYANE, D. et al. Employment of enhanced permeability and retention effect (EPR): Nanoparticle-based precision tools for targeting of therapeutic and diagnostic agent in cancer. **Materials Science and Engineering C**, v. 98, p. 1252–1276, 1 maio 2019.

KEUM, H.; YOO, D.; JON, S. Photomedicine based on heme-derived compounds. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 182, 1 mar. 2022.

KEYAL, U. et al. Present and future perspectives of photodynamic therapy for cutaneous squamous cell carcinoma. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 80, n. 3, p. 765–773, 1 mar. 2019.

KHAN, N. H. et al. Skin cancer biology and barriers to treatment: Recent applications of polymeric micro/nanostructures. **Journal of Advanced Research**, v. 36, p. 223–247, 1 fev. 2022.

KHANDELWAL, A. R. et al. Cutaneous Cancer Biology. **Otolaryngologic Clinics of North America**, v. 54, n. 2, p. 259–269, 1 abr. 2021.

KIBBI, N. et al. Photodynamic therapy for cutaneous squamous cell carcinoma in situ: Impact of anatomic location, tumor diameter, and incubation time on effectiveness. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 82, n. 5, p. 1124–1130, 1 maio 2020.

KIM, J. **How to Choose the Level of Significance: A Pedagogical Note**. 2015.

KNUDSEN, N. Ø. et al. Calcipotriol delivery into the skin with PEGylated liposomes. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 81, n. 3, p. 532–539, ago. 2012.

KOMSTHÖFT, T. et al. Polymer functionalization of inorganic nanoparticles for biomedical applications. **Current Opinion in Chemical Engineering**, v. 37, 1 set. 2022.

KRISHNAN, V.; MITRAGOTRI, S. Nanoparticles for topical drug delivery: Potential for skin cancer treatment. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 153, p. 87–108, 1 jan. 2020.

KWIATKOWSKI, S. et al. Photodynamic therapy – mechanisms, photosensitizers and combinations. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 106, p. 1098–1107, 1 out. 2018.

LAI-CHEONG, J. E.; MCGRATH, J. A. Structure and function of skin, hair and nails. **BASIC SCIENCE**, 2021.

LANE, M. E. Skin penetration enhancers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 447, n. 1–2, p. 12–21, 15 abr. 2013.

LARGE, D. E. et al. Liposome composition in drug delivery design, synthesis, characterization, and clinical application. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 176, 1 set. 2021.

LEE, E. H.; LIM, S. J.; LEE, M. K. Chitosan-coated liposomes to stabilize and enhance transdermal delivery of indocyanine green for photodynamic therapy of melanoma. **Carbohydrate Polymers**, v. 224, 15 nov. 2019.

LEE, W. C.; TSAI, T. H. Preparation and characterization of liposomal coenzyme Q10 for in vivo topical application. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 395, n. 1–2, p. 78–83, ago. 2010.

LEHMANN, P. Methyl aminolaevulinate-photodynamic therapy: A review of clinical trials in the treatment of actinic keratoses and nonmelanoma skin cancer. **British Journal of Dermatology**, v. 156, n. 5, p. 793–801, maio 2007.

LEV-TOV, H. et al. Microneedle-assisted incubation during aminolaevulinic acid photodynamic therapy of actinic keratoses: a randomized controlled evaluator-blind trial. **British Journal of Dermatology**, v. 176, n. 2, p. 543–545, 1 fev. 2017.

LI, J. et al. Ascorbyl palmitate effects on the stability of curcumin-loaded soybean phosphatidylcholine liposomes. **Food Bioscience**, v. 41, 1 jun. 2021.

LONGO, J. P. F. et al. Photodynamic therapy with aluminum-chloro-phthalocyanine induces necrosis and vascular damage in mice tongue tumors. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 94, n. 2, p. 143–146, 9 fev. 2009.

LOPES, S. C. et al. Topical photodynamic therapy with chloroaluminum phthalocyanine liposomes is as effective as systemic pentavalent antimony in the treatment of experimental cutaneous leishmaniasis. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 28, p. 210–215, 1 dez. 2019.

LOSQUADRO, W. D. Anatomy of the Skin and the Pathogenesis of Nonmelanoma Skin Cancer. **Facial Plastic Surgery Clinics of North America**, v. 25, n. 3, p. 283–289, 1 ago. 2017.

MANALO, I. F. et al. Triple therapy with intralesional 5-fluorouracil, chemowraps, and acitretin: A well-tolerated option for treatment of widespread cutaneous squamous cell carcinomas on the legs. **JAAD Case Reports**, v. 5, n. 12, p. 1051–1054, 1 dez. 2019.

MANIKKATH, J. et al. Delving Deeper into Dermal and Transdermal Drug Delivery: Factors and Mechanisms Associated with Nanocarrier-mediated Strategies. **Current Pharmaceutical Design**, v. 24, n. 27, p. 3210–3222, 28 set. 2018.

MANK, V.; POLONSKA, T. Use of natural oils as bioactive ingredients of cosmetic products. **Food technologies, Ukrainian Food Journal**, v. 5, n. 2, 2016.

MARITIM, S.; BOULAS, P.; LIN, Y. Comprehensive analysis of liposome formulation parameters and their influence on encapsulation, stability and drug release in glibenclamide liposomes. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 592, 5 jan. 2021.

MARTINS, S. et al. Solid lipid nanoparticles as intracellular drug transporters: An investigation of the uptake mechanism and pathway. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 430, n. 1–2, p. 216–227, 1 jul. 2012.

MENDES, A. V. DA S. et al. Utilização de lipossomas no diagnóstico e tratamento do câncer de pele não melanoma: uma revisão integrativa. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 10, p. e435111032984, 6 ago. 2022.

MEZEI, M.; GULASEKHARAM, V. LIPOSOMES-A SELECTIVE DRUG DELIVERY SYSTEM FOR THE TOPICAL ROUTE OF ADMINISTRATION I. Lotion Dosage Form. **Life Sciences**, v. 26, p. 1473–1477, 1980.

MFOUO-TYNGA, I. S. et al. Features of third generation photosensitizers used in anticancer photodynamic therapy: Review. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 34, 1 jun. 2021.

MICHELETTO, Y. M. S. et al. Investigation of self-association between new glycosurfactant N-acetyl- β -d-glucosaminyl-PEG-docosanate and soybean phosphatidylcholine into vesicles. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 467, p. 166–172, 1 fev. 2015.

MOHAMED, S. A.; HARGEST, R. Surgical anatomy of the skin. **BASIC SCIENCE**, 2021.

MORROW, K. J.; BAWA, R.; WEI, C. **Recent Advances in Basic and Clinical Nanomedicine**. **Medical Clinics of North America**, set. 2007.

MORTON, C. A. et al. A randomized, multinational, noninferiority, phase III trial to evaluate the safety and efficacy of BF-200 aminolaevulinic acid gel vs. methyl aminolaevulinate cream in the treatment of nonaggressive basal cell carcinoma with photodynamic therapy. **British Journal of Dermatology**, v. 179, n. 2, p. 309–319, 1 ago. 2018.

NAGUIB, Y. W.; KUMAR, A.; CUI, Z. The effect of microneedles on the skin permeability and antitumor activity of topical 5-fluorouracil. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 4, n. 1, p. 94–99, 2014.

NAIK, A. et al. controlled release Mechanism of oleic acid-induced skin penetration enhancement in vivo in humans. **Journal of Controlled Release**, v. 37, p. 299–306, 1995.

NUNES, S. M. T.; SGUILLA, F. S.; TEDESCO, A. C. Photophysical studies of zinc phthalocyanine and chloroaluminum phthalocyanine incorporated into liposomes in the presence of additives. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, n. 2, p. 273–284, 2004.

NWOGU, C. et al. Porfimer Sodium Versus PS785 for Photodynamic Therapy (PDT) of Lung Cancer Xenografts in Mice (A Novel Agent for Lung Cancer PDT). **Journal of Surgical Research**, v. 263, p. 245–250, 1 jul. 2021.

ONGPIPATTANAKUL, B. et al. Evidence that oleic acid exists in a separate phase within stratum corneum lipids. **Pharmaceutical research**, v. 8, n. 3, 1991.

ONISZCZUK, A. et al. The potential of photodynamic therapy (PDT)—Experimental investigations and clinical use. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 83, p. 912–929, 1 out. 2016.

PADYA, B. S. et al. Stimuli-responsive and cellular targeted nanoplatfoms for multimodal therapy of skin cancer. **European Journal of Pharmacology**, v. 890, 5 jan. 2021.

PENG, Q. et al. Selective distribution of porphyrins in skin thick basal cell carcinoma after topical application of methyl 5-aminolevulinate. **J Photochem Photobiol B Biol**, v. 62, p.140–5, 2001.

PERALTA, M. F. et al. Liposomes can both enhance or reduce drugs penetration through the skin. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, 1 dez. 2018.

PERECIN, D.; CARGNELUTTI FILHO, A. Comparison wise and experiment wise effects in factorial experiments interactions. **Ciênc. agrotec**, n. 1, p. 68–72, 2008.

PEREIRA, G. F. M.; TASSO, T. T. From cuvette to cells: How the central metal ion modulates the properties of phthalocyanines and porphyrazines as photosensitizers. **Inorganica Chimica Acta**, v. 519, 1 maio 2021.

PETRELLIS, M. C. et al. PROINFLAMMATORY EFFECTS OF PHOTOACTIVATED METHYLENE BLUE ON RAT MODEL OF WALKER 256 CARCINOSARCOMA. **Experimental Oncology**, v. 41, p. 112–122, 2019.

PETRILLI, R. et al. Cetuximab Immunoliposomes enhance Delivery of 5-FU to Skin Squamous Carcinoma Cells. **Anticancer Agents Med Chem**, v. 17, n. 2, p. 301–308, 2017.

PETUKHOVA, T. A. et al. Effect of expedited microneedle-assisted photodynamic therapy for field treatment of actinic keratoses: A randomized clinical trial. **JAMA Dermatology**, v. 153, n. 7, p. 637–643, 1 jul. 2017.

PIERRE, M. B. R. et al. Oleic acid as optimizer of the skin delivery of 5-aminolevulinic acid in photodynamic therapy. **Pharmaceutical Research**, v. 23, n. 2, p. 360–366, fev. 2006.

PINILLA, C. M. B.; THYS, R. C. S.; BRANDELLI, A. Antifungal properties of phosphatidylcholine-oleic acid liposomes encapsulating garlic against environmental fungal in wheat bread. **International Journal of Food Microbiology**, v. 293, p. 72–78, 16 mar. 2019.

PRAÇA, F. S. G. et al. Evaluation of critical parameters for in vitro skin permeation and penetration studies using animal skin models. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 111, p. 121–132, 1 jan. 2018.

QIDWAI, A. et al. Role of nanocarriers in photodynamic therapy. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 30, 1 jun. 2020.

QUIÑONES, R. et al. Quantification of Cannabis in Infused Consumer Products and Their Residues on Skin. **ACS Pharmacology and Translational Science**, v. 5, n. 8, p. 642–651, 12 ago. 2022.

RAK, J. et al. Drug delivery systems for phthalocyanines for photodynamic therapy. **Anticancer Research**, v. 39, n. 7, p. 3323–3339, 2019.

RAMOS, A. P. Dynamic Light Scattering Applied to Nanoparticle Characterization. Em: **Nanocharacterization Techniques**. P. 99, 2017.

RANE, S.; PRABHAKAR, B. Optimization of Paclitaxel Containing pH-Sensitive Liposomes By 3 Factor, 3 Level Box-Behnken Design Rane and Prabhakar: Optimization of pH-Sensitive Liposomes of Paclitaxel. **Indian Journal of pharmaceutical sciences**, 2013.

RATUSHNY, V. et al. From keratinocyte to cancer: The pathogenesis and modeling of cutaneous squamous cell carcinoma. **Journal of Clinical Investigation**, v. 122, n. 2, p. 464–472, fev. 2012.

REIS, T. A. et al. Combination of cyclodextrin complexation and iontophoresis as a promising strategy for the cutaneous delivery of aluminum-chloride phthalocyanine in photodynamic therapy. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 139, 1 nov. 2019.

RIBEIRO, J. B. P. et al. Study of the efficacy of N-methyl glucamine antimoniate (SbV) associated with photodynamic therapy using liposomal chloroaluminium phthalocyanine in the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (L.) amazonensis* in C57BL6 mice. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 26, p. 261–269, 1 jun. 2019.

RIBEIRO, M. D. M. M.; BARRERA ARELLANO, D.; FERREIRA GROSSO, C. R. The effect of adding oleic acid in the production of stearic acid lipid microparticles with a hydrophilic core by a spray-cooling process. **Food Research International**, v. 47, n. 1, p. 38–44, jun. 2012.

RISALITI, L. et al. Topical formulations of delta-aminolevulinic acid for the treatment of actinic keratosis: Characterization and efficacy evaluation. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 115, p. 345–351, 30 mar. 2018.

ROBERTS, M. S. et al. Topical drug delivery: History, percutaneous absorption, and product development. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 177, 1 out. 2021.

ROBSON, A. L. et al. Advantages and limitations of current imaging techniques for characterizing liposome morphology. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, n. FEB, 6 fev. 2018.

ROCHA, M. S. T. et al. Aluminum-chloride-phthalocyanine encapsulated in liposomes: Activity against naturally occurring dog breast cancer cells. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 8, n. 2, p. 251–257, 2012.

ROSTAMABADI, H. et al. Evaluating the structural properties of bioactive-loaded nanocarriers with modern analytical tools. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 19, n. 6, p. 3266–3322, 1 nov. 2020.

SANTOS, K. L. M. et al. Prospective application of phthalocyanines in the photodynamic therapy against microorganisms and tumor cells: A mini-review. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 32, 1 dez. 2020.

SARKAR, P.; BHATTACHARYA, S.; PAL, T. K. Application of statistical design to evaluate critical process parameters and optimize formulation technique of polymeric nanoparticles. **Royal Society Open Science**, v. 6, n. 7, 1 jul. 2019.

SAWAN, S. et al. Aptamers functionalized metal and metal oxide nanoparticles: Recent advances in heavy metal monitoring. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 157, 1 dez. 2022.

SEOUDI, R.; EL-BAHY, G. S.; EL SAYED, Z. A. FTIR, TGA and DC electrical conductivity studies of phthalocyanine and its complexes. **Journal of Molecular Structure**, v. 753, n. 1–3, p. 119–126, 28 out. 2005.

SHAH, A. et al. Nanocarriers for targeted drug delivery. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 62, 1 abr. 2021.

SHENDE, P.; VAIDYA, J.; GAUD, R. S. Pharmacotherapeutic approaches for transportation of anticancer agents via skin. **Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology**, v. 46, n. sup3, p. S423–S433, 12 nov. 2018.

SHI, L. et al. In vitro evaluation of 5-aminolevulinic acid (ALA) loaded PLGA nanoparticles. **International Journal of Nanomedicine**, v. 8, p. 2669–2676, 23 jul. 2013.

SIDOROFF, A.; THALER, P. Taking treatment decisions in non-melanoma skin cancer-The place for topical photodynamic therapy (PDT). **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 7, n. 1, p. 24–32, mar. 2010.

SILVA, E. P. O.; FRANCHI, L. P.; TEDESCO, A. C. Chloro-aluminium phthalocyanine loaded in ultradeformable liposomes for photobiology studies on human glioblastoma. **RSC Advances**, v. 6, n. 83, p. 79631–79640, 2016.

SIQUEIRA-MOURA, M. P. et al. Validated spectrophotometric and spectrofluorimetric methods for determination of chloroaluminum phthalocyanine in nanocarriers. **Pharmazie**, v. 65, n. 1, p. 9–14, jan. 2010.

SOLANKI, A. B.; PARIKH, J. R.; PARIKH, R. H. Formulation and Optimization of Piroxicam Proniosomes by 3-Factor, 3-Level Box-Behnken Design. **AAPS PharmSciTech**, v. 8, n. 4, 2007.

SOUTO, E. B. et al. Non-melanoma skin cancers: physio-pathology and role of lipid delivery systems in new chemotherapeutic treatments. **Neoplasia (United States)**, v. 30, 1 ago. 2022.

SRISUK, P. et al. Physico-chemical characteristics of methotrexate-entrapped oleic acid-containing deformable liposomes for in vitro transepidermal delivery targeting psoriasis treatment. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 427, n. 2, p. 426–434, 10 maio 2012.

SUDHAKAR, B.; KRISHNA, M. C.; MURTHY, K. V. R. Factorial design studies of antiretroviral drug-loaded stealth liposomal injectable: PEGylation, lyophilization and pharmacokinetic studies. **Applied Nanoscience (Switzerland)**, v. 6, n. 1, p. 43–60, 1 jan. 2016.

SUNG, H. et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 71, n. 3, p. 209–249, maio 2021.

SUPPASANSATORN, P. et al. Microemulsions as topical delivery vehicles for the anti-melanoma prodrug, temozolomide hexyl ester (TMZA-HE). **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 59, n. 6, p. 787–794, 18 fev. 2007.

SWAMY, P. C. A. et al. Near Infrared (NIR) absorbing dyes as promising photosensitizer for photo dynamic therapy. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 411, 31 maio 2020.

SZEIMIES, R. M. et al. Photodynamic therapy for non-melanoma skin cancer. **Acta Dermatovenereologica**, v. 85, n. 6, p. 483–490, nov. 2005.

TANG, H. et al. Theoretical Description of Transdermal Transport of Hydrophilic Permeants: Application to Low-Frequency Sonophoresis. **Jornal of pharmaceutical sciences**, v. 90, n. 5, 2001.

TSAKOVSKA, I. et al. Quantitative structure-skin permeability relationships. **Toxicology**, v. 387, p. 27–42, 15 jul. 2017.

TSUBONE, T. M.; BAPTISTA, M. S.; ITRI, R. Understanding membrane remodelling initiated by photosensitized lipid oxidation. **Biophysical Chemistry**, v. 254, 1 nov. 2019.

VERMA, D. D. et al. Particle size of liposomes influences dermal delivery of substances into skin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 258, n. 1–2, p. 141–151, 4 jun. 2003.

VILSINSKI, B. H. et al. Formulation of chloroaluminum phthalocyanine incorporated into PS-b-PAA diblock copolymer nanomicelles. **Journal of Molecular Liquids**, v. 271, p. 949–958, 1 dez. 2018.

WAGHULE, T. et al. Microneedles: A smart approach and increasing potential for transdermal drug delivery system. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 109, p. 1249–1258, 1 jan. 2019.

WALKER, H. S.; HARDWICKE, J. Non-melanoma skin cancer. **WOUND MANAGEMENT**, 2021.

WANG, X. et al. Treating cutaneous squamous cell carcinoma using 5-aminolevulinic acid poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticle-mediated photodynamic therapy in a mouse model. **International Journal of Nanomedicine**, v. 10, p. 347–355, 6 jan. 2015.

WANG, X. et al. New porphyrin photosensitizers—Synthesis, singlet oxygen yield, photophysical properties and application in PDT. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 279, 15 out. 2022.

WANG, X.; LI, S.; LIU, H. Co-delivery of chitosan nanoparticles of 5-aminolevulinic acid and shGBAS for improving photodynamic therapy efficacy in oral squamous cell carcinomas. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 34, 1 jun. 2021.

WILLIAMS, A. C.; BARRY, B. W. Penetration enhancers. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, n. SUPPL., p. 128–137, dez. 2012.

WU, Y. et al. An apoptotic body-biomimic liposome in situ upregulates anti-inflammatory macrophages for stabilization of atherosclerotic plaques. **Journal of Controlled Release**, v. 316, p. 236–249, 28 dez. 2019.

YAMADA, M.; PROW, T. W. Physical drug delivery enhancement for aged skin, UV damaged skin and skin cancer: Translation and commercialization. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 153, p. 2–17, 1 jan. 2020.

YOKOMIZO, Y.; AND, X.; SAGITANI, H. Effects of Phospholipids on the in Vitro Percutaneous Penetration of Prednisolone and Analysis of Mechanism by Using Attenuated

Total Reflectance–Fourier Transform Infrared Spectroscopy. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 85, n. 11, 1996.

YOKOMIZO, Y.; SAGITANI, H. controlled release Effects of phospholipids on the percutaneous penetration of indomethacin through the dorsal skin of guinea pigs in vitro. **Journal of Controlled Release**, v. 38, p. 267–274, 1996.

YOON, I.; LI, J. Z.; SHIM, Y. K. Advance in photosensitizers and light delivery for photodynamic therapy. **Clinical Endoscopy**, v. 46, n. 1, p. 7–23, 2013.

YU, X.; CABOOTER, D.; DEWIL, R. Effects of process variables and kinetics on the degradation of 2,4-dichlorophenol using advanced reduction processes (ARP). **Journal of Hazardous Materials**, v. 357, p. 81–88, 5 set. 2018.

YUAN, L. et al. Nanocarriers for promoting skin delivery of therapeutic agents. **Applied Materials Today**, v. 27, 1 jun. 2022.

ZHANG, Y. et al. Sodium dodecyl sulfate improved stability and transdermal delivery of salidroside-encapsulated niosomes via effects on zeta potential. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 580, 30 abr. 2020.

ZHU, Y.; LIAO, L. Applications of nanoparticles for anticancer drug delivery: A review. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 15, n. 7, p. 4753–4773, 1 jul. 2015.

ZSIKÓ, S. et al. Methods to evaluate skin penetration in vitro. **Scientia Pharmaceutica**, v. 87, n. 3, 1 set. 2019.