



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

THAYANE SOARES LIMA

**NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS DE POLICAPROLACTONA PARA ENTREGA TÓPICA
DO FOTOSSENSIBILIZANTE AZUL DE METILENO NA TERAPIA DO CÂNCER DE PELE EM
ASSOCIAÇÃO À SONOFORESE**

FORTALEZA

2023

THAYANE SOARES LIMA

NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS DE POLICAPROLACTONA PARA ENTREGA TÓPICA
DO FOTOSSENSIBILIZANTE AZUL DE METILENO NA TERAPIA DO CÂNCER DE PELE EM
ASSOCIAÇÃO À SONOFORESE

Dissertação de Mestrado apresentada no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará, para aprovação do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Biologia para Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Josimar de Oliveira Eloy

FORTALEZA

2023

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)

- L711n Lima, Thayane Soares.
Nanopartículas poliméricas de policaprolactona para entrega tópica do fotossensibilizante azul de metileno na terapia do câncer de pele em associação à sonoforese / Thayane Soares Lima. – 2023.
90 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Fortaleza, 2023.
Orientação: Prof. Dr. Josimar De Oliveira Eloy.
1. Azul de metileno. 2. Nanopartículas. 3. Fotoquimioterapia. 4. Neoplasias cutâneas. 5. Fonoforese. I.
Título.

CDD 615

THAYANE SOARES LIMA

NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS DE POLICAPROLACTONA PARA ENTREGA TÓPICA DO
FOTOSSENSIBILIZANTE AZUL DE METILENO NA TERAPIA DO CÂNCER DE PELE EM
ASSOCIAÇÃO À SONOFORESE

Dissertação de Mestrado apresentada no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará, para aprovação do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Biologia para Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Josimar de Oliveira Eloy

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Josimar de Oliveira Eloy (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dra. Yara Santiago de Oliveira
Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira (UNILAB)

Prof. Dr. Florêncio Sousa Gouveia Júnior
Centro Universitário Fametro (UNIFAMETRO)

AGRADECIMENTOS

Ao ser supremo que rege toda a humanidade e me deu a oportunidade de simplesmente existir. Me sinto encantada e extremamente privilegiada de fazer parte da complexidade que é o universo.

Aos meus avós, minha mãe, meus tios, madrinha e primas por me darem o suporte necessário e me incentivarem nesta árdua caminhada.

Ao meu namorado e melhor amigo, Walter por me entender e auxiliar durante 9 anos em todos os meus surtos, conhecer as piores partes de mim e ainda sim me aceitar do jeitinho que eu sou.

À Universidade Federal do Ceará e seu corpo docente, especialmente ao professor Said por me proporcionar momentos incríveis de aprendizado contribuindo diretamente na minha ascensão como profissional.

Ao meu orientador Prof. Dr. Josimar de Oliveira Eloy, por ser um profissional extremamente ético e disposto a ensinar com leveza e responsabilidade. Por todo o suporte e principalmente pela compreensão nos momentos difíceis que passei.

A Profa. Dra. Raquel Petrilli por sua colaboração e orientação valiosas, tanto no que se refere à parte experimental quanto à redação deste trabalho.

À banca examinadora, à suas futuras observações e contribuições no trabalho, por suas vastas experiências no assunto, sinto-me imensamente honrada com a oportunidade.

À Central Analítica da UFC, ao laboratório CEDEFAR e ao grupo de pesquisa GPNANO, juntamente com todos os seus integrantes pela assistência essencial para realização dos experimentos, ajuda com manuseio de equipamentos, boas condutas de laboratório, além da amizade sincera que aflorou dentro do ambiente de trabalho.

Aos meus amigos da faculdade, mais conhecidos como “As Inês”, Allyson, Anderson, Beatriz, Brenda, Carol, Daniel, Helaynne, Ian, Ingrid, João Pedro, Landerson e Lara pelos momentos de loucura e insanidade, mas também pelo aprendizado mútuo e conselhos que levarei para toda vida.

Ao meu amigo da vida, Isaac Oliveira por me amparar e tornar minha vida mais divertida e louca.

Aos meus amigos de trabalho, especialmente ao Florêncio Sousa Gouveia Junior por me auxiliar nas ideias relacionadas as figuras deste trabalho e por aguentar meus surtos passageiros.

RESUMO

O carcinoma de células escamosas (SCC) é um subtipo do câncer de pele não melanoma que se origina nas células da epiderme e representa cerca de 20% dos casos. O tratamento convencional é a excisão cirúrgica, porém nem todos os pacientes são candidatos a esse procedimento. Nesse contexto, terapias alternativas que se utilizam da via tópica, como a terapia fotodinâmica (TFD), ganham grande relevância. A TFD baseia-se na produção de radicais livres que induzem a morte das células cancerosas. O azul de metileno (AM) destaca-se como fotossensibilizador, no entanto, devido à sua natureza hidrofílica e à rápida redução enzimática no ambiente biológico, sua capacidade de penetrar em camadas mais profundas da pele é limitada. Desse modo, para aumentar a penetração cutânea do fármaco são utilizadas algumas estratégias, como a associação de nanocarreadores e métodos físicos. O presente estudo tem como principal objetivo desenvolver nanopartículas poliméricas para veiculação tópica de AM, associando ou não ao uso de sonoforese para o tratamento do SCC através da TFD. As nanopartículas foram desenvolvidas utilizando a técnica de dupla emulsificação-evaporação do solvente e caracterizadas físico-quimicamente, resultando em tamanho médio de $156,93 \text{ nm} \pm 8,26$, índice de polidispersão de $0,11 \pm 0,05$, eficiência de encapsulamento de $94,22\% \pm 2,19$ e potencial zeta de $-10,08 \text{ mV} \pm 1,12$. A avaliação morfológica por microscopia eletrônica de varredura mostrou nanopartículas esféricas. O FTIR permitiu uma análise qualitativa, em que os espectros das nanopartículas com e sem fármaco foram similares, inferindo assim uma encapsulação quase completa do fármaco. O reagente 1,3-difenilisobenzofurano (DPBF) foi utilizado para detectar a produção de espécies reativas de oxigênio, no qual a nanopartícula mostrou perfil mais sustentado. Estudos de liberação *in vitro* pelo método passivo mostram a nanopartícula compatível com o modelo matemático de primeira ordem. O estudo de penetração cutânea de forma passiva e com sonoforese, foi realizado utilizando pele íntegra de orelha de suíno, com quantificação do fármaco em diferentes estratos utilizando a espectrofotometria UV-Vis em que se observou maior concentração de AM na epiderme + derme após sonoforese, correspondendo a $24,31$ e $23,81 \text{ } \mu\text{g}/\text{cm}^2$, para solução e nanopartícula, respectivamente. O ensaio MTT foi utilizado para avaliar citotoxicidade em células da linhagem humana de carcinoma epidermóide (A431) expostas ou não a irradiação. Valores de $79,84$; $40,46$; $22,37$; $9,90 \text{ } \mu\text{M}$, representam, respectivamente, o IC_{50} da solução e nanopartícula AM sem e com irradiação luminosa em um tempo de incubação de 2 horas. A análise por microscopia confocal mostrou alta captação celular da nanopartícula. Os resultados obtidos demonstram sucesso na obtenção das nanopartículas promovendo a melhora expressiva da penetração de AM, capaz de penetrar nas células e causar efeito fototóxico. Além disso, há um ineditismo na pesquisa, pois até onde se sabe, este é o primeiro relato de encapsulamento de AM em nanopartículas de PCL para aplicação em câncer de pele usando TFD.

Palavras-chave: Azul de metileno; nanopartículas; fotoquimioterapia; neoplasias cutâneas; absorção cutânea; fonoforese.

ABSTRACT

Squamous cell carcinoma (SCC) is a subtype of non-melanoma skin cancer that originates in epidermal cells and represents about 20% of cases. The conventional treatment is surgical excision, but not all patients are candidates for this procedure. In this context, alternative therapies that use the topical route, such as photodynamic therapy (PDT), gain great relevance. PDT is based on the production of free radicals that induce the death of cancer cells. Methylene blue (AM) stands out as a photosensitizer, however, due to its hydrophilic nature and rapid enzymatic reduction in the biological environment, its ability to penetrate deeper layers of the skin is limited. Therefore, to increase the skin penetration of the drug, some strategies are used, such as the association of nanocarriers and physical methods. The main objective of the present study is to develop polymeric nanoparticles for topical delivery of AM, whether or not associated with the use of sonophoresis for the treatment of SCC through PDT. The nanoparticles were developed using the double solvent emulsification-evaporation technique and characterized physicochemically, resulting in an average size of $156.93 \text{ nm} \pm 8.26$, polydispersity index of 0.11 ± 0.05 , encapsulation efficiency of $94.22\% \pm 2.19$ and zeta potential of $-10.08 \text{ mV} \pm 1.12$. Morphological evaluation by scanning electron microscopy showed spherical nanoparticles. FTIR allowed a qualitative analysis, in which the spectra of nanoparticles with and without drug were similar, thus inferring an almost complete encapsulation of the drug. The reagent 1,3-diphenylisobenzofuran (DPBF) was used to detect the production of reactive oxygen species, in which the nanoparticle showed a more sustained profile. In vitro release studies using the passive method show the nanoparticle compatible with the first-order mathematical model. The skin penetration study passively and with sonophoresis was carried out using intact pig ear skin, with quantification of the drug in different strata using UV-Vis spectrophotometry in which a higher concentration of AM was observed in the epidermis + dermis after sonophoresis, corresponding to 24.31 and $23.81 \text{ } \mu\text{g}/\text{cm}^2$, for solution and nanoparticle, respectively. The MTT assay was used to evaluate cytotoxicity in cells of the human squamous cell carcinoma line (A431) exposed or not to irradiation. Values of 79.84 ; 40.46 ; 22.37 ; $9.90 \text{ } \mu\text{M}$, represent, respectively, the IC₅₀ of the AM solution and nanoparticle without and with light irradiation in an incubation time of 2 hours. Confocal microscopy analysis showed high cellular uptake of the nanoparticle. The results obtained demonstrate success in obtaining nanoparticles, promoting a significant improvement in the penetration of AM, capable of penetrating cells and causing a phototoxic effect. Furthermore, the research is unprecedented, as far as we know, this is the first report of encapsulation of AM in PCL nanoparticles for application in skin cancer using PDT.

Keywords: Methylene blue; nanoparticles; photochemotherapy; skin neoplasms; skin absorption; sonophoresis.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ALA	Ácido 5 aminolevulínico
AM	Azul de Metileno
BBD	<i>Design de Box Behnken</i>
DMEM	Meio de Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPBF	1,3-difenilisobenzofurano
ERO	Espécie Reativa de Oxigênio
FS	Fotossensibilizador
INCA	Instituto Nacional de Câncer
KCL	Cloreto de Potássio
LED	Diodo emissor de luz
MTT	Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il] -2,5-difeniltetrazólio
NP	Nanopartícula
PCL	Policaprolactona
PVA	Álcool polivinílico
SCC	<i>Squamous Cell Carcinoma</i> (Carcinoma Celular Escamoso)
TFD	Terapia Fotodinâmica
UVA	Radiação Ultravioleta A
UVB	Radiação Ultravioleta B

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura da pele com a esquematização dos diferentes estratos da epiderme e estrato córneo.	18
Figura 2. Estimativas para o ano de 2023 das taxas brutas e ajustadas a de incidência por 100 mil habitantes e do número de casos novos de câncer, segundo sexo e localização primária* 21	
Figura 3. Carcinoma de células escamosas no dorso da mão (a), grande lesão ceratótica com ulceração e sangramento compatível com SCC (b), padrão vascular típico de SCC na dermatoscopia (c).	23
Figura 4. O processo de reações de redução e oxidação envolvendo o azul de metileno (AM). O AM é reduzido de maneira espontânea por coenzimas como o NAD(P)H, resultando na formação do leuco-azul de metileno (LAM), uma substância incolor e pode ser reoxidado por oxigênio molecular (O ₂), produzindo peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂) neste ciclo dinâmico (a) e sua ação fotodinâmica através da absorção de luz (b).	30
Figura 5. Representação esquemática da pele, destacando as principais vias de permeação, incluindo as vias intercelular, transcelular e transapendicular.	31
Figura 6. Representação esquemática da estrutura de nanoesferas, nanocápsulas e micelas poliméricas.	36
Figura 7. Os principais mecanismos de penetração cutânea dos nanocarreadores.....	38
Figura 8. Representação gráfica do mecanismo proposto pela sonoforese, que visa perturbar o estrato córneo da pele para melhorar a entrega de medicamentos tópicos.....	41
Figura 9. Aparato utilizado para a realização da medição da resistência da pele de orelha suína.	49
Figura 10. Célula de Franz montada para o experimento de avaliação da penetração cutânea de AM, com indicações dos seus principais compartimentos.....	51
Figura 11. Célula de Franz montada para o experimento de avaliação da penetração cutânea de AM, com indicações dos seus principais compartimentos.....	60
Figura 12. Espectro de FTIR de 4000 a 600 cm ⁻¹ do AM em pó (a), nanopartícula contendo AM (b) e nanopartícula branco (c).	61
Figura 13. Perfil de liberação in vitro comparando solução e nanopartícula de azul de metileno pelo método passivo.	63
Figura 14. Gráfico contemplando a modelagem de dados de dissolução da solução nos modelos de ordem zero (a), primeira ordem (b) e Higuchi (c).	64
Figura 15. Gráfico contemplando a modelagem de dados de dissolução da nanopartícula nos	

modelos de ordem zero (a), primeira ordem (b), Higuchi (c), Weibull (d) e Hopfenberg (e)..	65
Figura 16. Estudo do decaimento da absorbância de DPBF na presença da solução e nanopartícula azul de metileno, com irradiação (630 nm, 6,7 J/cm ² , 0,001841 W/cm ²) em intervalos de tempo de 3 min, até 30 min de irradiação luminosa.	67
Figura 17. Varredura espectral realizada da solução de AM em metanol (a), em amostras de pele extraídas com metanol com (b) e sem aplicação de AM (c) para análise de interferentes teciduais.	70
Figura 18. Gráfico da curva de calibração analisada em espectrofotômetro UV-Vis para desenvolvimento do método analítico de quantificação de AM na pele.	71
Figura 19. Representação gráfica da quantificação de AM em solução e nanopartículas no estrato córneo e epiderme viável sem (a) ou com aplicação de sonoforese (b) em pele de orelha suína após estudo de penetração por 16 h. * p < 0,05; **** p < 0,0001.	73
Figura 20. Captação celular das nanopartículas marcadas com Rodamina 123 e DAPI nos tempos 1, 3, 6 e 24h por microscopia confocal.	75
Figura 21. Viabilidade celular da solução e nanopartícula de azul de metileno e nanopartícula branco, com e sem luz, com tempo de incubação de 5 min. Teste ANOVA one-way com pós-teste de Bonferroni entre os grupos. * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; **** p < 0,0001.	76
Figura 22. Viabilidade celular da solução e nanopartícula de azul de metileno e nanopartícula branco, com e sem luz, com tempo de incubação de 2 horas. Teste ANOVA one-way com pós-teste de Bonferroni entre os grupos. * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; **** p < 0,0001.	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Parâmetros utilizados no estudo de LIMA et al., 2023 para a otimização das formulações de nanopartícula de azul de metileno, em conjunto com as respostas das variáveis dependentes.	55
Tabela 2. Comparação entre os valores previstos através da otimização no software Minitab® e os valores reais observados para a formulação de nanopartículas contendo azul de metileno.	55
Tabela 3. Valores do coeficiente de determinação (R^2) e MSC obtidos de acordo com modelos matemáticos fornecidos pelo software DDSolver para solução e nanopartícula contendo AM.	65
Tabela 4. Recuperação (%) de AM em pele de orelha de suíno através da extração com metanol	69
Tabela 5. Quantificação do AM em solução e nanopartícula polimérica em estrato córneo (EC) e epiderme viável e derme (EV + D) sem ou com aplicação de sonoforese de pele de orelha de suíno após estudo de penetração por 16h.	72
Tabela 6. IC_{50} da solução e nanopartículas contendo AM com ou sem irradiação luminosa nos tempos de incubação de 5 min e 2 h.	79

SUMÁRIO

RESUMO.....	6
SUMÁRIO.....	12
1 INTRODUÇÃO.....	14
2 REFERÊNCIAL TEÓRICO.....	17
2.1 Pele: Estrutura e funções.....	17
2.2 Câncer de pele: Carcinoma de células escamosas (CCE).....	20
2.3 Terapia fotodinâmica.....	24
2.4 Azul de metileno: Fotossensibilizador para tratamento do SCC.....	28
2.5 Via tópica: mecanismos gerais de absorção cutânea.....	30
2.6 Nanopartículas poliméricas como adjuvante na aplicação tópica.....	33
2.7 Métodos físicos para aprimorar a entrega tópica: Sonoforese.....	39
3 OBJETIVOS.....	43
3.1 Objetivo Geral.....	43
3.2 Objetivos Específicos.....	43
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	44
4.1 Materiais.....	44
4.2 Desenvolvimento das nanopartículas.....	44
4.3 Caracterização físico-química.....	44
4.3.1 Avaliação do tamanho de partícula, índice de polidispersividade e potencial zeta.....	44
4.3.2 Eficiência de encapsulação do AM.....	45
4.3.3 Avaliação da morfologia das nanopartículas por microscopia eletrônica de varredura.....	45
4.3.4 Análise de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	46
4.4 Liberação <i>in vitro</i>	46
4.4.1 Método analítico para quantificação de AM.....	46
4.4.2 Método de liberação passiva.....	46
4.5 Geração de espécies reativas de oxigênio (EROs).....	47
4.6 Estudos de penetração cutânea.....	47
4.6.1 Verificação da resistividade das peles de orelha suína.....	47
4.6.2 Quantificação do AM em pele de orelha de suíno por espectrofotometria UV-Vis.....	48
4.6.3 Quantificação de AM nas camadas da pele e no compartimento receptor.....	49
4.6.4 Pré-tratamento da pele com sonoforese.....	50
4.7 Estudos celulares.....	51
4.7.1 Cultura celular.....	51
4.7.2 Captação celular.....	51

4.7.3 Fotocitotoxicidade e citotoxicidade	52
4.8 Análise estatística.....	52
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
5.1 Desenvolvimento e caracterização físico-química das nanopartículas	54
5.2 Avaliação da morfologia das nanopartículas por microscopia eletrônica de varredura	58
5.3 Análise de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)	60
5.4 Liberação <i>in vitro</i>	62
5.5 Geração de espécies reativas de oxigênio	67
5.6 Avaliação de penetração cutânea de AM em solução ou nanopartículas de forma passiva ou com aplicação de sonoforese	68
5.7 Captação Celular	74
5.8 Avaliação da fotocitotoxicidade <i>in vitro</i> em células de carcinoma epidermóide	76
6 CONCLUSÃO	81
REFERÊNCIAS	82

1 INTRODUÇÃO

A pele é o maior órgão do corpo humano e atua como primeira linha de defesa contra fatores externos perigosos tais como os microrganismos, produtos químicos e radiação ultravioleta. É constituída de tecido estratificado e suas principais camadas são a epiderme e derme. O crescimento anormal das células da pele devido a exposição a determinados agentes ambientais e/ou predisposição individual leva ao desenvolvimento de câncer de pele. No Brasil, o tipo mais frequente é o câncer de pele não melanoma, subdividido em carcinoma basocelular e carcinoma de células escamosas, o qual possui um bom prognóstico quando detectado precocemente. No entanto, sua crescente incidência e morbidade tem gerado grande interesse no desvendar de sua patogênese e na busca de novos tratamentos não invasivos. No Brasil, a estimativa do número de novos casos para cada ano do triênio de 2023 a 2025, é de 220.490, sendo 101.920 em homens e 118.570 em mulheres (INCA, 2023; ELMOWAFY, 2021; KRISHNAN; MITRAGOTRI, 2020; MADAN; LEAR; SZEIMIES, 2010; WALKER; HARDWICKE, 2022).

O carcinoma de células escamosas (SCC, da sigla em inglês *squamous cell carcinoma*) se origina de células malignas de proliferação rápida na epiderme e atinge comumente as regiões da cabeça e pescoço. Os fatores de risco para seu desenvolvimento surgem de uma combinação de fatores ambientais e genéticos, sendo a causa mais comum a exposição prolongada à luz ultravioleta (UV). Essa patologia tem chamado a atenção nos últimos anos pelo seu potencial agressivo em causar metástase para locais distantes ou gânglios linfáticos e o aumento global expressivo em sua taxa de ocorrência desde 1976. Tradicionalmente, as primeiras linhas de tratamento são as modalidades cirúrgicas, como a excisão e a cirurgia micrográfica de Mohs. No entanto, a decisão de realizar a cirurgia pode ser afetada por várias considerações, incluindo comorbidades do paciente, o local anatômico, tamanho e multiplicidade das lesões. O tratamento tópico do câncer de pele pode, portanto, ser mais apropriado em certos casos (ADNANE; EL-ZAYAT; FAHMY, 2022; CULLEN et al., 2020; ZHANG et al., 2019).

Com isso, a terapia fotodinâmica (TFD) tornou-se uma abordagem alternativa em ascensão para tratar e limitar cânceres malignos, incluindo o câncer de pele, por possuir características de tratamento minimamente invasivo, especificidade de aplicação e baixa toxicidade cumulativa. Seu mecanismo de ação baseia-se na ativação de um agente fotossensibilizador pela luz em um comprimento de onda específico, resultando na geração espécies reativas de oxigênio (EROs), que causam danos aos componentes celulares resultando em morte da célula cancerígena. Além de suas vantagens intrínsecas, a TFD, ao utilizar a via

tópica para aplicação do fotossensibilizador, consegue agregar vantagens como a diminuição dos efeitos colaterais e aumento da concentração localizada do fármaco nas camadas da pele (ADNANE; EL-ZAYAT; FAHMY, 2022; ZHENG et al., 2020).

O azul de metileno (AM) é corante pertencente ao grupo das fenotiazinas sendo atualmente um dos fotossensibilizadores mais comumente utilizados devido a sua alta produção de EROs, principalmente o oxigênio singlete (1O_2). Além disso, também apresenta propriedades de cicatrização e baixa fotossensibilidade cutânea. A eficácia da TFD mediada por AM já foi demonstrada anteriormente no contexto de doenças cancerígenas, em aplicações bem sucedidas no câncer de mama (HOSSEINZADEH; KHORSANDI; JAHANSHIRI, 2017), câncer de pulmão (OBSTOY et al., 2016) e no melanoma (MOHSENI et al., 2022). No contexto do SCC, com base em estudos *in vitro*, *in vivo* e pré-clínicos, o AM demonstrou ser um agente promissor para o tratamento (PIVETTA et al., 2022; SILVA et al., 2018; XU et al., 2021). No entanto, seu caráter hidrofílico e baixa permeação em relação a membranas biológicas ainda é um desafio quando se fala em abordagens pela via tópica.

A absorção cutânea de fármacos representa uma das etapas mais importantes na TFD, sendo este tratamento uma opção atrativa para o manejo do câncer de pele com prognóstico nocivo. No entanto, a pele tem uma estrutura morfológica muito complexa, dessa forma, a aplicação de sistemas nanoestruturados, como as nanopartículas poliméricas (NPs), têm sido amplamente investigados devido a vantagens como boa capacidade de transporte de fármacos, tamanho de partícula adequado para penetração em sistemas biológicos, biodegradabilidade, além do ajuste no perfil de liberação e direcionamento eficaz (GÜNGÖR; KAHRAMAN, 2021; ZHENG et al., 2020). No contexto físico-químico, a encapsulação do AM permite proteção contra degradação no ambiente biológico, manutenção das propriedades de geração de EROs, além de aumentar a sua permeabilidade cutânea ao contornar suas características hidrofílicas. Na penetração cutânea especificamente, as nanopartículas poliméricas podem se acumular nos folículos pilosos formando um reservatório de fármaco proporcionando liberação sustentada/controlada. Vários estudos já utilizaram essas plataformas poliméricas e relataram melhora da penetração de fármacos tanto nas camadas mais superficiais como nas mais profundas da pele (KAHRAMAN et al., 2018; YOTSUMOTO et al., 2018). Em adição, o AM já foi encapsulado com sucesso em estudos envolvendo matrizes poliméricas, principalmente para aplicações em terapia fotodinâmica (GUTIÉRREZ-VALENZUELA et al., 2018; QIN et al., 2011; TANG et al., 2008).

Ainda, para potencializar a entrega das nanopartículas por via tópica temos a utilização de métodos físicos. Os métodos físicos são ferramentas importantes para a entrega de fármacos

pois agem principalmente no EC, desestabilizando sua estrutura e permitindo maiores concentrações de drogas nas camadas mais internas da pele, além de melhorar a distribuição do fármaco, aumentando sua permeação. Dentre os métodos mais utilizados está a sonoforese, que consiste em uma técnica que utiliza o ultrassom, podendo ser de baixa ou alta frequência, em contato com a pele, sendo um pré-tratamento minimamente invasivo. A propagação de ondas ultrassônicas resulta em deslocamentos de tecido, aumentando o transporte convectivo dos fármacos (SUN et al., 2020; WONG, 2014). Na literatura podemos encontrar trabalhos que obtiveram sucesso na combinação do uso de nanocarreadores e sonoforese (KASETVATIN; RUJIVIPAT; TIYABOONCHAI, 2015; XIE et al., 2022), incluindo o estudo conduzido pelo nosso grupo de pesquisa (LIMA et al., 2023) que foi resultado desta dissertação e uniu o uso do azul de metileno para terapia fotodinâmica, aprimorando sua capacidade de penetração por meio da nanoencapsulação em conjunto com a sonoforese."

Diante do exposto, este estudo contempla a síntese, caracterização físico-química e avaliação *in vitro* de uma formulação inovadora de nanopartículas poliméricas para encapsulação de AM aliada a estratégia de aplicação de sonoforese visando aumentar a penetração do ativo nas camadas da pele, associando-se a TFD.

2 REFERÊNCIAL TEÓRICO

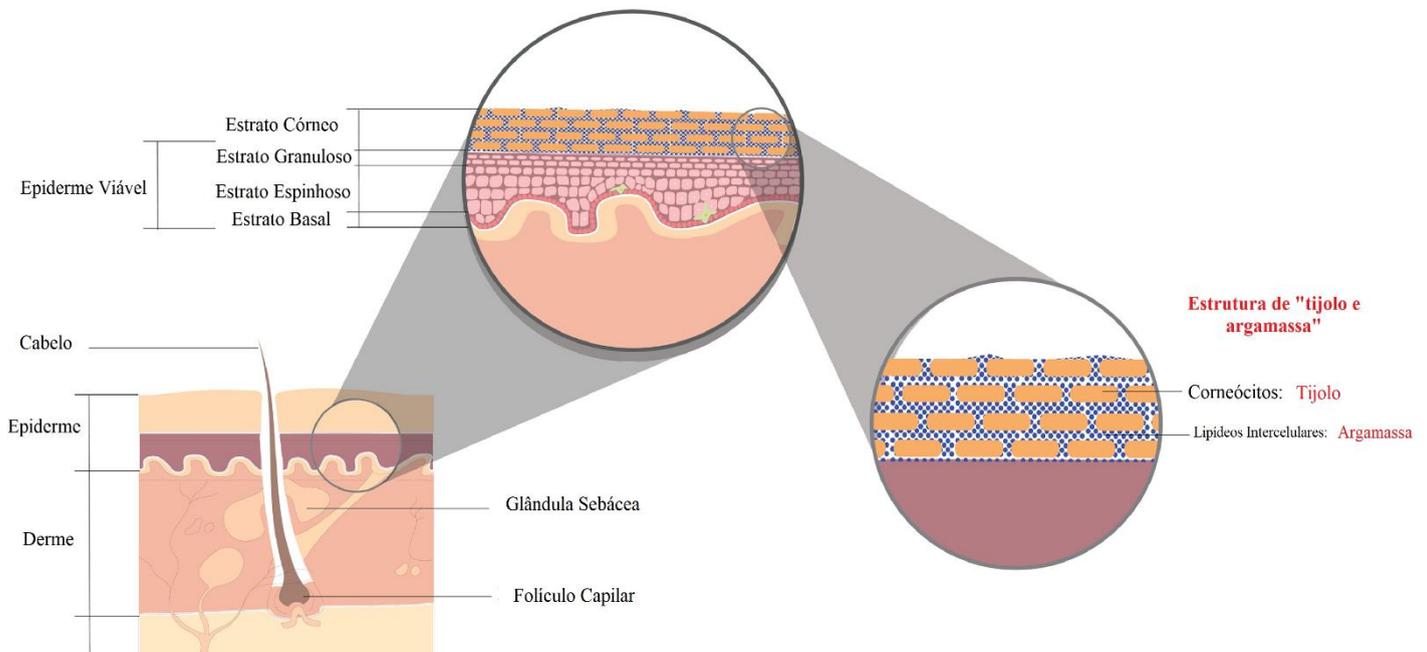
2.1 Pele: Estrutura e funções

A pele é o maior órgão do corpo humano e fornece a integridade e identidade do nosso organismo. Dentre suas várias funções, três se destacam: a função de barreira, manutenção da homeostase e função de reparo. Como primeira linha de defesa do corpo, se apresenta como barreira física, impedindo e neutralizando a penetração cutânea de substâncias estranhas e a radiação (por exemplo, luz UV), barreira biológica atuando contra micro-organismos como bactérias, fungos e vírus através de peptídeos antimicrobianos endógenos derivados dos queratinócitos, contribuindo para a rede imunológica inata e adaptativa. Além disso, também pode ser considerada uma barreira química compreendendo fatores que contribuem para o pH ácido da superfície e compostos que, juntos, compõem o "fator de hidratação natural" (NMF) (EYERICH et al., 2018; LAI-CHEONG; MCGRATH, 2021; SALA et al., 2018).

Com relação a regulação da temperatura corporal, a pele atua através de dois mecanismos: o fluxo sanguíneo e o suor. A regulação da perda de calor é obtida pela vasodilatação e vasoconstrição dos plexos vasculares cutâneos superficiais e profundos. A termorregulação também é conseguida através do suor, produzido pelas glândulas sudoríparas écrinas. Com isso, a pele evita a perda de água excessiva garantindo assim a homeostase. Além disso, as células imunes distribuídas por toda a pele contribuem ainda mais para o reparo da barreira e homeostase (MCKNIGHT; SHAH; HARGEST, 2022).

A pele é composta por duas camadas básicas, da mais externa para interna temos a epiderme e a derme, logo abaixo têm-se o tecido subcutâneo ou hipoderme, o tecido que faz a ponte da pele com tecidos mais profundos, como músculo e osso. A epiderme consiste em um epitélio escamoso estratificado, dividida em 4 camadas, sendo estas da mais profunda a mais superficial, o estrato basal, estrato espinhoso, estrato granuloso e estrato córneo (Figura 1). Esses estratos representam os estágios de maturação do principal tipo celular existente na epiderme, o queratinócito. Ele é responsável pela síntese de queratina, uma proteína fibrosa que fornece grande parte da natureza defensiva da epiderme devido à sua força e estabilidade (LOSQUADRO, 2017; VENUS; WATERMAN; MCNAB, 2011).

Figura 1. Estrutura da pele com a esquematização dos diferentes estratos da epiderme e estrato córneo.



Fonte: Adaptado de GÜNGÖR; KAHRAMAN, 2021

A camada mais interna, o estrato basal, é composto por células-tronco que se dividem para formar queratinócitos, os quais começam a migrar para as camadas mais superficiais. Geralmente, possui de 1 a 2 células de espessura. Além disso, possuem de 5 a 10% de outro tipo celular muito conhecido, o melanócito, responsável pela produção de melanina, um fator importante na determinação da cor da pele, em resposta à exposição à radiação UV. A migração dos queratinócitos em direção à superfície formam o estrato espinhoso. Nele, os queratinócitos formam ligações chamadas de desmossomos e apresentam grânulos lamelares preenchidos por lipídios em seu interior. À medida que os queratinócitos atravessam as camadas da epiderme, torna-se possível a visualização dos grânulos de querato-hialina, o que dá o nome característico da próxima camada, o estrato granuloso. Aqui, há um agrupamento dos filamentos de queratina em estruturas mais complexas. Além disso, há um processo de perdas de organelas das células, e descarregamento dos componentes lipídicos no espaço intercelular. Por fim, têm-se a camada mais externa da epiderme, o estrato córneo. As células que o compõem são denominadas de corneócitos, que nada mais são do que queratinócitos achatados e desnucleados cheios de queratina embebidas em uma matriz lipídica semelhante a "tijolo e argamassa". Essa estrutura justaposta confere a pele sua principal característica de barreira (EYERICH et al., 2018; LOSQUADRO, 2017; VENUS; WATERMAN; MCNAB, 2011).

A derme encontra-se entre a epiderme e o tecido subcutâneo. Sua espessura varia de acordo com a região corporal e é composta principalmente de tecido conjuntivo contendo numerosos vasos sanguíneos, linfáticos e nervos. Seu principal tipo celular é o fibroblasto, célula responsável pela produção de proteínas, principalmente colágeno e elastina. O colágeno tipo I confere a pele força tênsil e compreende 80% da derme, já o colágeno tipo III é responsável pela maleabilidade da pele e encontra-se em menor quantidade na derme, sendo esses os dois principais tipos. Essas características de força tênsil e maleabilidade evita ruptura da pele ao ser contraída ou esticada. As fibras de elastina concedem elasticidade a pele, ou seja, permitem com que ela volte a sua conformação inicial após sofrer um estresse. Com relação a subdivisão da derme têm-se a derme papilar, uma fina camada superficial consistindo em tecido conjuntivo frouxo contendo vasos sanguíneos, nervos e uma quantidade ínfima de colágeno, e a derme reticular, uma porção muito mais espessa com uma maior e mais densa quantidade de colágeno, além de vasos sanguíneos de maior calibre, fibroblastos, terminações nervosas e mastócitos (LOSQUADRO, 2017; MOHAMED; HARGEST, 2022; VENUS; WATERMAN; MCNAB, 2011).

Ainda, na derme temos estruturas com funções importantes para a manutenção da pele, são estes os anexos cutâneos, compostos por pelos, glândulas e nervos. As glândulas sudoríparas podem ser divididas em écrinas e apócrinas, ambas têm função de secretar suor, porém as glândulas écrinas respondem a estimulação colinérgica e secretam uma solução salina hipotônica a fim de resfriar a superfície da pele mantendo a homeostase térmica, já as glândulas apócrinas estão sobre controle adrenérgico e secretam um teor maior de óleo. No que concerne as glândulas sebáceas secretam um tipo de lipídio, chamado sebo, que protege contra o ressecamento do pelo, atuando como lubrificante, além de ter propriedades bactericidas. Normalmente, essas glândulas fazem parte da unidade pilosebácea, que consiste em sua junção com um folículo piloso, musculo eretor do pelo e terminações nervosas, no entanto, podem ser encontradas independentes dos folículos pilosos (LOSQUADRO, 2017; VARY, 2015).

2.2 Câncer de pele: Carcinoma de células escamosas (SCC)

O processo fisiopatológico do câncer de pele é causado por comportamentos erráticos das células presentes nesse meio. No corpo humano, o processo de divisão e morte celular ocorre de maneira constante, e é denominado de ciclo celular. O ciclo celular mitótico é um processo biológico crucial no qual uma célula se divide em duas células-filhas de forma altamente controlada. Todavia, por inúmeros fatores, o sistema de regulação pode falhar ocasionando uma divisão celular desregulada, gerando um número excessivo de células, culminando na formação de uma massa tecidual conhecida como tumor, ou ainda, ocasionar a morte celular em momentos inapropriados. O surgimento do câncer de pele advém de uma combinação de fatores de riscos genéticos e/ou ambientais. Sabe-se, por exemplo, que indivíduos com cabelos ruivos e sardas estão em maior risco de desenvolver câncer de pele. Além disso, pacientes com doenças pré-cancerosas de pele, traumas, cicatrizes e imunossuprimidos também apresentam maior propensão. Já do ponto de vista ambiental, pode-se citar a exposição a determinados produtos químicos. Contudo, a exposição à radiação ultravioleta é o principal agente iniciador ou promotor de carcinogênese (ZHANG et al., 2019, 2020b).

A principal fonte de radiação UV é através dos raios solares que possui uma mistura de três tipos de radiações (UVA, UVB, UVC), no qual cada componente pode exercer efeitos distintos sobre a pele. No geral, os raios UV induzem alterações funcionais nos queratinócitos e nas células imunes, podendo ativar vários oncogenes enquanto inativa genes supressores de tumor, resultando em danos ao DNA, e na sobrevivência e proliferação inadequadas das células que abrigam esses danos. Nesse âmbito, o UVB desempenha o papel de potente estimulador da inflamação e da formação de fotolesões de DNA enquanto o UVA age como impulsionador de danos oxidativos de radicais livres ao DNA (D'ORAZIO et al., 2013; KIM; HE, 2014). As estratégias de proteção contra a radiação UV podem ser físicas (limitação da exposição) e tópicas (filtros solares, quimioprevenção) e devem ser aplicadas com a maior antecedência possível, visto que os efeitos dessa exposição são cumulativos e só serão notados anos depois, sendo de grande importância para atenuar as chances de aparecimento de câncer de pele (PEREZ et al., 2022).

O câncer de pele se divide em dois grupos principais: câncer de pele melanoma, um tumor maligno que se origina nos melanócitos, possuindo o pior prognóstico dentre todos os tipos, sendo a forma mais fatal de câncer. Geralmente, tornam-se resistentes aos principais tratamentos e apresenta alta capacidade metastática; E o câncer de pele não melanoma, que se

origina dos queratinócitos. Embora esses apresentem uma maior incidência quando comparado ao melanoma, possuem um prognóstico positivo, com menores taxas de letalidade devido sua baixa tendência de metástase. Ainda, pode ser subclassificado em carcinoma basocelular e carcinoma de células escamosas (CHANDRA et al., 2023).

O panorama epidemiológico no Brasil demonstra que o câncer de pele não melanoma é o mais frequente no país, sendo o número de casos novos estimados, para cada ano do triênio de 2023 a 2025, de 220.490, 101.920 em homens e 118.570 em mulheres. As mulheres apresentam maior incidência em todas as regiões brasileiras, com maior risco estimado na região Sul de 164,79 por 100 mil habitantes. Já no caso do melanoma, o número de casos novos estimados é de 8.980. A região Sul, demonstra uma maior incidência quando comparada com as demais regiões, para ambos os sexos (figura 2).

Figura 2. Estimativas para o ano de 2023 das taxas brutas e ajustadas a de incidência por 100 mil habitantes e do número de casos novos de câncer, segundo sexo e localização primária*

LOCALIZAÇÃO PRIMÁRIA NEOPLASIA MALIGNA	ESTIMATIVA DOS CASOS NOVOS								
	Homens			Mulheres			Total		
	Casos	Taxa bruta	Taxa ajustada	Casos	Taxa bruta	Taxa ajustada	Casos	Taxa bruta	Taxa ajustada
Mama feminina	-	-	-	73.610	66,54	41,89	73.610	66,54	41,89
Próstata	71.730	67,86	55,49	-	-	-	71.730	67,86	55,49
Cólon e reto	21.970	20,78	12,43	23.660	21,41	11,06	45.630	21,10	11,43
Traqueia, brônquio e pulmão	18.020	17,06	12,73	14.540	13,15	9,26	32.560	15,06	10,52
Estômago	13.340	12,63	9,51	8.140	7,36	4,92	21.480	9,94	7,08
Colo do útero	-	-	-	17.010	15,38	13,25	17.010	15,38	13,25
Glândula tireoide	2.500	2,33	1,84	14.160	12,79	6,68	16.660	7,68	4,83
Cavidade oral	10.900	10,30	7,64	4.200	3,83	2,61	15.100	6,99	4,95
Linfoma não Hodgkin	6.420	6,08	4,55	5.620	5,08	3,00	12.040	5,57	3,79
Leucemias	6.250	5,90	4,75	5.290	4,78	3,95	11.540	5,33	4,43
Sistema nervoso central	6.110	5,80	4,56	5.380	4,85	3,80	11.490	5,31	4,33
Bexiga	7.870	7,45	3,96	3.500	3,14	1,58	11.370	5,25	2,75
Esôfago	8.200	7,76	5,46	2.790	2,49	1,43	10.990	5,07	3,38
Pâncreas	5.290	5,00	3,74	5.690	5,15	3,22	10.980	5,07	3,31
Fígado	6.390	6,06	5,18	4.310	3,89	3,14	10.700	4,95	4,29
Pele melanoma	4.640	4,37	2,24	4.340	3,90	1,56	8.980	4,13	1,88
Corpo do útero	-	-	-	7.840	7,08	4,13	7.840	7,08	4,13
Laringe	6.570	6,21	5,07	1.220	1,09	0,72	7.790	3,59	2,68
Ovário	-	-	-	7.310	6,62	5,01	7.310	6,62	5,01
Linfoma de Hodgkin	1.500	1,40	0,84	1.580	1,41	0,78	3.080	1,41	0,75
Outras localizações	41.730	39,49	26,17	33.970	30,69	19,70	75.700	34,99	21,96
Todas as neoplasias, exceto pele não melanoma	239.430	226,56	185,61	244.160	220,75	154,08	483.590	223,59	169,63
Pele não melanoma	101.920	96,44	-	118.570	107,21	-	220.490	101,95	-
Todas as neoplasias	341.350	323,00	-	362.730	327,96	-	704.080	325,53	-

*População-padrão mundial (1960). / *Números arredondados para múltiplos de 10.

Fonte: Adaptado de INCA, 2023.

Especificamente em relação ao estado do Ceará, o câncer de pele não melanoma atingiu a taxa de mortalidade de 1,39 por 100 mil habitantes.

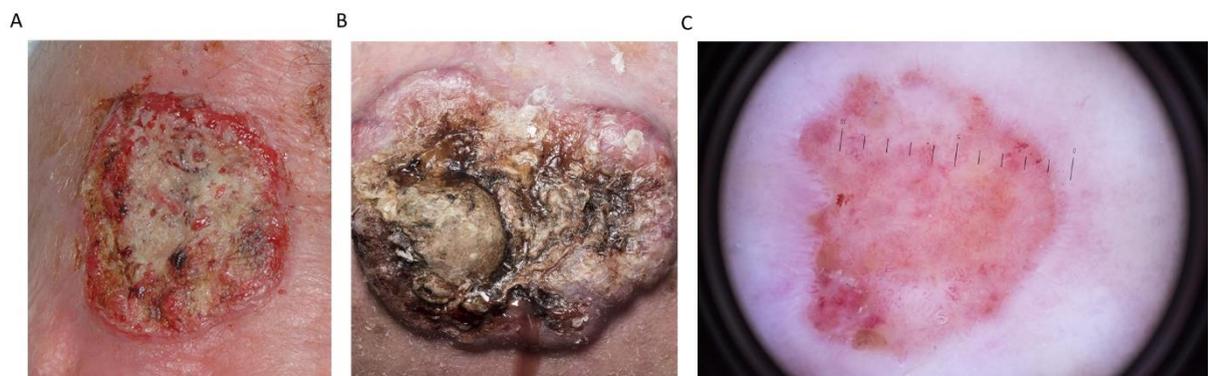
O carcinoma de células escamosas (SCC, sigla do inglês *squamous cell carcinoma*) consiste em um conjunto de diferentes tipos de tumores que se formam nas células escamosas presentes na superfície da pele ou nos revestimentos de órgãos e tecidos, sendo a região da cabeça e pescoço a mais afetada. Representando aproximadamente 20% de todas as neoplasias malignas de pele, o aumento da sua incidência está relacionado a processos inflamatórios ou de cicatrização, principalmente aqueles associados a exposição à radiação UV, que podem induzir lesões pré-cancerosas como a ceratose actínica. A taxa de evolução dessa lesão para um carcinoma cutâneo de células escamosas ainda é discutida em literatura. Logo, a cronologia de acontecimento pode ser inicialmente descrita por clones de queratinócitos mutados dentro da epiderme que dão origem a uma área focal de perda de arquitetura normal e atipia celular (ceratose actínica). Sendo a lesão precursora mais comum, as ceratoses são lesões ásperas, com bordas indefinidas e descamativas. Depois, a proliferação de queratinócitos atípicos origina neoplasias intraepiteliais ou *in situ*, geralmente se apresentando como doença de Bowen. Por fim, o acúmulo de novas mutações celulares levará ao crescimento invasivo e, mais raramente, a metástases, caracterizando a carcinogênese. Além dessa, outras injúrias como cicatrizes de queimaduras e feridas crônicas podem evoluir para SCC (CRAYTHORNE; AL-NIAMI, 2017; CULLEN et al., 2020; STRATIGOS et al., 2015).

Do ponto de vista genético, o mecanismo de instabilidade genômica nos queratinócitos provavelmente resulta da inativação da p53 induzida pela radiação UV. Esse gene é bastante estudado e alvo de mutações em vários tipos de cânceres. Sua função é a supressão tumoral, ou seja, atua no ciclo celular realizando reparos no DNA defeituoso e indução a apoptose em casos em que o reparo não foi bem-sucedido. Mutações no gene supressor de tumor p53 são as anormalidades genéticas mais comuns encontradas em SCC. Além disso, outras vias de sinalização como Ras e inibidor da quinase dependente de ciclina 2A (CDKN2A) têm sido implicadas na formação do SCC. Por fim, estudos relatam que há uma superexpressão do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) e isso está associado a mau prognóstico e malignidade (PETRILLI et al., 2018; STRATIGOS et al., 2015; WALKER; HARDWICKE, 2022).

Clinicamente, o SCC pode ter apresentações variadas com formas de pápulas crostosas, nódulos ulcerados ou formas verrucosas (Figura 3a e b). A presença de ulceração e evidência de sangramento recente também é relatado. Os achados dermatológicos incluem pequenos vasos sanguíneos pontilhados e glomerulares (Figura 3c). O diagnóstico é estabelecido

histologicamente, onde pode ser realizada uma biópsia incisional ou excisional, que revela filamentos de queratinócitos atípicos originando-se na epiderme e infiltrando-se na derme. Para auxiliar no prognóstico, tratamento e cura do SCC, alguns detalhes da lesão e da histopatologia devem ser fornecidos, a exemplo, a profundidade do tumor, grau de diferenciação (bem diferenciado, moderadamente diferenciado, grau pouco diferenciado ou indiferenciado), subtipo histológico, presença ou não de invasão perineural, assim como de células tumorais nas bordas da ferida (CRAYTHORNE; AL-NIAMI, 2017; STRATIGOS et al., 2015; WALKER; HARDWICKE, 2022).

Figura 3. Carcinoma de células escamosas no dorso da mão (a), grande lesão ceratótica com ulceração e sangramento compatível com SCC (b), padrão vascular típico de SCC na dermatoscopia (c).



Fonte: Adaptado de WALKER; HARDWICKE, 2022 e CRAYTHORNE; AL-NIAMI, 2017.

O tratamento de primeira linha para a maioria dos casos é a excisão cirúrgica, procedimento realizado para a remoção do tumor e de pedaços de tecidos saudáveis ligados à sua margem. Esse procedimento é realizado quando o tumor é de baixa extensão e foram descobertos em estágios iniciais da doença. As margens cirúrgicas mínimas recomendadas pelas Diretrizes da Associação Britânica de Dermatologistas são 4 mm para lesão de baixo risco, 6 mm para alto risco e 10 mm para um tumor de risco muito alto. Já pacientes que possuem tumores que ocupam grandes áreas, a cirurgia micrográfica de Mohs é mais indicada. Nela, o cirurgião dermatológico retira camada por camada de tecido do tumor e avalia microscopicamente a presença ou ausência de “tumor residual” em suas margens por meio de cortes congelados. Se o tumor permanecer em qualquer margem, outra camada de tecido é removida nesse local específico e novamente avaliada. Esse processo é repetido até todo o

tumor ser removido, chegando a 98% de precisão (TELLO; ARRON, 2018; WALKER; HARDWICKE, 2022; SBD, 2023).

Mesmo com a alta taxa de sucesso nesses tratamentos citados, alguns pacientes possuem contraindicações. Situações como múltiplas lesões, tumores de grande extensão em áreas do corpo problemáticas causando cicatrizes indesejáveis e metástase requerem uma maior atenção. O SCC se origina na epiderme, no entanto, estudos apontam um potencial metastático de 3% em lesões sem nenhum agravante, e até 30% em lesões próximas ao lábio e orelha, ou onde o tamanho e diâmetro do tumor estejam acima de 2 cm e profundidade acima de 4 mm. Além disso, pacientes imunodeprimidos também possuem um prognóstico elevado de metastatização (CRAYTHORNE; AL-NIAMI, 2017). Com isso, nota-se a importância da pesquisa e desenvolvimento de novas terapias alvo-específicas para melhorar a qualidade de vida dos pacientes, além de melhorar seu prognóstico, minimizando os problemas das principais linhas de tratamento.

2.3 Terapia fotodinâmica

A terapia fotodinâmica (TFD) tem sido empregada há centenas de anos para o tratamento de diversas doenças. A morte do protozoário *Paramecium spp.* pela reação com a radiação infravermelha despertou o interesse em analisar e pesquisar mais a fundo esse tipo de interação. A TFD é utilizada por áreas como a medicina, medicina veterinária e a odontologia para tratamento de infecções microbianas e atualmente, seu uso para o tratamento de doenças de pele, como o câncer, está em ascensão. No âmbito do câncer de pele não melanoma, a TFD pode ser considerada uma abordagem alternativa para tratar e limitar cânceres malignos devido à sua capacidade terapêutica de longo prazo em comparação com os tratamentos citados anteriormente. Algumas vantagens específicas são relatadas, a exemplo, efeitos colaterais reduzidos devido ao seu efeito citotóxico seletivo sobre as células tumorais, menos invasivo, mais conveniente para o paciente e pode ser combinado com outro tratamento, por exemplo, pós-cirurgia (ADNANE; EL-ZAYAT; FAHMY, 2022; ONISZCZUK et al., 2016).

Especificamente em SCC, a TFD exibe bons resultados principalmente em relatos de casos de SCC limitado à derme papilar. Além disso, apresenta baixa taxa de reincidência, podendo ser utilizado como um tratamento para lesões de ceratose actínica, prevenindo sua evolução para SCC. A TFD é baseada em três elementos principais, (1) um agente fotossensibilizante (PS); (2) fonte de luz; e (3) oxigênio tecidual. Inicialmente, o fotossensibilizante é aplicado, geralmente por via tópica no local lesado, em quantidade

previamente validada, seguindo-se da exposição a uma fonte de luz com comprimento de onda específico, por um período fixo de tempo, o que resulta na produção de espécies reativas de oxigênio que induz a apoptose das células tumorais, além de aumentar respostas imunes antitumorais (KEYAL et al., 2019).

O mecanismo detalhado da TFD possui dois tipos de reações principais. Inicialmente, ambos os mecanismos são semelhantes, em que o FS irradiado por um comprimento de onda adequado transita do estado de energia básica singlete (S^0) para o estado singlete excitado (S^1), através da absorção dos fótons. Com isso, uma fração dessa energia é irradiada sob a forma de fluorescência, ao passo que a parcela restante propulsiona o fotossensibilizador para o estado de excitação triplete (T^1) - a conformação molecular terapêutica apropriada do composto. A partir de então têm-se dois caminhos. A reação tipo I, que ocorre quando há uma baixa concentração de oxigênio tecidual, observa-se uma interação entre o estado triplete do FS e o tecido alvo, levando à formação de novos radicais. Estes radicais, por sua vez, interagem com o oxigênio presente, transformando-o em diferentes tipos de espécies reativas de oxigênio (EROs). Por outro lado, na reação tipo II, que ocorre quando a concentração de oxigênio no tecido é alta, o estado triplete direciona sua energia diretamente para o oxigênio, resultando na formação exclusiva de oxigênio singlete (1O_2). Presume-se que a predominância da reação do tipo II seja mais comum no organismo humano, devido ao teor de oxigênio presente. No entanto, a proporção entre ambos os mecanismos se altera em função de variáveis como a concentração de oxigênio, o pH e a estrutura do fotossensibilizador (KWIATKOWSKI et al., 2018; ONISZCZUK et al., 2016).

No contexto biológico, as EROs possuem três modos principais para a destruição dos tumores: dano celular direto, desligamento vascular e estimulação da resposta imunológica. Danos diretos às células tumorais podem resultar em morte celular por vias programadas (apoptose) e não programadas (necrose), podendo ambos os processos acontecerem simultaneamente. No entanto, sob condições de intensidade luminosa reduzida, a indução da morte celular apoptótica parece a via dominante, o que se torna desejável pois a necrose promove um dano rápido às membranas, ocasionando uma ruptura exagerada do conteúdo intracelular que pode extravasar gerando um ambiente “sujo” repleto de organelas, levando à liberação de citocinas e enzimas lisossômicas, causando danos às células próximas (ALLISON; MOGHISSI, 2013; DOBSON; DE QUEIROZ; GOLDING, 2018).

Além disso, a TFD desencadeia a ativação de vias de coagulação, agregação plaquetária e, conseqüentemente, a obstrução dos vasos por trombos. A oclusão vascular ocasiona hipóxia no tecido neoplásico, culminando na morte celular. Por fim, essa terapêutica também está

intrinsecamente vinculada à resposta imunológica sistêmica anticâncer inerente ao organismo. A aniquilação direta das estruturas no tecido tumoral estimula uma resposta inflamatória intensa, caracterizada pela infiltração de leucócitos nas áreas neoplásicas. As lesões fotodinâmicas nas membranas celulares desencadeiam uma cascata de eventos que envolve a ativação de fosfolipases, seguida pela ativação das ciclo-oxigenases, provocando uma propagação significativa de mediadores inflamatórios. Além disso, as lesões induzidas pela fototerapia nas paredes dos vasos sanguíneos mobilizam neutrófilos e macrófagos. A degranulação dos neutrófilos, juntamente com a liberação de enzimas lisossômicas e fatores quimiotáticos, amplifica a dinâmica de destruição tecidual, intensificando o processo iniciado pela irradiação (ALLISON; MOGHISSI, 2013; DOBSON; DE QUEIROZ; GOLDING, 2018).

A literatura tem obtido sucesso ao empregar a TFD como abordagem terapêutica principal no combate ao SCC, tanto *in vitro* e *in vivo* como em estudos clínicos. Liu, Cao, Wei (2023) ao associarem luz LED vermelha à hipocrelina B relataram uma diminuição na atividade mitocondrial, aumento da produção de espécies reativas de oxigênio em conjunto com um aumento da apoptose na linhagem A431 (carcinoma epidermóide cutâneo) (LIU; CAO; WEI, 2023). Ainda, investigando a eficácia antitumoral da TFD *in vivo*, Tao et al., 2023 demonstrou a diminuição do volume e peso tumoral em um modelo de SCC implantado em camundongos SKH-1, sendo quase todos os tumores eliminados no 21º dia (TAO et al., 2023). Já analisando os aspectos clínicos, um estudo evidenciou a eficácia da TFD com ácido 5-aminolevulínico (ALA-TFD) como uma abordagem terapêutica alternativa para indivíduos com carcinoma epidermoide cutâneo que não apresentam condições favoráveis à intervenção cirúrgica, no qual dos 29 pacientes testados 5 pacientes obtiveram resposta completa e não apresentaram recidiva até 18 meses pós-tratamento (ZHANG et al., 2020).

Como discutido, a TFD possui diversos mecanismos químicos e biológicos, assim como diversas vantagens em seu uso para o SCC. No entanto, esse tratamento possui algumas limitações a serem contornadas e as variáveis no protocolo terapêutico devem ser ajustadas cuidadosamente. A fonte de luz é um dos parâmetros mais simples de serem adequados. Sua escolha deve ser realizada unindo o comprimento de onda necessário para a ativação do FS com o mais adequado para penetrabilidade no corpo humano. Devido às diferenças estruturais entre os FS o comprimento de onda ideal pode variar. Quando a luz é irradiada nos tecidos ela pode ser refletida, espalhada ou absorvida e a profundidade de penetração da luz nos tecidos vivos pode depender de vários fatores, como localização, dimensão e acessibilidade das lesões, bem como as particularidades dos tecidos circundantes. As principais fontes utilizadas são os lasers de diodo e diodos emissores de luz (LEDs), sendo esses últimos compactos, leves e

requerem significativamente menos energia do que os lasers. Já a faixa terapêutica do comprimento de onda se encontra entre de 600-800 nm. Historicamente, a luz na faixa do espectro vermelho tem sido preferencialmente adotada, devido à disponibilidade de lasers operando nessa região. Além disso, em comprimentos de onda superiores a 600 nm, a luz vermelha é capaz de penetrar o tecido em profundidades de aproximadamente 5 mm ou até mais, o que viabiliza o tratamento de tumores de maior volume (ALLISON; MOGHISSI, 2013; DOBSON; DE QUEIROZ; GOLDING, 2018).

No entanto, o ponto mais crítico da TFD é a escolha do fotossensibilizador e seu modo de administração. A via tópica parece ser o principal meio de administração dessas substâncias e será discutida posteriormente. Mesmo com algumas substâncias sendo aprovadas no mercado e comumente utilizadas, a busca por melhorias em suas características continuam. Algumas características e condições descrevem o fotossensibilizador ideal, como o alto grau de pureza química, estabilidade à temperatura ambiente, efeito fotossensível apenas na presença de um comprimento de onda específico, citotoxicidade mínima no escuro, fácil solubilidade nos tecidos do corpo e uma produção de EROs satisfatória. Além das características físico-químicas citadas o comportamento nos fluídos biológicos também é investigado. A substância em questão deve possuir alta seletividade para tecidos neoplásicos, ou seja, ser gradualmente retirado das regiões afetadas, permanecendo ativo por um período de várias horas, ao mesmo tempo em que é prontamente eliminado dos tecidos saudáveis. Essa abordagem visa reduzir os efeitos colaterais fototóxicos da terapia de forma eficaz (ALLISON; MOGHISSI, 2013; DOBSON; DE QUEIROZ; GOLDING, 2018; KWIATKOWSKI et al., 2018).

Os fotossensibilizadores são divididos em primeira, segunda e terceira geração. O Photofrin® (Axcan Pharma, Inc.) foi o primeiro fotossensibilizador aprovado para uso clínico no tratamento de câncer de bexiga e compõe a geração inicial. Já o Ácido 5-aminolevulínico (ALA) é um pró-fotossensibilizador natural e precursor para a biossíntese da molécula de heme, e atualmente é um dos fotossensibilizadores mais estudados, sendo utilizado no tratamento de linfoma cutâneo de células T (COORS; VON DEN DRIESCH, 2004), carcinoma basocelular (KESSELS et al., 2016) e no SCC (QIAO et al., 2016). Na prática nota-se que a grande maioria dessas substâncias apresentam desvantagens e tendem a ser hidrofóbicas agregando-se e diminuindo, em alguns casos até perdendo, sua capacidade fotofísica. Logo, as desvantagens dos fotossensibilizadores de primeira e segunda geração forçaram a necessidade de investigação de novos compostos, surgindo assim os de terceira geração, focados em síntese de substâncias com maior afinidade ao tecido tumoral (DOBSON; DE QUEIROZ; GOLDING, 2018; KWIATKOWSKI et al., 2018).

2.4 Azul de metileno: Fotossensibilizador para tratamento do SCC

O azul de metileno (Figura 4a) pertence à categoria dos fotossensibilizadores do tipo fenotiazina, caracterizada por sua estrutura composta por dois anéis benzênicos interligados a um átomo de nitrogênio e um átomo de enxofre. Uma de suas propriedades notáveis é sua absorção intensa na faixa de comprimento de onda entre 630 e 680 nanômetros, o que desencadeia a geração de oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$). Historicamente, é utilizado como corante histológico devido a sua afinidade pelo DNA. Na clínica, é empregado no tratamento de metemoglobinemia e neurotoxicidade induzida por ifosfamida, além disso, nos últimos anos houve um aumento do interesse no AM como agente antimalárico e como potencial tratamento de doenças neurodegenerativas como a doença de Alzheimer (SCHIRMER et al., 2011; TARDIVO et al., 2005).

Na terapia fotodinâmica, o AM tem se destacado como fotossensibilizador principalmente pelo seu alto rendimento quântico de $^1\text{O}_2$, aliada a baixa toxicidade, efeito analgésico, antibacteriano, antitumoral e promotor de cicatrização de feridas. Em contraste com fotossensibilizadores habitualmente empregados, tais como o ALA, apresenta as seguintes vantagens: baixo preço; potencialmente menos danos à pele, menos dor e efeitos colaterais; fácil aplicação clínica. Na TFD, é predominantemente empregado de duas maneiras distintas: tratamento do câncer e tratamento antimicrobiano local. Essas duas características se complementam de maneira vantajosa quando consideramos a terapia do SCC. Nesse contexto, além da indução da morte das células cancerígenas, também se manifesta uma ação antimicrobiana, a qual se mostra de extrema importância, especialmente em relação a feridas abertas, pois evita a evolução de possíveis infecções no local afetado. Isso, por sua vez, contribui significativamente para melhorar o prognóstico da condição, evitando complicações adicionais (SHEN et al., 2020; WAINWRIGHT; CROSSLEY, 2002).

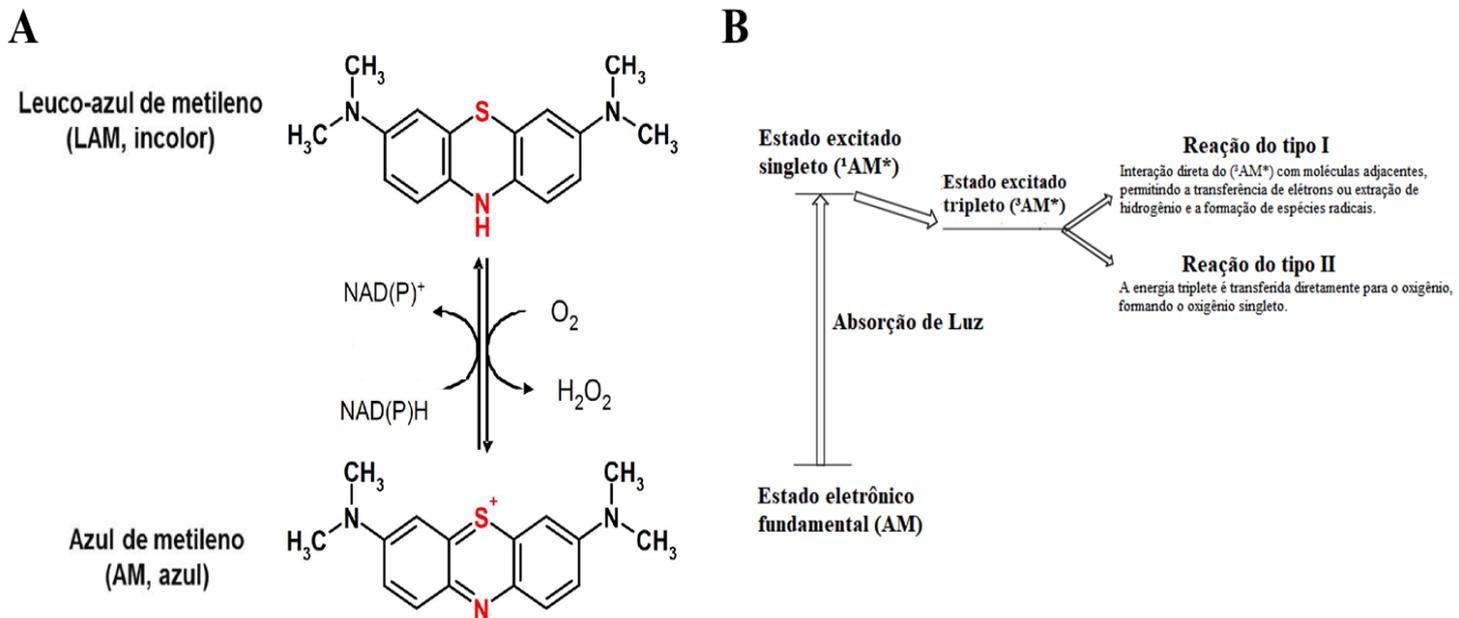
As características fotofísicas e fotoquímicas do AM desempenham um papel fundamental na compreensão de todo o processo envolvido em sua utilização como fotossensibilizador. Como observadas no mecanismo de ação da TFD, o azul de metileno também promove reações do tipo I que envolve interação direta do estado excitado tripleto do azul de metileno com moléculas adjacentes, permitindo a transferência de elétrons ou extração de hidrogênio e a formação de espécies radicais. Entretanto, os processos do tipo II são geralmente mais aceitos como a principal via de dano celular promovida pelo AM, onde há uma formação mais eficaz de oxigênio singleto (Figura 4b). O rendimento quântico do AM pode ser

afetado pela existência de monômeros ou dímeros, em que na condição de grande concentração de dímeros, o tipo II é deslocado para a reação do tipo I, praticamente abolindo a geração de $^1\text{O}_2$. Sabe-se que em solução homogênea, onde não há dímeros (etanol ou soluções aquosas diluídas), AM produz tripletos com alto rendimento quântico. No entanto, a eficiência de $^1\text{O}_2$ nessas soluções são diretamente afetada pelo pH. Este é um fato a ser considerado no tratamento de tecidos tumorais que podem apresentar pH inferior ao neutro devido ao metabolismo anaeróbico (TARDIVO et al., 2005; WAINWRIGHT; CROSSLEY, 2002).

Com base em estudos *in vitro*, *in vivo* e pré-clínicos, o AM provou ser um agente promissor para uso para o tratamento do SCC. Le et al., 2022 utilizou a terapia fotodinâmica com azul de metileno (TFD-AM) em células da linhagem de carcinoma espinocelular da língua humana (CA-9-22) e obteve uma diminuição significativa do gene MMP-9, que expressa as metaloproteinases da matriz (MMPs) relacionadas ao carcinoma oral, o que significa um melhor prognóstico da doença. Já Silva et al., 2018, em estudos com modelo murino de carcinoma espinocelular, demonstrou que a TFD-AM reduziu o tamanho do tumor e a proliferação celular assim como elevou os níveis de citocinas, que estão associados à melhora do prognóstico no tratamento do câncer (LE et al., 2022; SILVA et al., 2018).

Mesmo com diversos estudos corroborando seu uso como fotossensibilizador, a entrega do AM como fotossensibilizador apresenta alguns desafios. Considerando que sua aplicação tópica emerge como um passo crucial na TFD é primordial assegurar a preservação de suas propriedades físico-químicas, bem como uma farmacocinética favorável. O AM é uma molécula pequena e de caráter hidrofílico, o que resulta em uma má absorção quando aplicada nos tecidos cutâneos. Além disso, o AM sofre um processo de redução em ambiente fisiológico, por nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) ou tiorredoxina resultando no leuco-azul de metileno, um composto incolor sem carga e sem nenhuma atividade fotodinâmica. Esse processo afeta negativamente seu rendimento quântico (Figura 4a) (SCHIRMER et al., 2011; SEONG; KIM, 2015). Com base nessas considerações, torna-se imprescindível o desenvolvimento de novas estratégias de entrega de fármacos, bem como a incorporação de novas ferramentas de penetração cutânea. Essas medidas visam aprimorar o desempenho do azul de metileno na TFD.

Figura 4. O processo de reações de redução e oxidação envolvendo o azul de metileno (AM). O AM é reduzido de maneira espontânea por coenzimas como o NAD(P)H, resultando na formação do leuco-azul de metileno (LAM), uma substância incolor e pode ser reoxidado por oxigênio molecular (O_2), produzindo peróxido de hidrogênio (H_2O_2) neste ciclo dinâmico (a) e sua ação fotodinâmica através da absorção de luz (b).



Fonte: Adaptado de SCHIRMER et al., 2011; WAINWRIGHT; CROSSLEY, 2002

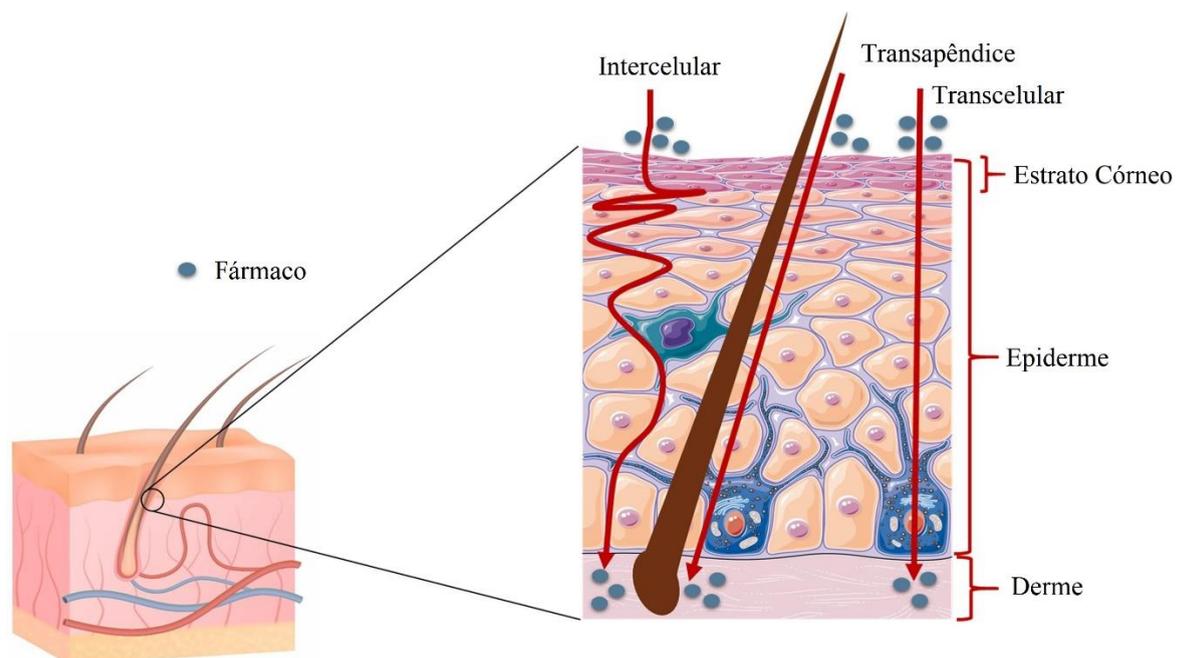
2.5 Via tópica: mecanismos gerais de absorção cutânea

A pele tem se mostrado uma via alternativa promissora para a administração de medicamentos, devido a algumas vantagens que apresenta em comparação com vias convencionais, como a aplicação de maneira não invasiva gerando uma maior aderência ao tratamento pelo paciente. Ademais, essa abordagem tem o potencial de elevar a biodisponibilidade dos medicamentos, visto que, evitamos o metabolismo de primeira passagem ou a degradação no sistema gastrointestinal, o que contribui significativamente para a diminuição dos efeitos colaterais. No câncer de pele, o tratamento tópico pode ser mais apropriado em casos em que a cirurgia não é indicada devido a comorbidades do paciente, se o tamanho da área afetada for extenso, houver multiplicidade das lesões e até mesmo a possibilidade de formação de grandes cicatrizes pós-cirúrgicas. Além disso, proporciona níveis mais elevados de fármacos no local do tumor e pode resultar em menor toxicidade global do

que os agentes sistêmicos. Na TFD, ao empregar o fotossensibilizador por aplicação tópica, é possível combinar os benefícios inerentes a essa forma de administração com as vantagens próprias da TFD, já discutidas anteriormente (CULLEN et al., 2020; MD et al., 2017).

Para alcançarmos uma melhor compreensão sobre como uma molécula penetra na pele e atinge seu alvo específico, é necessário examinar detalhadamente as características das barreiras cutâneas que ela deve transpor, bem como considerar quais rotas de absorção são mais prováveis de ocorrer. Dentre as camadas da epiderme anteriormente mencionadas, é importante destacar que o estrato córneo (EC) desempenha o papel primordial como barreira principal para a penetração de fármacos. A estrutura do EC pode ser comparada a uma "parede de tijolos e argamassa". Os "tijolos" consistem em células corneócitas mortas preenchidas com queratina e estão incorporados na "argamassa", que é composta por uma mistura complexa de lipídeos. Existem diferentes rotas pelas quais uma molécula pode atravessar o EC, estas são as vias transapêndice, transcelular e intercelular (ELMOWAFY, 2021; LANE, 2013).

Figura 5. Representação esquemática da pele, destacando as principais vias de permeação, incluindo as vias intercelular, transcelular e transapêndice.



Fonte: Adaptado de ROMANHOLE et al., 2020

Na via transapêndice, as moléculas de fármacos se difundem através das glândulas sudoríparas e folículos pilosos. Entre esses, os folículos pilosos são considerados os apêndices

mais relevantes em termos de área de superfície para a absorção de substâncias. No entanto, esta via não é considerada uma rota significativa para a permeação de fármacos, uma vez que essas estruturas compreendem apenas uma pequena fração, cerca de 0,1%, da superfície total da pele humana. Ainda assim, a liberação de fármacos por essa via pode adquirir importância quando se trata de substâncias de difusão lenta e compostos com um peso molecular muito elevado, como as nanopartículas. A via transcelular resulta na passagem do fármaco através dos corneócitos, onde acontece a partição sucessiva entre as porções hidrofílicas (transporte intracelular) e lipofílicas na camada córnea. Fármacos com características hidrofílicas geralmente utilizam essa rota como a preferencial, no entanto, é importante observar que as bicamadas lipídicas são consideradas o fator crítico determinante para a eficácia desse processo de penetração. Sendo assim, é essencial que as moléculas exibam solubilidade lipídica/aquosa equilibrada (BOLZINGER et al., 2012; ELMOWAFY, 2021; LANE, 2013).

A via intercelular, no entanto, parece ser o modelo predominante. Essa via envolve moléculas de fármacos que podem passar por espaços entre as células do estrato córneo (conhecidos como via tortuosa). Como essa rota ocorre através da matriz lipídica, é fundamental que a substância possua uma solubilidade lipídica acentuada. Além disso, a questão da largura do espaço intercelular ainda é incerta, com relatos variando de 19 nm a 75 nm, o que pode dificultar a penetração de macromolécula (ELMOWAFY, 2021).

Após aplicação de uma formulação tópica, inicialmente, o fármaco precisa ser liberado do seu veículo de transporte, seguido pelo processo de partição na camada córnea. Em seguida, as moléculas começarão a se difundir através do EC, impulsionadas por um gradiente de concentração. Posteriormente, ocorrerá um novo processo de partição na epiderme viável, seguido pela difusão através desta camada em direção à derme. Finalmente, o fármaco será removido da pele pelo sistema vascular e pelos vasos linfáticos presentes na derme. Essa etapa final se refere à via transdérmica, na qual o fármaco alcança a corrente sanguínea. Em geral, as aplicações tópicam visam concentrar o fármaco na epiderme viável, onde ele exerce seu efeito terapêutico direto para tratar a doença alvo (LANE, 2013).

Alguns fatores podem influenciar a penetração cutânea. Para uma abordagem mais didática podemos segmentá-los em três áreas principais: 1) Propriedades físico-químicas do fármaco, 2) Características da formulação, 3) Fisiologia e patologia da pele (JAWALE et al., 2017).

Com relação as características intrínsecas do fármaco, sabe-se que moléculas maiores que 500 Dalton possuem dificuldade em ultrapassar a barreira cutânea. Logo, quanto maior o peso molecular menor é a absorção. O coeficiente de partição também é fundamental pois, para

ser absorvido, o medicamento deve ter alguma solubilidade em lipídios, dada a natureza lipídica das bicamadas, mas também alguma hidrofiliçidade para se difundir no ambiente aquoso da pele. Além disso, a maioria dos fármacos é de natureza ácida ou básica, assim, o pH desempenha um papel crítico na determinação da profundidade em que um medicamento penetra na pele, sendo as espécies não ionizadas absorvidas de maneira mais eficiente (BOLZINGER et al., 2012; JAWALE et al., 2017)

Na forma farmacêutica, o fármaco deve ter afinidade suficiente pelos componentes da formulação de maneira a permanecer estável, mas também deve se libertar para o meio cutâneo com uma taxa de liberação satisfatória. Em conjunto, algumas formulações podem conter promotores de penetração, para alterar a integridade da pele temporariamente, facilitando a passagem do fármaco (JAWALE et al., 2017).

Outro fator importante é condição fisiológica e patológica da pele. A hidratação da pele leva ao inchaço do estrato córneo, tornando-a mais flexível. Isso aumenta a solubilidade da substância que está sendo absorvida e sua capacidade de se transferir do veículo para o tecido. A elevação da temperatura também resulta em um aumento na absorção. Isso ocorre devido à maior fluidez dos lipídios presentes e a vasodilatação dos vasos sanguíneos. Além disso, a pele lesada apresenta uma estrutura mais permeável em relação a pele saudável, com poros de tamanhos modificados e junções intercelulares mais “frouxas”. Outros fatores, embora menos evidentes, ainda desempenham um papel significativo e devem ser mencionados, incluindo a capacidade metabólica da própria pele e o nível de fluxo sanguíneo na área local (JAWALE et al., 2017).

Diante da exposição de todos os desafios para um tratamento eficiente por via tópica, faz-se necessário o desenvolvimento de novas estratégias para aprimorar a entrega de fármacos por essa via. Diversas técnicas para melhorar a permeação de formulações farmacêuticas estão disponíveis na literatura. Isso abrange métodos físicos (ultrassom, luz, iontoforese e microagulhas), químicos (intensificadores de permeação) e sistemas de liberação inovadores, como os nanocarreadores (CHACKO et al., 2020).

2.6 Nanopartículas poliméricas como adjuvante na aplicação tópica

Como mencionado anteriormente, a terapia fotodinâmica tem se destacado como uma terapia alternativa amplamente estudada para o tratamento do câncer. No entanto, a entrega tópica eficaz do fotossensibilizador é um passo crítico para o sucesso dessa abordagem. Além disso, a barreira representada pelo estrato córneo da pele é um desafio adicional a ser superado.

Nesse contexto, a nanotecnologia emerge como uma estratégia promissora para aumentar a eficácia da TFD no tratamento do câncer. A nanotecnologia refere-se à utilização de materiais que são precisamente controlados em uma escala nanométrica. É considerada uma ciência interdisciplinar que abrange diversos campos, incluindo engenharia, química, física, biologia, ciências médicas e farmacêuticas. Quando utilizada para fins de saúde e medicina é nomeada de nanomedicina (NANCE, 2019).

Nanocarreadores como sistemas de liberação de fármacos possuem propriedades únicas e têm sido utilizados para diversas aplicações, tais como diagnóstico e teranóstico. Além disso, apresentam inúmeras vantagens como a melhora do direcionamento dos medicamentos, proteção dos fármacos da degradação, liberação do princípio ativo de maneira sustentada em locais ou células específicas em resposta a sinais específicos e, assim, melhorar a eficácia terapêutica enquanto minimiza os efeitos colaterais (ZHENG et al., 2020).

Nas doenças dermatológicas, podem ser empregados no tratamento de psoríase (DOPPALAPUDI et al., 2017), vitiligo (DOPPALAPUDI; MAHIRA; KHAN, 2017), doenças infecciosas (BUTANI; YEWALE; MISRA, 2016) e cicatrização de feridas crônicas (EL-BAZ et al., 2023). No entanto, seu uso no tratamento do câncer de pele tornou-se particularmente relevante devido a capacidade de melhorar a penetração de moléculas bioativas na pele e no tumor, além do direcionamento seletivo sem danificar tecidos saudáveis. Isso aumenta a retenção de fármacos, resultando em dosagem reduzida, toxicidade mínima e melhor adesão do paciente. No âmbito da TFD, as nanopartículas conferem proteção físico-química ao fotossensibilizador, garantindo capacidade de produção de EROs de maneira satisfatória. Além disso, para aumentar a seletividade e a localização específica do fotossensibilizador no tumor, é possível usar o direcionamento ativo que se baseia no acoplamento de anticorpos, folato, proteínas/peptídeos na superfície da nanopartícula (PASZKO et al., 2011; YUAN et al., 2022).

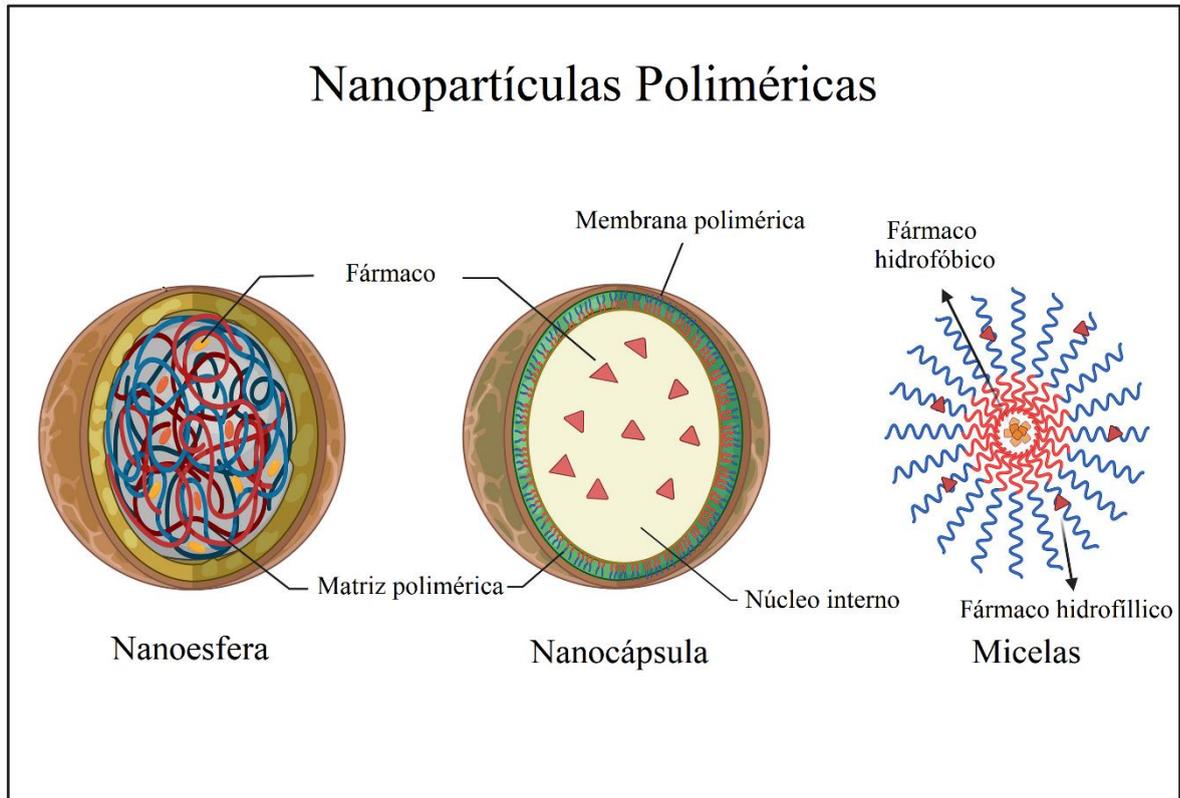
Os nanocarreadores podem ser projetados com uma variedade de tamanhos, cargas e características, que podem ser ajustados por meio de diferentes métodos de preparo e matérias-primas que são comumente aplicadas na pele. Com base em sua composição, podem ser categorizadas em nanocarreadores lipídicos, inorgânicos e poliméricos. Recentemente, as nanopartículas baseadas em polímeros despertaram grande interesse devido à capacidade de controle das propriedades do material polimérico, como tamanho, forma e modificações superficiais facilitadas. Além disso, determinados polímeros possibilitam terapias combinadas, proporcionando resultados terapêuticos sinérgicos (GÜNGÖR; KAHRAMAN, 2021; MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010; ZHANG et al., 2013).

Em detalhes, as nanopartículas poliméricas são compostas de polímeros hidrofílicos ou

lipofílicos, naturais (quitosana, alginato, gelatina e albumina) ou sintéticos (copolímeros de poli (lactídeo-co glicolídeo) (PLGA) e poli (ϵ -caprol actona), geralmente biodegradáveis e biocompatíveis. O PCL é um polímero biodegradável e biocompatível que é sintetizado por meio da polimerização da abertura do anel da caprolactona, podendo ser encontrado em diferentes formas, como uma substância cerosa ou um polímero sólido, dependendo do seu peso molecular. É solúvel em vários solventes orgânicos, como clorofórmio, diclorometano, tetracloreto de carbono, benzeno e tolueno à temperatura ambiente. O PCL é amplamente utilizado na liberação controlada de medicamentos devido à sua alta permeabilidade a muitos fármacos e à sua baixa toxicidade. Além disso, o fato de que vários dispositivos de entrega de medicamentos fabricados com PCL já têm aprovação da FDA permite um caminho mais rápido para o mercado (JIANG; ZHANG, 2011; SINHA et al., 2004; WOODRUFF; HUTMACHER, 2010).

Os fármacos podem ser adsorvidos na superfície física ou quimicamente, se encontrar no seu interior ou ainda distribuídos por toda a partícula, sendo subclassificadas em três principais tipos: nanoesferas, nanocápsulas e micelas poliméricas (figura 6). Elas são excelentes transportadores devido ao tamanho pequeno, solubilidade em água, não toxicidade, excelente estabilidade, possuir uma elaboração e design simples, além de poder encapsular fármacos de natureza hidrofílica e lipofílica (SAJID; PŁOTKA-WASYLKA, 2020). Existem diversos métodos de preparação disponíveis, porém, para moléculas hidrofílicas, como o AM discutido neste trabalho, o método de dupla emulsificação e evaporação de solvente se destaca como uma abordagem eficaz. Esse método consiste na preparação de uma emulsão primária A/O, através da sonicação de um pequeno volume de água contendo o fármaco e um solvente orgânico contendo o polímero. Esta emulsão primária consiste na fase interna da segunda emulsão, também preparada por sonicação, cuja fase externa é uma solução aquosa do tensoativo (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010).

Figura 6. Representação esquemática da estrutura de nanoesferas, nanocápsulas e micelas poliméricas.



Fonte: Adaptado de HOSSEINI et al., 2023

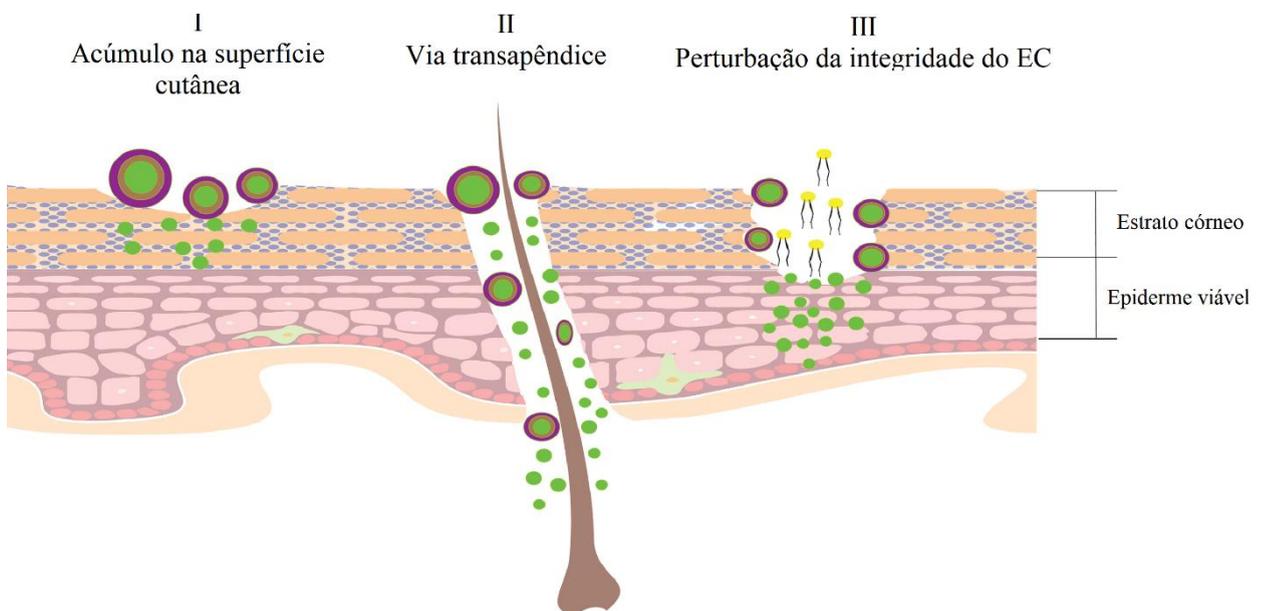
A penetração cutânea de nanopartículas é um tópico amplamente discutido na literatura, e as vias exatas de permeação ainda não são completamente compreendidas. Dependendo da indicação terapêutica, as formulações de nanopartículas podem ser projetadas para três cenários distintos: (1) retenção do fármaco na superfície da pele, sem penetração além dessa camada; (2) acúmulo de fármacos dentro das diferentes camadas da pele, onde a doença está localizada, como no caso de neoplasias cutâneas. Nesse cenário, a formulação e o medicamento permaneceriam retidos por longos períodos, sem mais penetração; (3) Liberação transdérmica, visando a entrada na circulação sistêmica. Nesse caso, a formulação e o fármaco precisam penetrar mais profundamente na pele e serem absorvidos na corrente sanguínea para tratar doenças em locais distantes do local de aplicação. Neste trabalho em particular, estamos discutindo uma aplicação tópica sem a intenção de alcançar a circulação sanguínea. Portanto, nos concentraremos na explanação dos mecanismos relacionados a essa abordagem específica (KRISHNAN; MITRAGOTRI, 2020a; YUAN et al., 2022).

A via transcelular refere-se ao movimento das nanopartículas através do estrato córneo

por meio da passagem direta através dos corneócitos. Esta via, de natureza hidrofílica, implica que as formulações devem passar por várias etapas de partição e difusão através da matriz de células e lipídios. Portanto, nanopartículas com uma natureza anfifílica podem, em teoria, mover-se ao longo dessa rota. Por outro lado, a via intercelular envolve o movimento das nanopartículas através dos domínios lipídicos hidrofóbicos localizados entre os corneócitos. Assim, nanopartículas projetadas com domínios lipofílicos podem ser mais adequadas para essa rota. No entanto, é importante ressaltar que a penetração de nanocarreadores intactos através da barreira do estrato córneo é considerada improvável (GÜNGÖR; KAHRAMAN, 2021; KRISHNAN; MITRAGOTRI, 2020a).

Para as nanopartículas em geral, e mais especificamente as nanopartículas poliméricas, a via transapêndice parece ser de maior importância (figura 7 – II). Os nanocarreadores poliméricos têm a capacidade de se acumular nos folículos pilosos, sulcos e camadas superficiais da pele (figura 7 – I). Os folículos pilosos podem atuar como depósitos de nanopartículas, permitindo seu movimento através dos ductos de vários apêndices. Esse processo cria uma rota contínua através do estrato córneo para que as nanopartículas se depositem em camadas mais profundas da pele. Outro mecanismo menos abordado, mas possível, é a perturbação da integridade da barreira do estrato córneo, aumentando a sua fluidez por meio dos componentes presentes na nanopartícula (figura 7 – III) (GÜNGÖR; KAHRAMAN, 2021).

Figura 7. Os principais mecanismos de penetração cutânea dos nanocarreadores.



Fonte: Adaptado de GÜNGÖR; KAHRAMAN, 2021

Com o progresso da pesquisa, alguns nanocarreadores voltados especificamente para o tratamento do câncer foram aprovados no mercado, como o Abraxane®, onde o agente quimioterápico paclitaxel é associado à albumina para tratar câncer de mama e pâncreas (BERNABEU et al., 2017), e o DaunoXome®, aprovado para o tratamento do sarcoma de Kaposi (DAWIDCZYK et al., 2014). Especificamente na terapia fotodinâmica, existe o Visudyne®, uma formulação lipossomal que contém um derivado benzoporfirínico e é utilizado para tratar condições oftalmológicas como a degeneração macular relacionada à idade (DMRI) e outros problemas de retina (RIZVI et al., 2016).

No entanto, terapias tópicas baseadas em nanopartículas poliméricas direcionadas especificamente para o tratamento do câncer de pele em conjunto a terapia fotodinâmica ainda não foram abordadas em um contexto comercial. Com isso, testes *in vitro* e *in vivo* foram feitos para investigar a eficácia dessa nova estratégia contra o carcinoma de células escamosas.

Zhang et al., 2022 desenvolveram uma nanopartícula polimérica de ácido hialurônico (AH) para liberar pirofeoforbídeo-a (PPa) para o tratamento do carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço através da TFD. A encapsulação aumentou a solubilidade em água, seu acúmulo no SCC de cabeça e pescoço além de preservar sua fotoatividade. *In vivo*, demonstrou eficácia e tempo de sobrevida muito melhores em relação à terapia convencional com TFD (ZHANG et al., 2022).

Com o objetivo de melhorar a entrega do fotossensibilizador 5-ALA, foram desenvolvidas nanopartículas de ácido láctico-co-glicólico (PLGA) usando o método de dupla emulsificação e evaporação de solvente. Células A431, derivadas de câncer epidermoide humano, foram empregadas como modelo biológico *in vitro* e posteriormente expostas a um laser com comprimento de onda de 632,8 nm. Este estudo revelou que as nanopartículas entram nas células do SCC principalmente por meio da via de endocitose dependente de dinamina/mediada por clatrina. Adicionalmente, as nanopartículas facilitam sua passagem diretamente através das aberturas da membrana celular devido à permeabilidade das células, resultando em um aumento na captação celular de 5-ALA e, como consequência, melhorando a eficácia terapêutica (SHI et al., 2013).

Trabalhando com a mesma nanopartícula, outro estudo decidiu realizar uma abordagem *in vivo*. Foi utilizado um modelo de camundongos machos SKH-1, com 6-8 semanas de idade, que foram desprovidos de pelos. A pele desses camundongos foi exposta à irradiação UV simulada para induzir o desenvolvimento de SCC no dorso dos animais. Em seguida, realizou-se a TFD usando irradiação a laser com um comprimento de onda de 632,8 nm. Os resultados revelaram que a TFD mediada por ALA-NPs suprimiu o crescimento tumoral. Após duas

semanas de tratamento, o volume dos tumores diminuiu em média 68% em comparação com o tratamento convencional. Além disso, os tumores de pequeno porte, com volume inferior a 35 mm³, foram completamente eliminados após o tratamento. Adicionalmente, as nanopartículas estimularam significativamente a resposta imunológica, resultando em uma notável indução na expressão de células T CD4+ e CD8+ (WANG et al., 2015).

No que diz respeito ao AM, a literatura demonstra sucesso ao encapsulá-lo em nanopartículas poliméricas, principalmente para preservar suas propriedades como fotossensibilizador. Tang et al. 2008, desenvolveu nanopartículas de poliacrilamida e constatou o aumento da eficiência e da potência do fármaco como agente fotodinâmico, permitindo geração suficiente de ¹O₂ estimulada por luz, quanto uma difusão facilitada para causar danos a células tumorais. (TANG et al., 2008).

A fim de estudar a estabilidade do encapsulamento de AM, Gutiérrez-Valenzuela produziram nanopartículas de PLGA (MB-PNP) através de uma nova abordagem combinando técnicas de emulsificação simples e dupla. Parâmetros como o tamanho, o índice de polidispersão, o potencial zeta, o carregamento e a eficiência de encapsulamento das nanopartículas demonstraram que as mesmas foram produzidas com estabilidade suficiente para serem empregadas em formulações futuras (GUTIÉRREZ-VALENZUELA et al., 2018).

Como discutido, existem muitos estudos que exploram o uso de nanocarreadores poliméricos para o tratamento do SCC por meio da TFD. No entanto, a inovação deste estudo reside na combinação da encapsulação do AM com a aplicação da TFD para o tratamento do SCC, juntamente com a utilização de métodos físicos, como discutido posteriormente.

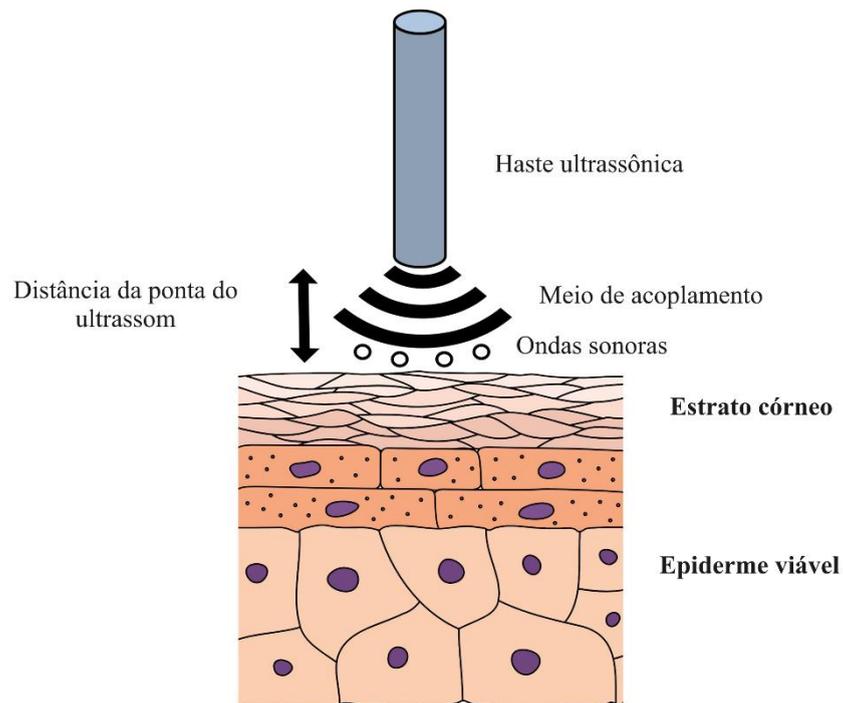
2.7 Métodos físicos para aprimorar a entrega tópica: Sonoforese

Os sistemas acionados por estímulos físicos podem viabilizar uma diversidade de padrões de liberação de fármacos, aumentando o transporte de macromoléculas para o EC, possibilitando maiores concentrações nas camadas profundas da pele. Os métodos mais estudados na literatura são a iontoforese, microagulhas e sonoforese. Resumidamente, a iontoforese consiste na aplicação de uma corrente elétrica de baixa intensidade, geralmente abaixo de 0,5 mA/cm², para impulsionar moléculas de fármacos carregadas em direção à pele, quando estas estão posicionadas sob um eletrodo com polaridade semelhante. Essa técnica é particularmente eficaz para melhorar a absorção de moléculas de fármacos hidrofílicas com peso molecular inferior a 15 kDa. Já as microagulhas consistem em agulhas de tamanho micro, que formam canais microscópicos para garantir a permeação local de fármacos (PETRILLI;

LOPEZ, 2018; SUN et al., 2020).

Embora essas duas técnicas sejam mais estudadas na literatura, nas últimas décadas a sonoforese tem se destacado cada vez mais. A sonoforese consiste no uso do ultrassom (US) para a administração de fármacos para, ou através da pele e foi inicialmente empregada com frequências mais elevadas, variando entre 20 kHz e 16 MHz. Entretanto, a partir da década de 1990, vários estudos destacaram que a US de baixa frequência (20-100 kHz), pode ser mais efetiva, uma vez que provoca alterações conformacionais mais significativas na pele (figura 8). Seus mecanismos não foram claramente compreendidos, refletindo o fato de que vários fenômenos podem ocorrer, como indução de transporte convectivo; efeitos mecânicos (ocorrência de tensões devido à variação de pressão induzida pelo ultrassom); efeitos térmicos (aumento de temperatura) e cavitação (geração e oscilação de bolhas de gás), sendo estes dois últimos os mecanismos de maior predominância (JOSHI; RAJE, 2002).

Figura 8. Representação gráfica do mecanismo proposto pela sonoforese, que visa perturbar o estrato córneo da pele para melhorar a entrega de medicamentos tópicos.



Fonte: Adaptado de PETRILLI; LOPEZ, 2018

Em detalhes, o efeito térmico ocorre quando o ultrassom passa por um meio e parte de sua energia é absorvida. Esse aumento de temperatura pode incrementar a permeabilidade da pele de várias maneiras. Primeiramente, as moléculas do fármaco possuem mais energia para

se moverem e se difundirem, em temperaturas mais altas. Há, também, a dilatação de poros, folículos pilosos e glândulas sudoríparas, facilitando a absorção dos medicamentos. Por fim, tem-se o aumento do fluxo sanguíneo na área tratada. A cavitação, por sua vez, é apontada como a principal contribuinte do efeito da sonoforese, e envolve a formação e oscilação de bolhas de gás em um líquido, seguidas pelo seu colapso quando expostas a uma onda sonora. Esse fenômeno pode criar movimentos microscópicos vigorosos, que leva à desordem das bicamadas lipídicas e à formação de canais aquosos na pele através dos quais os fármacos podem permear. Além disso, a presença de surfactante nos meios de acoplamento (líquido usado para acoplar o ultrassom à pele) pode levar à extração das bicamadas lipídicas (OGURA; PALIWAL; MITRAGOTRI, 2008; PARK et al., 2014).

O sistema sonoforético é aplicado principalmente de duas maneiras: como um pré-tratamento antes do contato com a formulação ou como uma aplicação simultânea através de um meio de acoplamento contendo o fármaco. Para avaliar a eficácia da sonoforese, a medição da resistividade elétrica da pele é de extrema importância. Em geral, as peles tratadas demonstram uma resistividade menor em comparação com as peles não tratadas. No entanto, o desempenho da aplicação da sonoforese depende de vários fatores ligados ao ultrassom, incluindo sua frequência, intensidade, ciclo de trabalho (a proporção do tempo em que o ultrassom está ligado), duração da aplicação, distância entre o transdutor e a pele, e as propriedades do meio de acoplamento, que incluem o teor de gás, tensão superficial, viscosidade e densidade. Cada um desses parâmetros desempenha um papel crucial na eficácia do ultrassom para uma aplicação específica (OGURA; PALIWAL; MITRAGOTRI, 2008; WONG, 2014).

Com o surgimento da sonoforese de baixa frequência, os pesquisadores começaram a explorar seus efeitos inibitórios em tecidos tumorais malignos e descobriram que ele poderia induzir efeitos citotóxicos (MARIGLIA et al., 2018), pró-apoptóticos e inibir proteínas de resistência de células tumorais (YAO; ZHANG, 2019). Fan et al., 2017 explorou o potencial do ultrassom de baixa intensidade na entrega de doxorrubicina (DOX) para carcinoma epidermóide oral. *In vitro* e *in vivo*, esse estudo confirmou que o tratamento combinado do ultrassom e DOX leva à formação de poros temporários da superfície celular, o que, por sua vez, aumenta a captação celular de DOX. O tratamento combinado também diminui a expressão de MMP-2 e MMP-9, enzimas de extrema importância para a patologia do SCC oral (FAN et al., 2017). Outro estudo, testou os efeitos combinados do ultrassom de baixa intensidade e administração de cetuximabe, um anticorpo antireceptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), em células de carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço (HSC-3 e HSC-4). Embora o mecanismo não tenha sido completamente elucidado no artigo, observou-se que a combinação

das terapias causou modificações na sinalização do EGFR e na via das caspases, o que poderia aumentar o efeito apoptótico nessas células (MASUI et al., 2013).

Além disso, a sonoforese é uma estratégia que pode ser combinada com outros métodos para melhorar a penetração cutânea, como os nanocarreadores mencionados anteriormente. O ultrassom pode agir sozinho, aumentando a permeabilidade da pele para permitir a passagem dos nanocarreadores, ou pode ser usado como um gatilho externo para desencadear a liberação do fármaco através de mudanças conformacionais nas nanopartículas (nanopartículas responsivas a estímulos). No presente trabalho, discutiremos apenas a primeira hipótese de uso do ultrassom (DRAGICEVIC; MAIBACH, 2018; MORADI KASHKOOLI et al., 2023).

Kasetvatin, Rujivipat e Tiyafoonchai (2015) demonstraram através da combinação de lipossomas elásticos (LE) e ultrassom de baixa frequência (UBF), um aumento da permeação cutânea do ácido hialurônico (AH) através de um estudo *in vitro* com pele de orelha de porco. Especificamente, a permeação foi aumentada em 2,1 vezes em comparação com a solução de LE isoladamente e em 6,4 vezes em comparação com a combinação de HA e UBF. Além disso, a influência do tempo de exposição ao UBF também foi analisada. Os resultados indicaram que à medida que o tempo de exposição ao UBF aumenta, há um aumento na perturbação da pele. Foi observado então, que 1 minuto foi o tempo ideal para aumentar a permeação do AH sem causar danos à epiderme (KASETVATIN; RUJIVIPAT; TIYABOONCHAI, 2015).

A utilização simultânea da sonoforese e das micelas poliméricas resultou em uma melhoria na penetração dérmica e na capacidade de produção de oxigênio reativo a partir da ftalocianina de zinco (ZnPc). Após 6 horas de permeação cutânea, o tratamento com ultrassom aumentou a quantidade de ZnPc na derme em mais de 40 vezes em comparação com o tratamento sem ultrassom e quase 5 vezes em comparação com o protocolo de pré-tratamento com sonoforese. Isso levou a uma redução significativa na viabilidade das células de melanoma (MARTINS et al., 2020).

De fato, a sonoforese, especialmente quando combinada com nanocarreadores, continua sendo um campo de pesquisa em evolução. A compreensão aprofundada da interação entre as ondas de ultrassom e a estrutura das nanopartículas é crucial para evitar danos indesejados. Além disso, a falta de estudos que correlacionem a sonoforese com a terapia fotodinâmica, especialmente para o tratamento do SCC, destaca a necessidade de investigações mais aprofundadas nessa área. Portanto, o estudo desses tratamentos em conjunto é de grande importância para avançar no desenvolvimento de terapias mais eficazes e seguras para o SCC.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Desenvolver, caracterizar e avaliar nanopartículas poliméricas contendo azul de metileno para atuação na terapia fotodinâmica associado à sonoforese para liberação tópica no tratamento do câncer de pele.

3.2 Objetivos Específicos

- Desenvolver nanopartículas a base de policaprolactona para a encapsulação do AM;
- Caracterizar os sistemas por meio de análises de tamanho de partícula, índice de polidispersão, potencial zeta e eficiência de encapsulação;
- Investigar a morfologia da nanopartícula por microscopia eletrônica de varredura;
- Comparar o perfil de liberação do AM a partir das nanopartículas e solução *in vitro*;
- Avaliar a produção de espécies reativas de oxigênio do AM em solução e nanopartícula;
- Avaliar a citotoxicidade em linhagem de câncer de pele do AM livre e encapsulado, com ausência ou presença de luz, em células de carcinoma epidermóide;
- Avaliar a captação celular das nanopartículas em células de carcinoma epidermóide por microscopia confocal;
- Avaliar a penetração cutânea de AM em solução ou nanopartículas de forma passiva ou com aplicação de sonoforese.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

O metanol foi obtido de J.T. Baker e diclorometano (DCM) da marca NEON. Álcool polivinílico, azul de metileno, poli- ϵ -caprolactona (PCL), rodamina 123, brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT), dimetilsulfóxido (DMSO), 4',6'-diamino-2-fenilindole (DAPI), meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), tripsina, meio de montagem Fluoromount®, solução antibiótica/antimicótica, paraformaldeído foram obtidos da Sigma-Aldrich. O cloreto de potássio (KCl) foi obtido pela Synth. Filtros de PTFE (25mm, 0,45 μ m, Allcrom) foram obtidos da Allcrom®. O modelo da linhagem celular humana de carcinoma espinocelular A431 foi obtido do Banco de Celulares do Rio de Janeiro (Brasil).

4.2 Desenvolvimento das nanopartículas

Com base nas concentrações otimizadas da formulação obtidas a partir do planejamento experimental de Box-Behnken realizado em estudo prévio do grupo, através do software Minitab 19® (LIMA et al., 2023), as nanopartículas foram preparadas através da dupla emulsificação e evaporação de solvente. Primeiramente, 2 mg de AM foi dissolvido em 2 mL de solução aquosa contendo álcool polivinílico (PVA) (0,82%) e agitada em vórtex por 1 minuto. Em seguida, 52,42 mg de policaprolactona (PCL) foi dissolvida em 9,2 mL de diclorometano (DCM) e agitada em vórtex por 1 minuto. Após isso, a fase aquosa foi cuidadosamente adicionada sobre a fase orgânica e agitada em vórtex por 30 segundos. A mistura, então, foi emulsionada por sonicação com ultrassom de haste (QSonica Sonicators Q500) durante 3 min a 30% da amplitude sob um banho de gelo. Logo depois, a emulsão primária formada foi gotejada sob 25 mL da solução de PVA a 1% e então re-emulsionada sob as mesmas condições de sonicação anteriores. Por fim, o DCM foi evaporado sob agitação magnética, à temperatura ambiente em capela de exaustão por 1 hora. As etapas de emulsificação foram acompanhadas por microscopia ótica.

4.3 Caracterização físico-química

4.3.1 Avaliação do tamanho de partícula, índice de polidispersividade e potencial zeta

Alíquotas de nanopartículas (100 μ L) foram diluídas em solução de cloreto de potássio (KCl) 1 M (900 μ L) e analisadas em células com 1 cm de trajeto óptico usando espalhamento

dinâmico de luz (DLS) no dispositivo Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments) a 25 °C para medidas de tamanho de partícula e PDI. O potencial zeta foi determinado de maneira semelhante, com base na mobilidade eletroforética de partículas dispersas quando submetidas a um campo elétrico.

4.3.2 Eficiência de encapsulação do AM

Para o cálculo de eficiência de encapsulação o método indireto descrito por Crisóstomo et al., foi utilizado com adaptações (CRISÓSTOMO et al., 2022). Para isso, uma curva de calibração foi preparada nas concentrações do fármaco de 0,5, 1,0, 3,0, 6,5 e 12,5 µg/mL, diluídas a partir de uma solução de AM na concentração de 100 µg/mL, em água destilada. A linearidade foi avaliada a partir da equação da reta e coeficiente de correlação linear. A eficiência de encapsulação foi calculada pelo método indireto através da ultrafiltração, onde calcula-se a quantidade de fármaco livre e correlaciona com sua quantidade teórica. Para isso, é necessário centrifugar uma alíquota da formulação (1 mL) em tubo amicon 50kDa a 3000g por 10 min. Depois, pipetar 300 µL do centrifugado e adicionar 2700 µL de água destilada para leitura em espectrofotômetro UV-Vis em comprimento de onda 570 nm. Os resultados de absorvância obtidos foram plotados na equação da reta resultante da curva de calibração do fármaco, para quantificação da porção livre. O cálculo da porcentagem de encapsulação é então representado pela equação 1:

$$\begin{aligned} & \text{Porcentagem de Encapsulação (EE\%)} \\ = & \frac{\text{concentração de azul de metileno teórico} - \text{concentração de azul de metileno livre}}{\text{concentração de azul de metileno teórico}} \times 100 \end{aligned} \quad (1)$$

4.3.3 Avaliação da morfologia das nanopartículas por microscopia eletrônica de varredura

A morfologia e o tamanho médio das nanopartículas foram avaliados por microscopia eletrônica de varredura (MEV) em microscópio eletrônico de varredura (Quanta 450 FEG-FEI), com resolução nominal de 1 nm. Alíquotas da formulação foram colocadas em um montador de amostra de alumínio-mínimo, sobre uma fita de carbono, secas à temperatura ambiente e revestidas com ouro, a fim de aumentar a condutividade superficial. As imagens de MEV foram capturadas em 150.000 X e 10 kV.

4.3.4 Análise de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A análise de FTIR procedeu-se com as amostras das nanopartículas previamente liofilizadas com sacarose utilizando espectrômetro FT/IR 4100 Jasco com dispositivo de reflectância total atenuada (ATR) (Jasco do Brasil Comercio de Instrumentos Científicos LTDA). A varredura foi obtida em resolução de 4 cm^{-1} , de 4000 cm^{-1} a 600 cm^{-1} .

4.4 Liberação *in vitro*

4.4.1 Método analítico para quantificação de AM

Para a quantificação de AM nos estudos de liberação *in vitro*, foi utilizado o método de espectrofotometria com detector ultravioleta-visível (UV-Vis) com leitura na faixa de 663 nm. A curva de calibração foi feita a partir de uma solução mãe de azul de metileno de 1 mg/mL em PBS pH 7,4. A partir dessa solução, foram preparados sete pontos da curva sendo eles: 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 1,0, 3,0 e 6,5 $\mu\text{g/mL}$. A linearidade foi avaliada a partir da equação da reta e coeficiente de correlação linear.

4.4.2 Método de liberação passiva

A liberação foi avaliada comparando-se a solução de azul de metileno com a formulação de nanopartículas, utilizando-se o método de liberação passiva. Assim, 1 mL das amostras foram colocados em contato com 7 mL de PBS pH 7,4 a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ em béqueres selados e mantidos sob agitação constante em uma incubadora de agitação orbital a 150 rpm. Os experimentos foram conduzidos em quadruplicata com amostras independentes para cada momento de coleta. A cada 1, 3, 5, 8, 10, 24 h, 2 mL de cada amostra foi colocado em um tubo Amicon de 50 kDa e centrifugado por 10 min a 4000 g. O filtrado foi diluído (1:3) e lido em espectrofotômetro a 663 nm. O percentual de AM liberado de cada amostra é representado graficamente em função do tempo para avaliar o perfil de liberação do fármaco. Além disso, avaliou-se a cinética de liberação (DDSOLVER), submetendo os dados obtidos no teste à cinética de ordem zero (Equação (2)), cinética de primeira ordem (Equação (3)), Higuchi (Equação (4)), Weibull (Equação (5)) e Hopfenberg (Equação (6)). Observando os coeficientes de correlação linear entre os modelos, com base em suas respectivas equações abaixo:

Modelo de zero ordem:

$$M_T = M_B + K_0 t \quad (2)$$

Modelo de primeira ordem:

$$\ln(M_0 - M_T) - \ln(M_0) - K_1 t \quad (3)$$

Modelo de Higuchi

$$m t = K_H t^{0.5} \quad (4)$$

Modelo de Weibull

$$F = 100 \cdot \left[1 - e^{-\frac{(t-T_i)\beta}{a}} \right] \quad (5)$$

Modelo de Hopfenberg

$$F = 100 \cdot [1 - (1 - K_{HC} \cdot t)^3] \quad (6)$$

4.5 Geração de espécies reativas de oxigênio (EROs)

O 1,3-difenilisobenzofurano (DPBF) foi utilizado como indicador para detectar a produção de EROs pelo azul de metileno em solução ou encapsulado em nanopartículas poliméricas (MOHSENI et al., 2022). Resumidamente, 200 μ L da solução (240 μ g/mL em DMSO) e nanopartícula de azul de metileno (80 μ g/mL) foram colocados em uma placa de 96 poços em conjunto com 100 μ L de solução de DPBF (concentração final: 30 μ M em DMSO) sob condições de escuro. Imediatamente, representando o tempo 0, a absorbância das amostras foi registrada utilizando-se um leitor de microplacas a 410 nm. Logo após, a placa foi submetida à irradiação luminosa (630 nm, 6,7 J/cm², 0,001841 W/cm²) seguido de registro da absorbância a cada 3 min até totalizar 30 min de irradiação. Em seguida, a porcentagem de decaimento da absorção foi plotada contra o tempo de irradiação. A diminuição da absorção de DPBF ao longo do tempo é proporcional à sua taxa de reação com a produção de ERO. Grupos controle de DPBF, DMSO e nanopartículas sem azul de metileno foram utilizados para remover possíveis interferências.

4.6 Estudos de penetração cutânea

4.6.1 Verificação da resistividade das peles de orelha suína

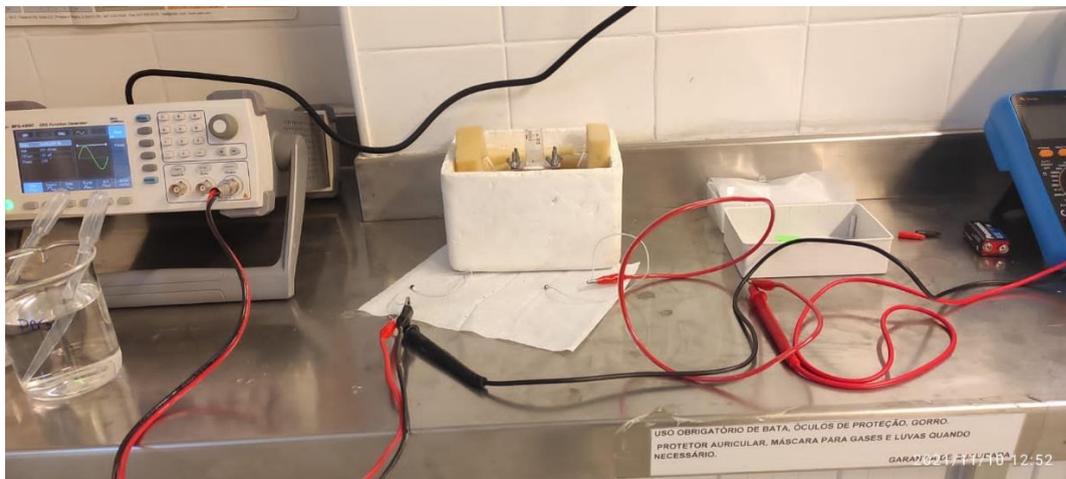
Orelhas de porco obtidas de um matadouro local (Fortaleza, Ceará) tiveram a pele cuidadosamente dissecada com bisturi e o tecido adiposo subcutâneo foi cuidadosamente removido com tesoura cirúrgica. Cortes de pele com quaisquer feridas, sangramento, doenças

de pele, cortes ou orifícios na superfície foram descartados. Uma área de aproximadamente 0,95 cm² foi cortada e montada no aparato da célula de Franz (n=5) com o estrato córneo voltado para o compartimento doador e epiderme viável e derme voltadas para o compartimento receptor. Para determinar a resistividade da pele, eletrodos de disco Ag/AgCl com um diâmetro de 4,0 mm foram inseridos nos compartimentos doador e receptor das células de difusão de Franz e preenchidos com PBS (pH 7,4). Uma potência de 100 mV (RMS) e uma frequência de 10 Hz foram aplicadas usando um equipamento gerador de sinal, resultando em uma corrente elétrica alternada. A intensidade da corrente elétrica capaz de atravessar a pele foi medida utilizando um multímetro (Figura 9). A resistência da pele foi calculada utilizando a Lei de Ohm (eq. 7 e 8).

$$\text{Resistência} = \frac{100 \cdot 10^{-3}}{\text{corrente medida} \cdot 10^{-6}} \quad (7)$$

$$\text{Resistividade (k}\Omega \cdot \text{cm}^2) = \text{Resistência} \cdot 0,95 \text{ cm}^2 \cdot 10^{-3} \quad (8)$$

Figura 9. Aparato utilizado para a realização da medição da resistência da pele de orelha suína.



Fonte: Elaborado pelo autor

4.6.2 Quantificação do AM em pele de orelha de suíno por espectrofotometria UV-Vis

Para quantificar o AM nas camadas da pele, um método anteriormente desenvolvido foi empregado com adaptações (GARCIA et al., 2018). Pedacos de pele de orelha de porco obtidas

de um matadouro local (Fortaleza, Ceará), com área de $0,95 \text{ cm}^2$ foram utilizados para desenvolver uma curva de calibração matrizada em triplicata. A solução mãe foi preparada na concentração de $400 \mu\text{g/mL}$ em água destilada e a partir dela foram preparados os 7 pontos da curva nas concentrações de 0,6; 0,8; 1; 3; 5; 6,5; 8 $\mu\text{g/mL}$. Para isso, cada tubo falcon contendo um pedaço de pele suína foi contaminado com uma concentração conhecida de AM, e após secagem da solução na pele prosseguiu-se com a extração em metanol. Nesse processo, as amostras foram submetidas a agitação por vórtex durante 2 minutos e posteriormente foram colocadas em ultraturrax por 3 min a 7000 rpm. Para intensificar a extração as amostras ainda foram postas em banho de ultrassom por 45 minutos e centrifugadas por 4000 rpm por 20 min. Finalmente, as foram filtradas com filtro PTFE $0,45 \mu\text{m}$. Para a quantificação das amostras foi utilizada a espectrofotometria UV-Vis com leitura na faixa de 652 nm. Para análise da interferência dos componentes da pele no método espectrofotométrico procedeu-se uma varredura espectral seguindo a mesma metodologia sem aplicação do azul de metileno. O cálculo da recuperação foi feito utilizando-se a absorbância do AM extraída da pele em relação à absorbância do AM em metanol. Os resultados foram apresentados em porcentagem de recuperação.

4.6.3 Quantificação de AM nas camadas da pele e no compartimento receptor

Aproximadamente $0,95 \text{ cm}^2$ de pele foram cortados e montados no aparato da célula de Franz ($n=5$), com o estrato córneo voltado para o compartimento doador (Figura 10). A resistividade da pele foi calculada conforme descrito na seção 4.7.1, e apenas amostras com uma resistividade inicial superior a $35 \text{ k}\Omega \text{ cm}^2$ foram utilizadas.

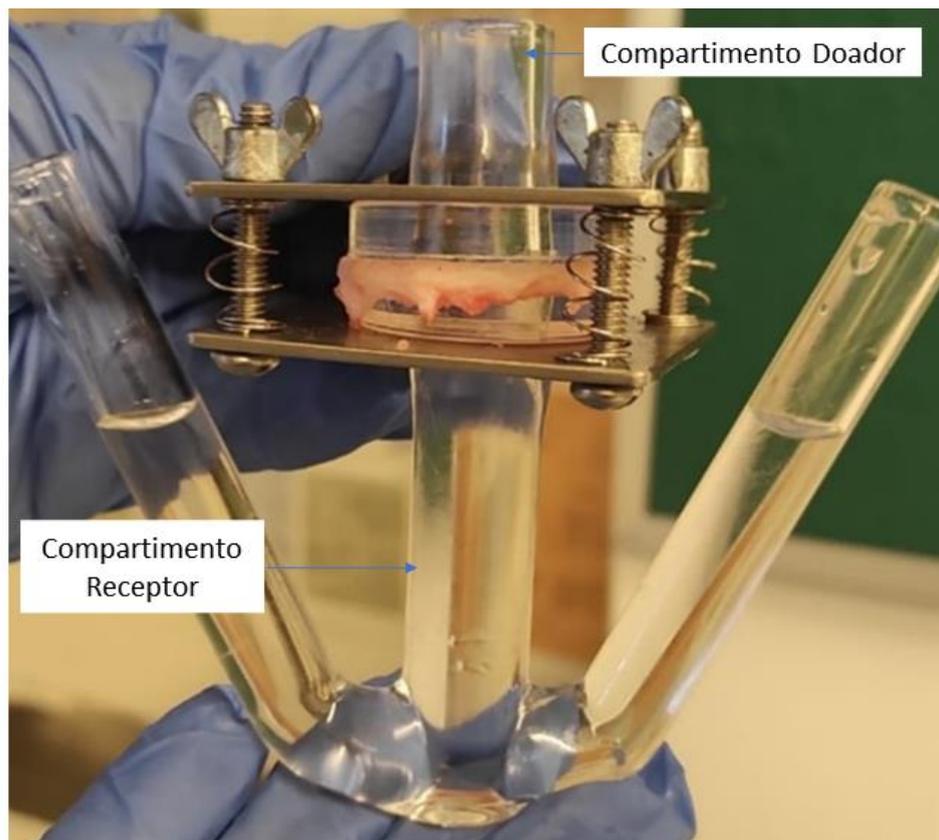
Na célula de Franz, a solução e a nanopartícula de AM ($80 \mu\text{g/mL}$) foram adicionadas ao compartimento doador (1 mL), enquanto o compartimento receptor foi preenchido com 15 mL de PBS 7,4. As células de Franz devidamente montadas foram mantidas sob agitação magnética a 150 rpm por 16 horas a 32°C .

Ao fim do experimento, o aparato da célula de Franz foi desmontado e as peles lavadas superficialmente com água destilada e secas. Para extração do AM no estrato córneo utilizou-se o protocolo de *tape stripping* com fita Scott 3M. Com isso, 15 pedaços de fita adesiva foram colados ao estrato córneo e retiradas logo em seguida, sempre descartando a primeira fita e as demais são postas em tubo falcon contendo 5 mL de metanol. Para a extração do AM na epiderme viável + derme foi utilizada a pele remanescente do *tape stripping* cortada em pequenos pedaços e colocadas em tubo falcon contendo 5 mL de metanol. Por fim, o PBS

presente no compartimento receptor também foi coletado em tubo falcon.

Para quantificação do AM todas as amostras foram agitadas em vórtex durante 2 minutos. As amostras de epiderme viável + derme seguiram etapas adicionais em ultraturrax por 3 min a 7000 rpm, banho de ultrassom por 45 minutos e centrifugação por 4000 rpm por 20 min, nessa ordem, respectivamente. Por fim, todas as amostras foram filtradas em filtro PTFE 0,45 μm e armazenadas no congelador em tubos previamente higienizados. Todas as amostras foram quantificadas como descritas no tópico 4.6.2.

Figura 10. Célula de Franz montada para o experimento de avaliação da penetração cutânea de AM, com indicações dos seus principais compartimentos.



Fonte: Elaborado pelo autor

4.6.4 Pré-tratamento da pele com sonoforese

Neste experimento, o efeito do ultrassom na permeação do AM através da pele foi investigado. Inicialmente, a pele foi fixada na célula de difusão de Franz como explicado no tópico 4.6.1, o meio receptor foi preenchido com 15 mL de PBS pH 7,4 e o meio doador com 2

mL de PBS + SDS 1%. A resistividade da pele foi medida de acordo com o explicado anteriormente. Para a sonoforese, foi utilizado o sonicador de haste a altura de 5 mm no compartimento doador a partir da pele, para efetuar uma sonicação por 1 minuto, com pulso em 5s “on” e 5s “off” e amplitude de 20%. Essa etapa foi monitorada a fim de evitar elevação abrupta da temperatura. Após sonicação, a resistividade da pele foi novamente medida, almejando-se valores em torno de 1 k Ω .cm². Por fim, prosseguiu-se conforme o t3pico 4.6.3 para avaliar a penetra33o do AM nas camadas da pele p33s aplica33o da sonoforese.

4.7 Estudos celulares

4.7.1 Cultura celular

Para avalia33o da citotoxicidade do AM, tanto na forma livre como encapsulado, em conjunto com a terapia fotodin33mica, utilizou-se a linhagem celular humana de carcinoma epiderm33ide denominada (A431) oriundas do banco de c33lulas do Rio de Janeiro. As c33lulas foram cultivadas em meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado com 10% de soro bovino fetal e 1% de solu33o de antibi33tico/antimic33tico a 37°C em uma atmosfera contendo 5% de CO₂, seguindo as recomenda33es da American Type Culture Collection (ATCC).

4.7.2 Capta33o celular

A capta33o das nanop33rticulas foi avaliada por microscopia confocal na mesma linhagem celular citada previamente. Para essa an33lise, a formula33o otimizada foi preparada, substituindo o AM pelo marcador fluorescente mitocondrial, Rodamina 123 (40 μ g/mL). O processo de prepara33o seguiu os mesmos passos mencionados anteriormente para as nanop33rticulas. Assim, para estudos confocais, 5 \times 10⁵ c33lulas/po33o foram aplicadas sobre lam33nulas est33reis (22 mm/22 mm) acondicionadas em microplacas de 6 po33os e incubadas por 24 h nas mesmas condi33es citadas anteriormente. Ap33s ades33o celular, o meio de cultivo completo foi retirado para a aplica33o do tratamento. Ao abrigo da luz, inoculou-se 1.900 μ L de meio incompleto e adicionou-se 100 μ L das amostras de nanop33rticulas para incuba33o por 1, 3, 6 e 24 h a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂.

Ap33s incuba33o, os po33os foram lavados tr33s vezes com 1 mL de solu33o salina, e ent33o as c33lulas foram fixadas com 2 mL da solu33o de paraformalde33do 1% (m/v) por 15 minutos. Decorrido o tempo, foram realizadas tr33s lavagens com solu33o salina para posterior 51di33o

de 900 μL da solução de DAPI (0,3 $\mu\text{g}/\text{mL}$) para coloração do núcleo celular. As lâminas foram lavadas novamente e, para preservar a fluorescência, foram colocadas em uma lâmina histológica contendo meio de montagem Fluoromount®. As lâminas montadas foram analisadas em microscópio confocal de fluorescência Zeiss, LSM 710 em aumento de 40 vezes, usamos $\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{em}} = 575 \text{ nm}$ para Rodamina 123 e $\lambda_{\text{ex}} = 340 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{em}} = 488 \text{ nm}$ para DAPI. As imagens foram processadas utilizando o software Zeiss ZEN Blue Edition 3.4 (ELOY et al., 2020, com adaptações).

4.7.3 Fotocitotoxicidade e citotoxicidade

Inicialmente, as células foram submetidas a tripsinização, seguida do plaqueamento em microplacas de 96 poços (1×10^4 células/poço). Essas células foram então incubadas a 37°C em uma atmosfera contendo CO_2 por um período de 24 horas. Após esse período, as placas foram retiradas da estufa para a aplicação dos grupos experimentais. Neste processo o meio completo foi removido, os poços lavados com solução salina e os tratamentos (solução de azul de metileno, nanopartícula de azul de metileno e nanopartícula branco) aplicados em concentrações de 0,05; 0,5; 5; 12,5; 25 e 50 μM que foram obtidas através da diluição do grupo em meio DMEM incompleto (sem FBS, soro bovino fetal, sem vermelho de fenol).

Após a aplicação do tratamento, as placas foram incubadas por 5 min ou 2 h (tempos de pré-irradiação) em estufa a 37°C e, em seguida, as células foram expostas à iluminação laser vermelha (630 nm, 6,7 J/cm^2 , 0,001841 W/cm^2) por 60 min. Após isso, os tratamentos foram retirados, os poços lavados com solução salina e o meio DMEM incompleto aplicado e as placas novamente incubadas por 24h a 37°C . Posteriormente, foi aplicado 170 μL de DMEM incompleto juntamente com 30 μL brometo de 3- [4,5-dimetil-tiazol-2-il] -2,5-difeniltetrazólio (MTT) (0,375 mg/mL), seguido por incubação (4h a 37°C). Em seguida, após a remoção do meio de cultura contendo MTT, o dimetil sulfoxido (DMSO) foi adicionado aos poços. A absorbância foi lida em 562 nm e a concentração capaz de matar 50% das células (IC50) foi obtida através das curvas de concentração – efeito, considerando a densidade óptica do controle negativo (células não tratadas) como 100%.

4.8 Análise estatística

A liberação *in vitro* foi analisada pelo teste ANOVA *two-way* com pós-teste de Bonferroni no software GraphPad Prism 19. Os resultados *in vitro* de citotoxicidade e penetração cutânea foram analisados por ANOVA *one-way*, com teste *post hoc* de Bonferroni

no mesmo software. Os dados foram estimados como média \pm desvio padrão e diferenças estatísticas (* $p < 0,05$) de comparação de médias são relatadas.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Desenvolvimento e caracterização físico-química das nanopartículas

O método de dupla emulsificação e evaporação de solvente é amplamente utilizado no desenvolvimento de nanopartículas, especialmente quando o fármaco em questão é hidrofílico. No entanto, a obtenção de NPs com tamanho desejado, baixa dispersão, e alta eficiência de encapsulação requer uma otimização cuidadosa de vários parâmetros de processo e da própria formulação. No caso de NPs poliméricos diversos fatores, tais como a concentração do polímero, tempo de sonicação, relação entre a fase oleosa e aquosa, concentração do tensoativo, velocidade de sonicação e a quantidade do fármaco, podem afetar suas propriedades. Portanto, o grupo de pesquisa realizou estudos preliminares para identificar quais fatores e seus respectivos níveis influenciam nas características das nanopartículas (LIMA et al., 2023). Para isso, utilizou-se o planejamento fatorial de Box-Behnken (BBD sigla em inglês *Box-Behnken Design*). Essa abordagem se insere no conceito conhecido como “*Quality by Design*” (QbD), que preconiza uma metodologia sistemática, baseada no conhecimento científico e no gerenciamento dos riscos relacionados ao processo de produção (IQBAL et al., 2015; SHAIKH; KALA; NIVSARKAR, 2017).

De fato, o planejamento fatorial de Box-Behnken oferece várias vantagens significativas. Uma delas é a redução da quantidade de experimentos necessários para serem realizados, resultando em economia de reagentes e redução do trabalho de laboratório. Além disso, essa metodologia possibilita o desenvolvimento de modelos matemáticos que permitem avaliar a importância e a significância estatística dos efeitos dos fatores estudados, bem como analisar os efeitos de interação entre esses fatores (FERREIRA et al., 2007). A formulação utilizada neste estudo foi otimizada previamente através do BBD por um conjunto de 15 experimentos com 3 níveis (baixo, médio e alto) correlacionando as variáveis independentes: razão fase oleosa/fase aquosa da 1ª emulsificação, porcentagem de tensoativo (álcool polivinílico) da 1ª emulsificação e quantidade de policaprolactona com as respostas das variáveis dependentes: tamanho de partícula, índice de polidispersividade (PDI) e eficiência de encapsulação (EE%), realizadas através software Minitab® 19.0 (Minitab, Filadélfia, PA, USA). Os resultados mostraram valores de tamanho de partícula variando de 160,43 a 278,06 nm, PDI entre 0,09 a 0,33 e EE% de 94,37 a 99,44% (tabela 1).

Tabela 1. Parâmetros utilizados no estudo de LIMA et al., 2023 para a otimização das formulações de nanopartícula de azul de metileno, em conjunto com as respostas das variáveis dependentes.

Fatores (variáveis independentes)	Níveis				
	Baixo (-1)	Médio (0)	Alto (+1)		
Razão fase oleosa/fase aquosa da 1ª emulsificação	3	4	5		
Porcentagem de PVA (%)	0,5	0,75	1		
Quantidade de policaprolactona (mg)	30	45	60		
Respostas (variáveis dependentes)	Objetivos	Inferior	Meta	Superior	Peso
Tamanho de partícula (nm)	Minimizar	160,43	160,43	278,06	1
Índice de polidispersão (PDI)	Minimizar	0,09	0,09	0,33	1
Porcentagem de encapsulação (%)	Maximizar	94,37	99,44	99,44	1

Fonte: Elaborado pelo autor.

Utilizando a função de deseabilidade do software, foi possível chegar à formulação atual do estudo (Tabela 2). Esta formulação foi então preparada em triplicata para permitir a comparação entre os valores previstos pelo modelo matemático e os valores experimentais obtidos. Os resultados revelaram um baixo erro relativo, sugerindo que a otimização foi bem-sucedida e os resultados experimentais se aproximaram das previsões do modelo, onde o tamanho de partícula obtido foi $156,93 \pm 8,2661$ nm, o PDI $0,11 \pm 0,0535$ e EE% de $94,22 \pm 2,1953$. Além disso, o potencial zeta também foi medido separadamente, obtendo valores médios de $-4,73$ mV.

Tabela 2. Comparação entre os valores previstos através da otimização no software Minitab® e os valores reais observados para a formulação de nanopartículas contendo azul de metileno.

Fator (variáveis independentes)	Nível otimizado		
Razão fase oleosa/fase aquosa da 1ª emulsificação	4,59		
Porcentagem de PVA (%)	0,82		
Quantidade de policaprolactona (mg)	52,42		
Resposta (variáveis dependentes)	Valor estimado	Valor experimental	Erro relativo (%)
Tamanho de partícula (nm)	186,76	$156,93 \pm 8,2661$	15,97
Índice de polidispersão (PDI)	0,1129	$0,11 \pm 0,0535$	2,56

Porcentagem de encapsulação (%)	98,39	94,22 ± 2,1953	4,23
---------------------------------	-------	----------------	------

Fonte: Elaborado pelo autor.

Com relação a formulação otimizada, pode-se discutir como seus componentes interagem para promover uma ótima encapsulação, um PDI baixo e um tamanho satisfatório para penetração cutânea. Sabe-se que o tamanho é um ponto crucial quando consideramos a penetração cutânea. Aqui, a relação entre o PVA e o PCL como também a escolha do método de preparo ganha destaque. A adição de tensoativos em emulsões desempenha um papel fundamental em sua estabilidade, aumentando seu revestimento superficial, formando um filme protetor ao redor das gotículas levando a formação de tamanhos menores e evitando sua coalescência. Na etapa da evaporação de solvente, essas características tornam-se importantes, pois o volume de emulsão pode diminuir, conseqüentemente, aumentando sua viscosidade, deixando o tamanho final da gota maior, resultando em uma NP também de maior dimensão. Aqui, foi observado que um aumento na quantidade de PCL e PVA resulta em partículas de tamanho menor. Utilizando a mesma metodologia de síntese, Iqbal et al., (2015) encontrou comportamentos semelhantes com relação ao PVA ao desenvolver nanopartículas de PCL. Em seu estudo, observou-se que o tamanho das nanopartículas diminuiu ao aumentar a concentração de PVA de 0,05 para 0,2 % (IQBAL et al., 2015). Além disso, um maior volume de solvente orgânico para dissolver o polímero evita a formação de uma emulsão primária viscosa, resultando em uma redução mais eficaz do tamanho das partículas durante a segunda etapa do processo de emulsificação.

Para redução do tamanho das partículas, utilizou-se o ultrassom de haste. As vantagens do ultrassom incluem menor consumo de energia, produção de emulsões mais homogêneas, com gotículas menores e mais estáveis em comparação à homogeneização mecânica e o uso de menor quantidade de tensoativo (IQBAL et al., 2015). Neste contexto, observou-se uma redução gradual do tamanho em cada etapa de sonicação. Isso pode ser explicado pelo fenômeno de cavitação, que resulta na fragmentação das gotículas em contato com a haste do equipamento.

Na literatura, ao ser encapsulado em matrizes poliméricas, o AM apresentou tamanhos relativamente semelhantes aos encontrados neste estudo. Por exemplo, Klepac-Ceraj et al., (2011), ao trabalhar com nanopartículas de PLGA catiônicas e aniônicas, relatou tamanhos variando entre 190 a 220 nm. Outros estudos que utilizaram diferentes matrizes, como nanopartículas de sílica sol-gel, como Tang et al., 2005, também reportaram tamanhos na faixa de 160 a 190 nm (TANG et al., 2005; KLEPAC-CERAJ et al., 2011).

Normalmente, estudos relatam que nanopartículas rígidas de até 10 nm penetram passivamente na pele através da matriz lipídica do estrato córneo e partículas em torno de 600 nm penetram profundamente na pele através dos folículos pilosos (KRISHNAN; MITRAGOTRI, 2020). Em contraste com essas descobertas, não foi observada penetração em nanopartículas fluorescentes de PLGA com um diâmetro de 300 nm (STRACKE et al., 2006). Além disso, contrariando o tamanho máximo mencionado, a penetração cutânea foi registrada para partículas de PLGA com diâmetros variando de 1 a 10 μm (DE JALÓN et al., 2001). Tal incerteza nos mostra a importância de maiores estudos focados no tamanho ideal de nanopartícula para conseguir penetrar na pele.

Outro parâmetro relevante relacionado ao tamanho das partículas é o índice de polidispersão (PDI). Esse índice reflete a uniformidade na distribuição dos tamanhos das nanopartículas em um sistema. Um valor de PDI próximo a 0 sugere que o sistema possui uma distribuição de tamanho mais uniforme, enquanto valores próximos a 1 indicam uma distribuição mais ampla. Em termos ideais, busca-se valores próximos a zero, o que garante uma penetração cutânea uniforme. No caso da formulação apresentada, os valores de PDI foram medidos em $0,11 \pm 0,05$, o que é considerado um resultado excelente, indicando uma distribuição homogênea de tamanhos das nanopartículas na formulação. A obtenção de um valor de PDI baixo, pode ser atribuída à cuidadosa otimização da relação entre PVA e PCL, conforme discutido anteriormente, juntamente com a aplicação consistente do ultrassom em condições ótimas. Nossos resultados estão em concordância com um estudo anterior conduzido por Cannavà et al., (2016), em que o AM foi encapsulado em nanoesferas à base de PLGA, juntamente com uma ciclodextrina anfifílica não iônica (SC6OH) como componente adicional, e obtiveram valores de PDI bastante baixos, com um mínimo de 0,19 (CANNAVÀ et al., 2016).

Com relação a eficiência de encapsulação de AM, o alto aprisionamento nas nanopartículas pode ser explicado pela provável formação de nanocápsulas durante o processo de síntese. Essas nanocápsulas têm uma estrutura núcleo-casca bem definida, o que aumenta a eficiência de encapsulação do fármaco no núcleo. O azul de metileno, por sua vez, solubilizou-se na fase aquosa interna e foi revestido pela camada de polímero, proporcionando proteção contra fatores mecânicos, físicos e químicos que poderiam degradá-lo. Para comprovar essa hipótese, a microscopia eletrônica de transmissão pode ser utilizada. Além disso, estudos anteriores relatam que o método de dupla emulsificação-*evaporação* de solvente normalmente alcança uma eficiência média de encapsulamento de fármacos entre 65% e 75%, o que está em concordância com os resultados deste estudo (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010). Um estudo prévio obteve uma eficiência de encapsulamento de $56,2\% \pm 3,2\%$ para o azul de

metileno em nanopartículas de fosfato de cálcio, as quais foram utilizadas em terapia fotodinâmica (SEONG e KIM, 2015). Em adição, especificamente para terapia fotodinâmica do câncer de pele, Pivetta et al., 2022 desenvolveram lipossomas carregando AM e obtiveram EE% variando entre 63,1 e 85,9%, para diferentes composições lipídicas (PIVETTA et al., 2022). Isso sugere que diferentes sistemas de entrega têm a capacidade de encapsular eficazmente o azul de metileno para aplicação na terapia fotodinâmica.

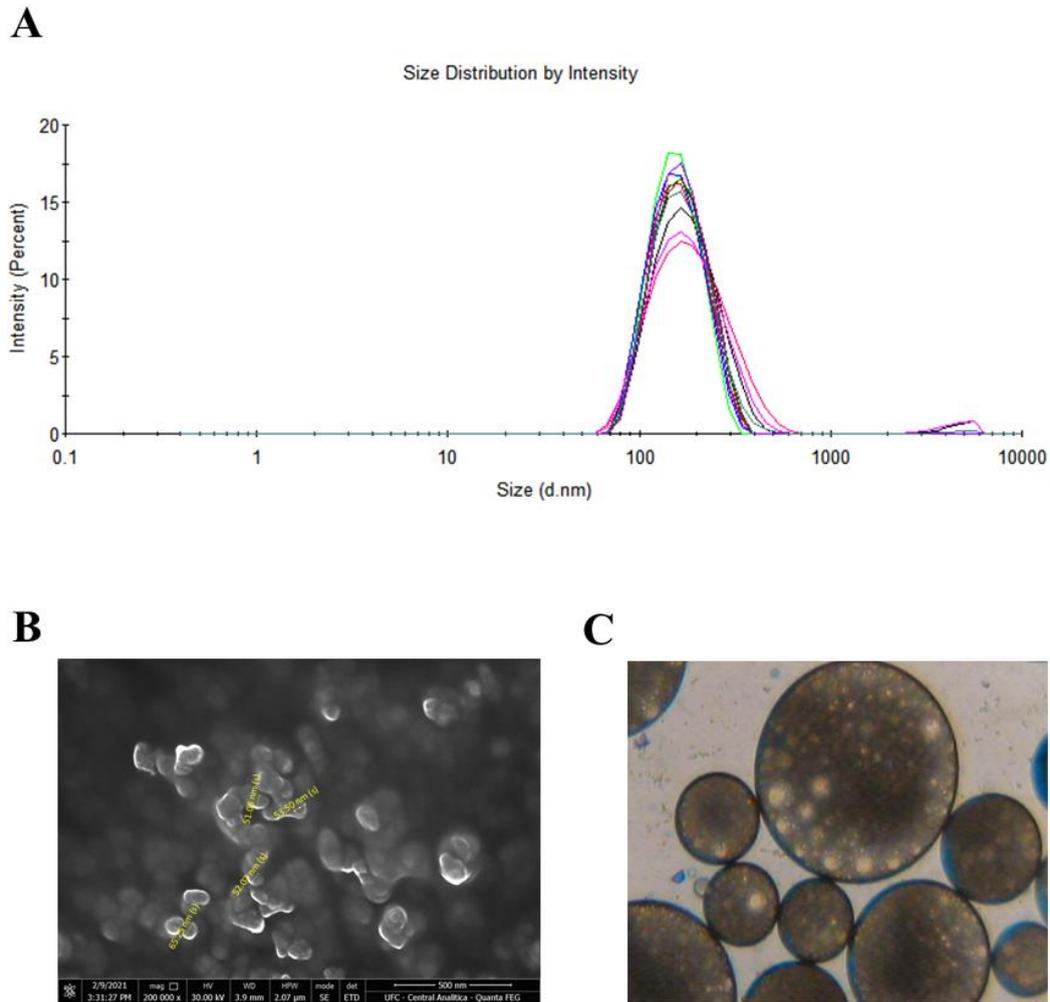
O potencial zeta é um parâmetro que oferece informações sobre a carga elétrica das partículas em solução e ajuda a descrever sua estabilidade em um sistema coloidal. Na literatura, partículas que não se encontram nesse range entre + 30 mV/-30 mV são consideradas estáveis (DUMAN; TUNÇ, 2009). Entretanto, é importante ressaltar que esses valores podem variar dependendo das características físico-químicas dos componentes utilizados na preparação das nanopartículas, bem como do pH, concentração, força iônica da solução e da natureza dos ligantes de superfície. Ainda, a estrutura química do polímero utilizado e o agente estabilizante são os parâmetros governantes do potencial zeta das partículas poliméricas. Neste estudo, as nanopartículas apresentaram valores negativos em todas as medições, com uma média de -4,73 mV. Isso ocorreu principalmente devido à presença dos grupos carboxílicos terminais existentes no PCL. Essa tendência de potencial zeta negativo ao utilizar PCL já foi observada em outros estudos, como o conduzido por Badri et al., (2017) no qual os valores encontrados variaram de -6,51 mV a -7,0 mV. Além disso, neste estudo, os autores observaram uma relação inversamente proporcional entre a concentração de PVA e o potencial zeta. Isso significa que o potencial zeta diminuiu de -7,38 mV para -4,45 mV ao aumentar a concentração do tensoativo de 2,5 mg/ml para 20,0 mg/ml. Essa mudança está relacionada à adsorção de PVA na superfície de nanopartículas baseadas em PCL que reduzem o número de cargas negativas. Essa relação pode explicar por que o potencial zeta das nanopartículas de AM não atingiu valores maiores que -30 mV (BADRI et al., 2017).

É importante destacar que, embora o potencial zeta forneça informações sobre a estabilidade do coloide, ele não é o único fator determinante. A estabilidade do sistema coloidal depende das forças de atração de van der Waals e das forças repulsivas eletrostáticas. O potencial zeta fornece informações apenas sobre essas forças repulsivas eletrostáticas, e é possível encontrar coloides estáveis mesmo com valores relativamente baixos de potencial zeta (BHATTACHARJEE, 2016; CRUCHO e BARROS, 2017).

5.2 Avaliação da morfologia das nanopartículas por microscopia eletrônica de varredura

A análise da morfologia das nanopartículas foi realizada por meio de microscopia eletrônica de varredura (SEM), uma técnica que permite examinar a forma, morfologia da superfície e tamanho desses nanocarreadores. Os resultados demonstram as nanopartículas com o formato de esfera como morfologia predominante e tamanhos menores que 100 nm (figura 11 (b)), o que está em acordo com um estudo feito por Klepac-ceraj et al., (2011) que evidenciou o formato esférico de nanopartículas poliméricas contendo azul de metileno para terapia fotodinâmica em bactérias da placa dentária. Já a figura 11 (a) exhibe os detalhes da medição do tamanho e o gráfico de distribuição realizados por Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS). Os valores encontrados em MEV são menores que os relatados no gráfico de distribuição de partícula realizados por DLS, isso pode ser explicado devido ao agrupamento das NPs. Ademais, é importante destacar que o tamanho das partículas medido por diferentes técnicas pode variar devido às propriedades físicas e ao método de medição. O diâmetro hidrodinâmico obtido por DLS tende a ser maior do que o tamanho real das partículas, pois reflete a interação das partículas com as moléculas de solvente ao seu redor, enquanto a MEV fornece uma visualização direta das partículas, geralmente em condições de vácuo. Ambas as técnicas são úteis para caracterizar as partículas, e a escolha depende dos objetivos da análise (CRUCHO; BARROS, 2017). Foi possível também documentar, por microscopia óptica, a formação da emulsão dupla (A/O/A) antes da evaporação do solvente orgânico, conforme ilustrado na figura 11 (c). Essa etapa do processo revelou a presença de múltiplas emulsões, onde as gotículas internas eram compostas pela fase aquosa contendo o azul de metileno. Concluindo, esses achados confirmam a bem-sucedida produção das nanopartículas poliméricas.

Figura 11. Gráfico de distribuição de tamanho de partícula através de DLS (A), imagem das nanopartículas contendo AM por microscopia eletrônica de varredura (B), observação por microscopia óptica da emulsão dupla durante o processo de preparo da formulação (C).

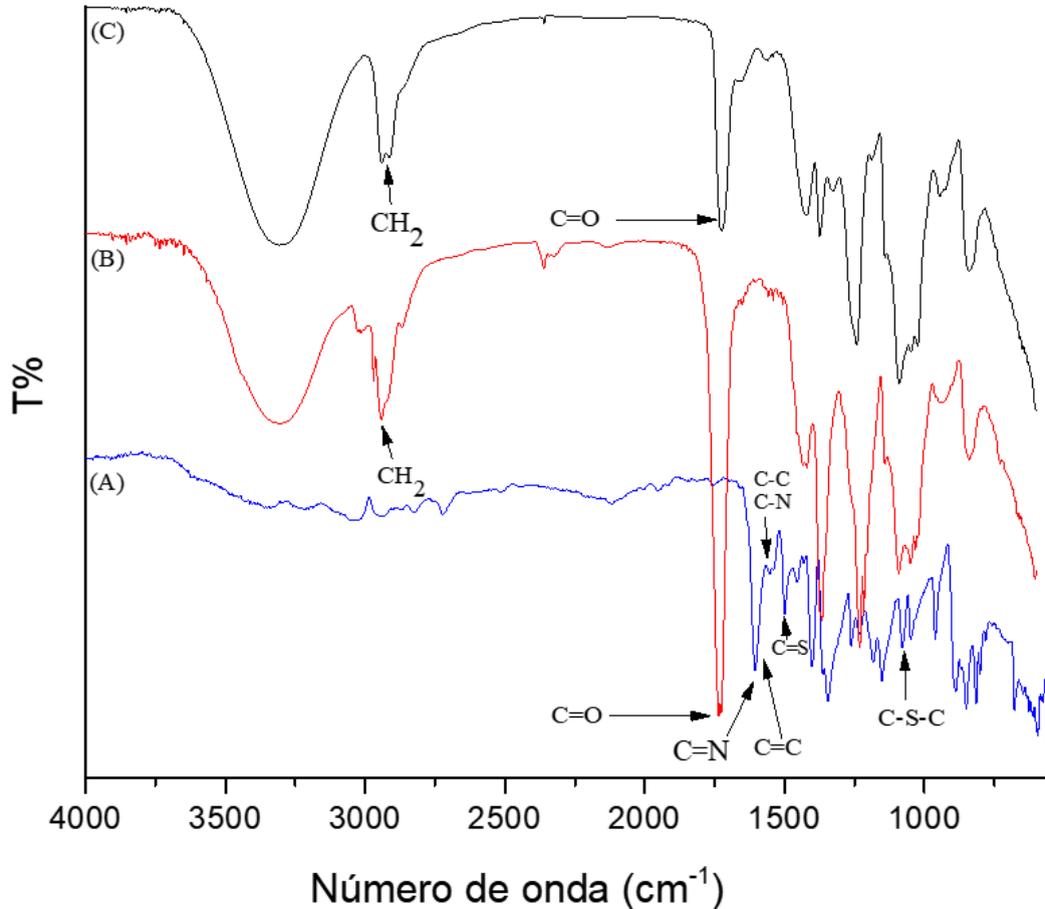


Fonte: Elaborado pelo autor.

5.3 Análise de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

As nanopartículas contendo AM liofilizadas foram caracterizadas em relação à espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), em comparação com a nanopartícula branca e o AM puro. A análise por FTIR desempenha um papel crucial na identificação dos grupos químicos presentes tanto no fármaco quanto no carreador. Além disso, essa técnica pode revelar interações intermoleculares por meio de alterações nos picos espectrais.

Figura 12. Espectro de FTIR de 4000 a 600 cm^{-1} do AM em pó (a), nanopartícula contendo AM (b) e nanopartícula branco (c).



Fonte: Elaborado pelo autor

Os espectros de AM mostraram bandas características a serem discutidos. A banda intensa em 1600-1619 cm^{-1} corresponde às vibrações C=N e C=C do anel heterocíclico. As duas bandas pronunciadas em 1555 e 1537 cm^{-1} correspondem às vibrações C-N e C-C do mesmo anel. Além disso, as bandas 1499 cm^{-1} e 1345 cm^{-1} correspondem às vibrações características do grupo C=S e de estiramento dos grupos dimetilamino saturados terminais C-N . Ainda, vibrações C-S-C do heterociclo são encontradas em 1083 cm^{-1} . Por fim, há um padrão espectral complexo na região de 1200–800 cm^{-1} . Parece que essa região inclui as bandas de absorção de IR de C-S-C e C-H (OVCHINNIKOV et al., 2016). Tais achados são semelhantes aos estudos conduzidos por Cannavà et al., 2016 e Farmoudeh et al., 2022 que encontraram bandas equivalentes (CANNAVÀ et al., 2016; FARMOUDEH et al., 2022).

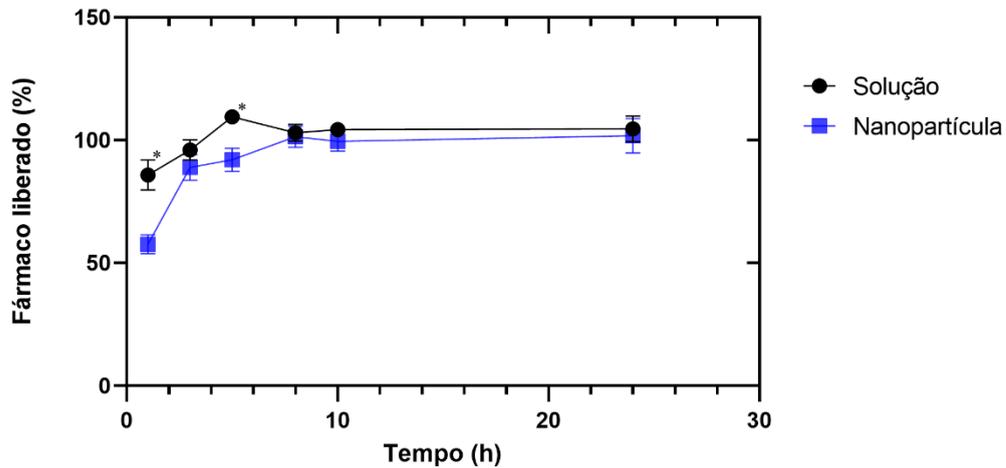
Com relação aos espectros da nanopartícula branco (nano-BR) e nanopartícula contendo AM (nano-AM) nota-se um pico característico identificado em 3307 cm^{-1} , que corresponde à vibração de estiramento devido aos grupos O-H. Porém, as bandas mais notáveis são relacionados ao PCL sendo possível detectar bandas fortes, como o estiramento da carbonila, próximo a 1735 cm^{-1} e bandas em $2942\text{--}2901\text{ cm}^{-1}$ correspondente ao CH_2 , 1244 cm^{-1} referente ao alongamento assimétrico do C – O – C (SANNA et al., 2013).

Conforme ilustrado na Figura 12, os espectros da nano-BR e nano-AM são praticamente idênticos, o que impossibilitou a observação das bandas atribuídas ao fármaco. Essa semelhança nos espectros sugere que o fármaco está completamente encapsulado nas nanopartículas, sem contribuir significativamente para as bandas espectrais observadas. Essa ausência de bandas relacionadas ao fármaco é um fenômeno observado em outras pesquisas, como no estudo de Cavalcante de Freitas et al., 2023, que ao encapsular resveratrol (RSV) em nanopartículas de PCL também notaram a quase total ausência de bandas espectrais do RSV, atribuindo isso ao encapsulamento completo. Eloy et al., (2020) também obtiveram resultados semelhantes ao encapsular docetaxel em imunolipossomas, onde os espectros das nanopartículas com e sem fármaco eram similares, e curiosamente a formulação ideal obteve uma alta encapsulação, com EE% de 99,95% (CAVALCANTE DE FREITAS et al., 2023; ELOY et al., 2020).

5.4 Liberação *in vitro*

O estudo de liberação *in vitro* teve como objetivo comparar os perfis de liberação da solução aquosa de azul de metileno e da formulação otimizada da nanopartícula. O mecanismo de liberação é caracterizado por um burst inicial, ou seja, uma rápida liberação do fármaco no meio, tanto para o grupo solução quanto para a nanopartícula. Embora estudos de liberação *in vitro* com nanopartículas de azul de metileno sejam escassos na literatura, Gutiérrez-Valenzuela et al., 2018 trabalhando com diversas concentrações de AM, já demonstraram que o perfil de liberação desse fármaco tende a ser mais rápido (GUTIÉRREZ-VALENZUELA et al., 2018).

Figura 13. Perfil de liberação *in vitro* comparando solução e nanopartícula de azul de metileno pelo método passivo.



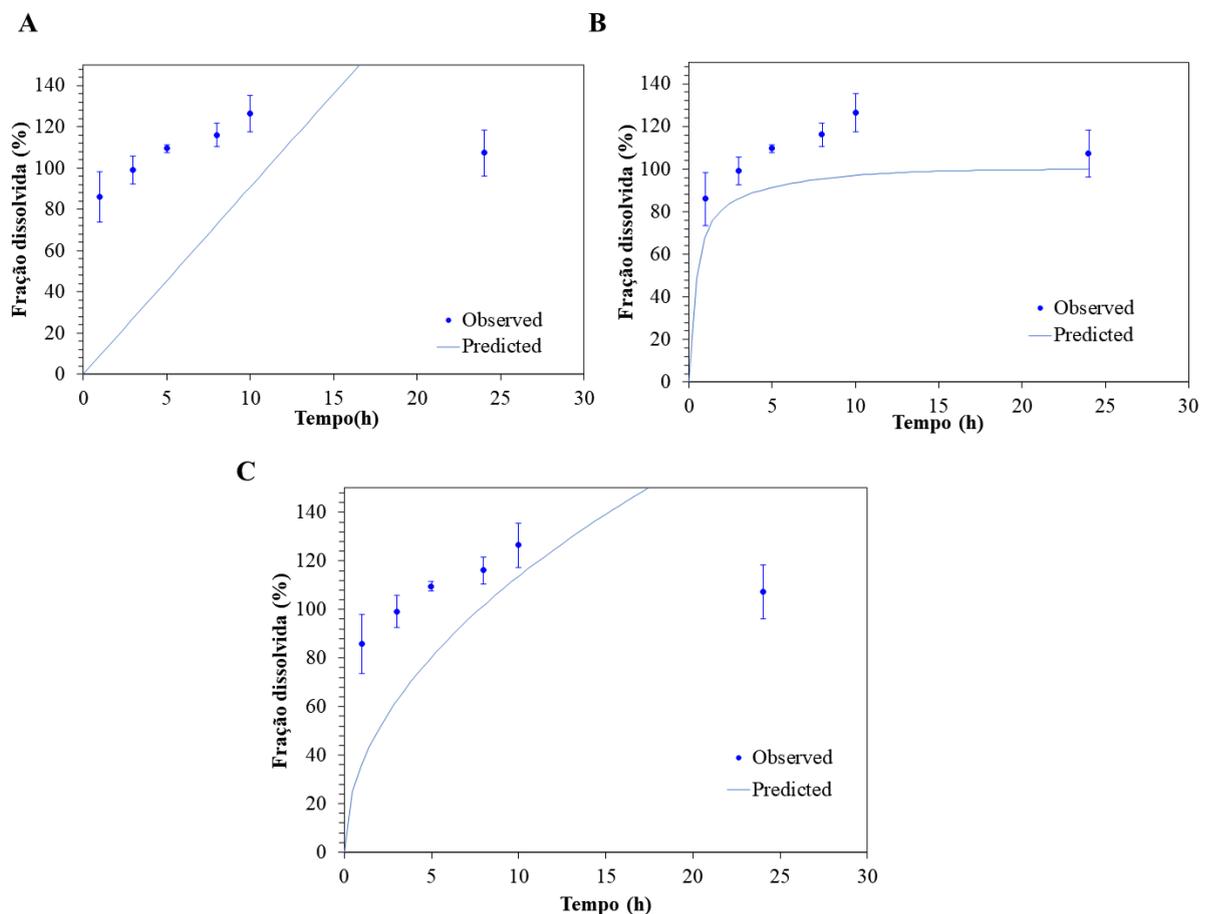
Fonte: Elaborado pelo autor.

Conforme mostra a figura 13, na primeira hora observa-se uma liberação média de 85,88% para a solução, indicando assim que a liberação do AM pela solução é quase imediata, devido à natureza hidrofílica do fármaco. A nanopartícula é capaz de reter o fármaco de forma um pouco mais eficaz, com valores de liberação do fármaco de 57,67%. Com base na hidrofiliabilidade do AM e no seu pequeno tamanho, espera-se que este possa “escapar” da nanopartícula e acumular-se na fase aquosa da formulação, aumentando a sua liberação inicial. Outra hipótese seria a ocorrência de nanoencapsulação próximo à superfície das NPs. Após isso, entre o intervalo de 8 a 24 horas, foi observado um platô, possivelmente indicando que todo o AM foi liberado, para ambos os grupos. Para a nanopartícula, isso pode ser explicado pela difusão do AM através do polímero. Para a solução foi observado um aumento nos valores da porcentagem de AM liberado em função do tempo, com leve queda após o ponto de 5 h. Foi possível observar diferença estatisticamente significativa entre a solução e a nanopartícula nos tempos de 1 h e 5 h ($p < 0,05$), ressaltando assim que embora a nanopartícula também tenha uma liberação pronunciada, ela ainda é capaz de modular e prolongar o meia-vida do fármaco e potencialmente reduzir seus efeitos colaterais, principalmente nas primeiras horas.

Os dados experimentais de liberação relativos à solução e nanopartícula de AM foram analisados por modelos matemáticos para tentar prever o comportamento do fármaco no organismo. Para analisar um ajuste ótimo do modelo *in vitro* ao modelo matemático alguns parâmetros fornecidos pelo DDSolver devem ser discutidos. O coeficiente de determinação (R^2)

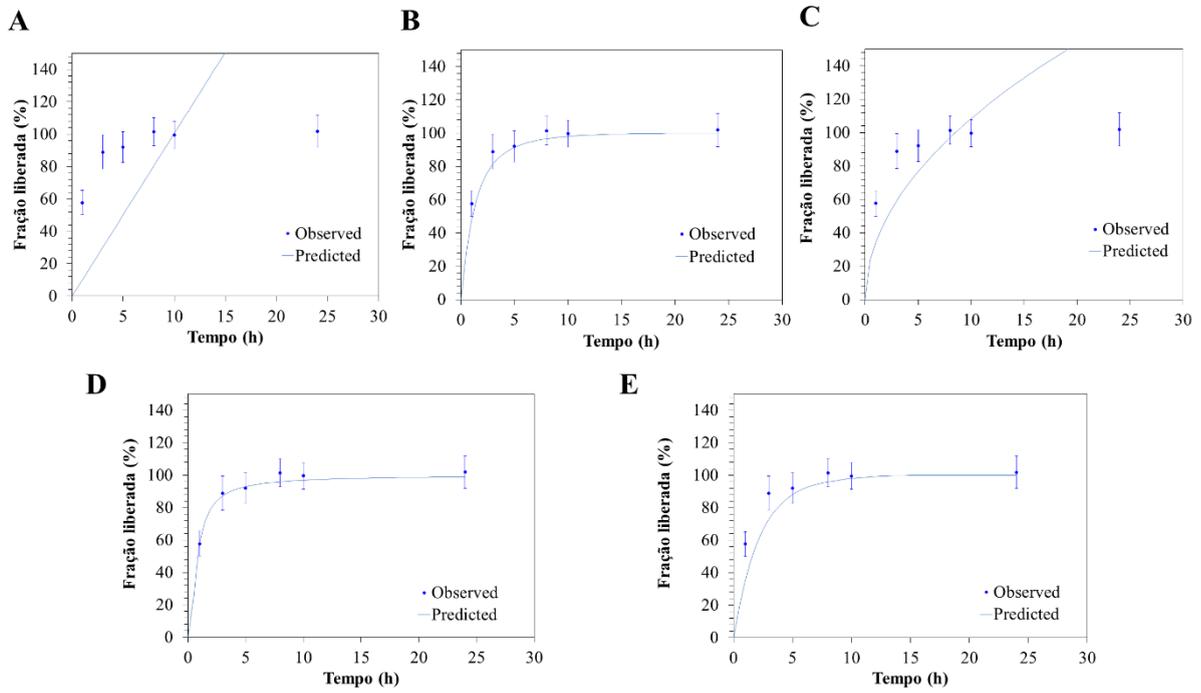
indica qual modelo matemático mais se adequa e deve ser o mais próximo de 1 possível. Além disso, ao comparar dois ou mais modelos, o Critério de Seleção de Modelo (MSC) desempenha um papel crucial na escolha do modelo ideal. Geralmente, o modelo com o MSC mais alto é considerado o melhor. Esse critério leva em consideração vários fatores, como a complexidade do modelo e a qualidade do ajuste aos dados. Portanto, um MSC maior indica que o modelo fornece um ajuste adequado aos dados sem ser excessivamente complexo. Isso ajuda a evitar o *overfitting*, no qual o modelo se ajusta muito bem aos dados de treinamento, mas não generaliza bem para novos dados (ZHANG et al., 2010). Os parâmetros e o gráfico do estudo da cinética de liberação são apresentados na figura 14 e 15 e na tabela 3.

Figura 14. Gráfico contemplando a modelagem de dados de dissolução da solução nos modelos de ordem zero (a), primeira ordem (b) e Higuchi (c).



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 15. Gráfico contemplando a modelagem de dados de dissolução da nanopartícula nos modelos de ordem zero (a), primeira ordem (b), Higuchi (c), Weibull (d) e Hopfenberg (e).



Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 3. Valores do coeficiente de determinação (R^2) e MSC obtidos de acordo com modelos matemáticos fornecidos pelo software DDSolver para solução e nanopartícula contendo AM.

Modelo	Solução		Nanopartícula	
	R^2	MSC	R^2	MSC
Ordem zero	0,5	-3,34	0,75	-2,34
Primeira ordem	0,71	-1,11	0,97	0,99
Hopfenberg	-	-	0,94	-0,23
Higuchi	0,62	-2,21	0,85	-0,99
Weibull	-	-	0,96	0,81

Fonte: Elaborado pelo autor.

Dada a relação obtida a partir dos valores percentuais de liberação de AM em função do

tempo, o modelo de primeira ordem se destacou como o mais apropriado para as nanopartículas, apresentando um coeficiente de correlação (R^2) de 0,97. Além disso, esse modelo também obteve o maior valor de Critério de Seleção de Modelo (MSC), o que o torna a escolha mais adequada entre os modelos testados. O modelo de primeira ordem refere-se a um sistema, cuja taxa de liberação é função apenas da concentração de fármaco remanescente, como agentes ativos solúveis incorporados em uma matriz porosa, em que a quantidade de fármaco liberada é proporcional à quantidade de fármaco remanescente na matriz, que dialoga diretamente com o nanocarreador polimérico desenvolvido neste estudo e a natureza hidrofílica do AM (BRUSCHI, 2015).

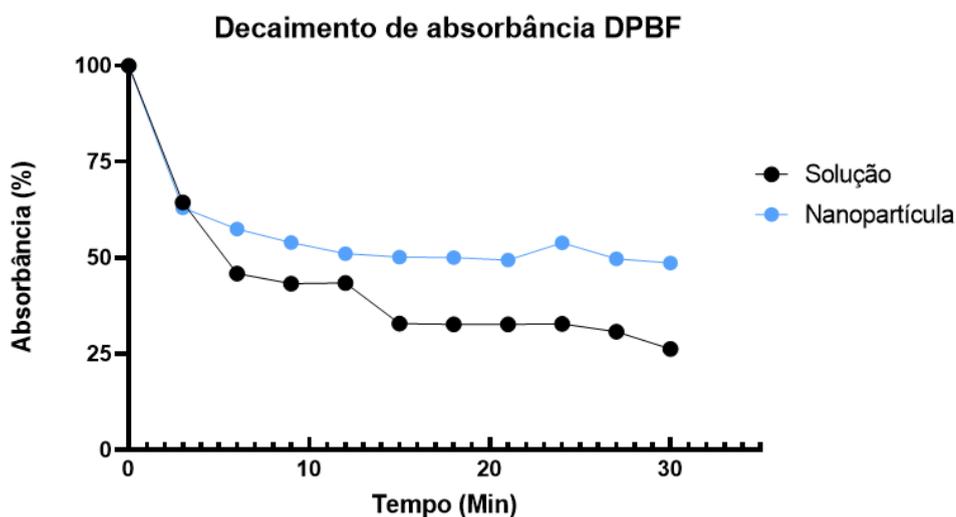
Estudos prévios de encapsulação de AM em nanopartículas de PLGA já relataram esse perfil de liberação rápida, como Cannavà et al., 2016 que obtiveram liberação total de MB em 24 h em nanopartículas não associadas à ciclodextrina anfifílica não iônica (SC6OH). Trabalhando com o mesmo polímero e combinando técnicas de emulsificação simples e dupla, Gutiérrez-Valenzuela et al., 2018 obtiveram liberação acima de 80% de AM nas primeiras 4 h para todas as formulações testadas (CANNAVÀ et al., 2016; GUTIÉRREZ-VALENZUELA et al., 2018).

Na análise da solução de azul de metileno, os coeficientes de correlação não atenderam aos critérios de aceitação, e os valores negativos do Critério de Seleção de Modelo (MSC) indicam que nenhum dos modelos matemáticos testados se ajustou adequadamente aos dados, abrindo possibilidades de pesquisas de outros modelos não contemplados nesse estudo ou ainda um modelo híbrido, onde há a combinação de dois modelos para explicar melhor o comportamento cinético.

5.5 Geração de espécies reativas de oxigênio

A geração de espécies reativas de oxigênio pelo azul de metileno foi estudada pelo decaimento de absorvância do DPBF. Em ambientes ricos em EROs, particularmente na presença de oxigênio singlete, o DPBF pode reagir quantitativamente com $^1\text{O}_2$ para formar o-dibenzoilbenzeno, perdendo assim sua capacidade de absorver ou emitir luz visível na banda analisada (ZHANG; LI, 2011). O azul de metileno é amplamente utilizado na literatura como fotossensibilizador padrão para calcular o rendimento quântico de outras substâncias, de forma que sua produção de EROs seja suficientemente conhecida. Ainda, na terapia fotodinâmica, a substância a ser utilizada como fotossensibilizador deve gerar EROs de forma satisfatória, mas não de forma exacerbada que possa danificar as células sadias (MOHSENI et al., 2022; ZHANG et al., 2021; ZHANG; LI, 2011).

Figura 16. Estudo do decaimento da absorvância de DPBF na presença da solução e nanopartícula azul de metileno, com irradiação (630 nm, 6,7 J/cm², 0,001841 W/cm²) em intervalos de tempo de 3 min, até 30 min de irradiação luminosa.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Aqui, um perfil de decaimento de absorvância de DPBF semelhante foi observado entre a solução e nanopartícula, nos primeiros 3 minutos (figura 16). A velocidade de produção de

EROs pela nanopartícula neste período pode ser explicada pelo AM não encapsulado. Após este tempo, a nanopartícula apresenta menor influência no decaimento da absorbância, o que pode inferir uma geração de EROs mais gradual e menos pronunciada que a solução, resultado que é esperado visto que o AM é encapsulado em uma matriz polimérica. No entanto, deve-se notar que o encapsulamento não afetou a geração de EROs. Ao final de 30 minutos de irradiação, o DPBF apresentou uma absorbância de cerca de 48,67% em relação à absorbância inicial para a nanopartícula e 26,31% para a solução. Curiosamente, para obter a curva de decaimento do DPBF com a solução, ela precisou ser concentrada cerca de 3 vezes, com concentração final de 240 µg/mL, contrastando com os 80 µg/mL da nanopartícula. Esse achado pode revelar um maior potencial da nanopartícula, que, além de uma geração mais controlada de EROs, requer uma quantidade menor de AM para agir de forma semelhante à solução. Seong e Kim (2015), trabalhando com AM encapsulado em nanopartículas de fosfato de cálcio, obtiveram resultados semelhantes, onde a nanopartícula obteve uma geração de EROs mais controlada em comparação com a solução quando dispersa em N,N-dimetilformamida (SEONG; KIM, 2015). Uma observação semelhante foi relatada por outro estudo, onde nanoconchas de ouro contendo azul de metileno exibiram uma produção de EROs significativamente maior do que a solução AM (MOHSENI et al., 2022).

5.6 Avaliação de penetração cutânea de AM em solução ou nanopartículas de forma passiva ou com aplicação de sonoforese

Primeiramente, para quantificação de AM em pele utilizou-se a espectrofotometria UV-vis. Foi realizada uma varredura espectral da solução de AM em metanol bem como de amostras de pele sem e com aplicação de AM extraídas em metanol para verificar se os componentes da pele interferiam na quantificação. Os resultados demonstram que na região entre 570 a 670 nm não há interferentes da pele que possam prejudicar a quantificação de AM, visto que proteínas e outros componentes teciduais têm seu pico de absorbância entre 200 e 300 nm (Figura 17).

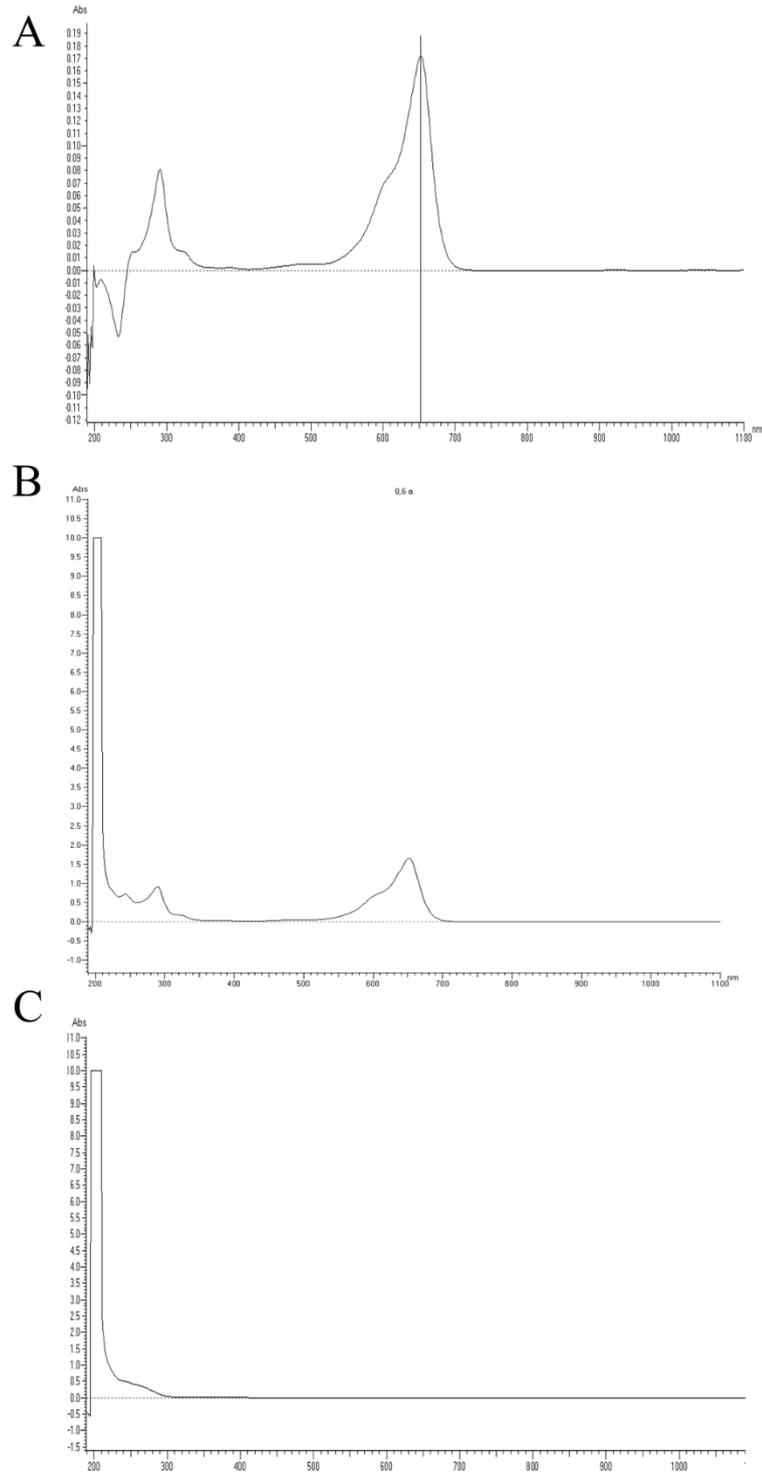
Para verificar a sensibilidade da técnica de quantificação, foi medido seu percentual de recuperação através da contaminação da pele com concentrações conhecidas de AM, seguida pela sua extração com metanol. Os resultados mostraram uma recuperação média de 96,92% (tabela 4).

Tabela 4. Recuperação (%) de AM em pele de orelha de suíno através da extração com metanol

Concentração ($\mu\text{g/ml}$)	Recuperação (%)
0,6	98,03
0,8	90,45
1	101,79
3	98,97
5	104,06
6,5	94,45
8	90,68

Fonte: Elaborado pelo autor.

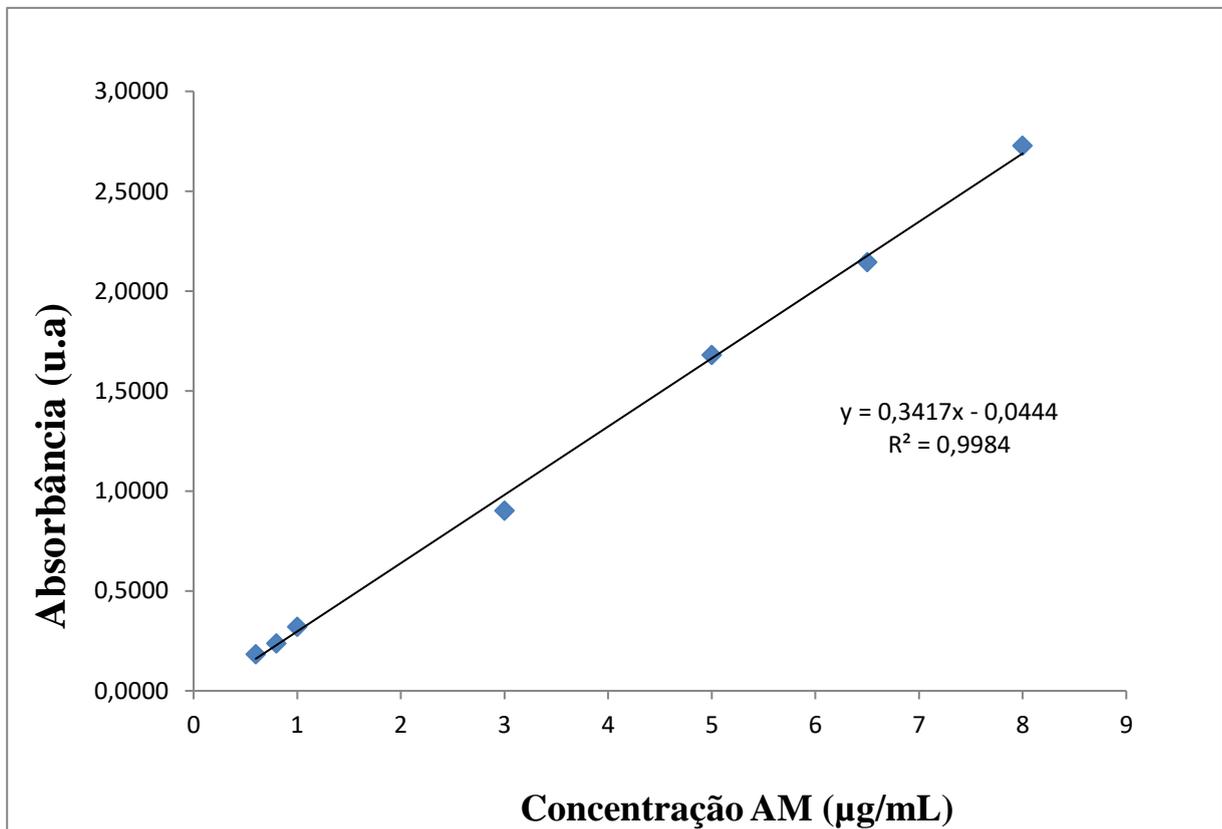
Figura 17. Varredura espectral realizada da solução de AM em metanol (a), em amostras de pele extraídas com metanol com (b) e sem aplicação de AM (c) para análise de interferentes teciduais.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Os resultados deste estudo de extração de AM foram representados graficamente (concentração de AM vs. absorbância), apresentando uma resposta linear com um coeficiente de correlação linear de 0,9984. Essa curva foi empregada para quantificar o AM retido nos estratos da pele, tanto com quanto sem a aplicação de sonoforese (figura 18).

Figura 18. Gráfico da curva de calibração analisada em espectrofotômetro UV-Vis para desenvolvimento do método analítico de quantificação de AM na pele.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Sabe-se que as formulações tópicas são limitadas pela baixa permeabilidade cutânea. Especificamente, o estrato córneo, camada mais externa da pele, que atua como barreira ao ambiente externo. Neste contexto, a medição da resistividade é um parâmetro importante para inferir a penetração de substâncias na pele, uma vez que valores baixos significam alguma alteração estrutural, facilitando este processo (CRISÓSTOMO et al., 2022; OGURA; PALIWAL; MITRAGOTRI, 2008). Aqui, os valores de resistividade obtidos sem aplicação de sonoforese são próximos de $85,94 \text{ k}\Omega \text{ cm}^2$, o que indica preservação da estrutura da pele. Ao utilizar o ultrassom como pré-tratamento, a resistividade caiu para aproximadamente $1 \text{ k}\Omega \text{ cm}^2$, indicando defeitos estruturais nas regiões lipídicas do estrato córneo.

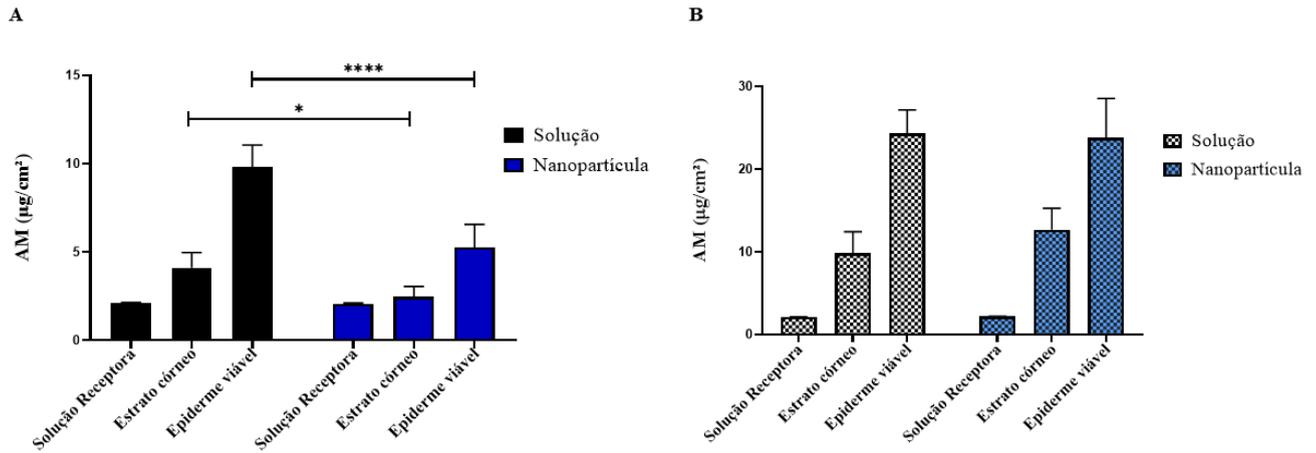
A Figura 19 e a tabela 5 demonstram a quantificação do AM no estrato córneo e na epiderme viável após 16h de estudo com penetração passiva e aplicação de sonoforese. A quantidade de AM permeado na fase receptora ficou abaixo do limite de quantificação do método, sugerindo um transporte transdérmico muito baixo. Na penetração passiva do AM, há superioridade da solução em relação à nanopartícula, tanto no estrato córneo quanto na epiderme viável, com valores de $4,10 \pm 0,87$, $9,81 \pm 1,24$, $2,46 \pm 0,59$ e $5,27 \pm 1,29$ $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, respectivamente. Sabe-se que a natureza hidrofílica deste fármaco não favorece o transporte através do EC lipídico, o que acaba dificultando a penetração na pele. Além disso, o uso de nanopartículas poliméricas tópicas é menos difundido do que sistemas lipídicos, como os lipossomas, onde a penetração de nanopartículas poliméricas intactas através da barreira do estrato córneo é improvável (BOLZINGER et al., 2012; CAMPBELL et al., 2012; ELMOWAFY, 2021).

Tabela 5. Quantificação do AM em solução e nanopartícula polimérica em estrato córneo (EC) e epiderme viável e derme (EV + D) sem ou com aplicação de sonoforese de pele de orelha de suíno após estudo de penetração por 16h e suas respectivas porcentagens de coeficientes de variação.

	Estrato Córneo ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	Passivo		Estrato Córneo ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	Sonoforese	
		Epiderme Viável + Derme ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	Receptor		Epiderme Viável + Derme ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	Receptor
Solução	$4,10 \pm 21,23$	$9,81 \pm 12,70$	<LQ	$9,85 \pm 26,47$	$24,30 \pm 11,87$	<LQ
Nanopartícula	$2,46 \pm 24,04$	$5,27 \pm 24,62$	<LQ	$12,71 \pm 20,13$	$23,80 \pm 20,07$	<LQ

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 19. Representação gráfica da quantificação de AM em solução e nanopartículas no estrato córneo e epiderme viável sem (a) ou com aplicação de sonoforese (b) em pele de orelha suína após estudo de penetração por 16 h. * $p < 0,05$; **** $p < 0,0001$.



Fonte: Elaborado pelo autor.

No geral, a sonoforese é um método físico conhecido por melhorar a administração de medicamentos tanto por via tópica como transdérmica. Porém, os mecanismos promovidos pela energia ultrassônica ainda são discutidos na literatura. Cavitação, efeitos térmicos e mecanismos relacionados à convecção parecem ser a forma mais comum de aumentar a penetração na pele (YUAN et al., 2022). Aqui, ao utilizá-lo como pré-tratamento, a quantidade de AM atingiu maiores níveis de penetração na pele, apresentando valores de $9,85 \pm 2,60$, $24,30 \pm 2,88$ para a solução e $12,71 \pm 2,55$, $23,80 \pm 4,77 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ para a nanopartícula, no estrato córneo e na epiderme viável, respectivamente. No que diz respeito às nanopartículas, este aumento foi ainda mais significativo quando comparado com a penetração passiva. Por exemplo, para o grupo solução, a penetração do AM na pele foi, respectivamente, $9,81 \pm 1,24$ e $24,30 \pm 2,88 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ na epiderme viável antes e após a aplicação da sonoforese. Comparando diretamente esses valores, obtemos um aumento na penetração na pele de aproximadamente 2,47 vezes. Já a nanopartícula levou à penetração do AM de $5,27 \pm 1,29$ e $23,80 \pm 4,77 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, respectivamente na epiderme viável antes e após a aplicação da sonoforese, o que significa um aumento de 4,51 vezes, o que se torna interessante porque é nesta camada que podemos encontrar tumores de SCC. Se estendermos a análise ao estrato córneo, veremos uma diferença ainda maior de 2,4 contra 5,16 vezes para os mesmos grupos. Além disso, uma alternativa para melhorar ainda mais o desempenho da nanopartícula seria a sua incorporação em uma matriz

de gel, aumentando assim o tempo de contato entre a formulação e a pele. A penetração da nanopartícula na pele é semelhante à da solução quando associada à sonoforese, conforme Figura 7b, sem diferença estatística significativa.

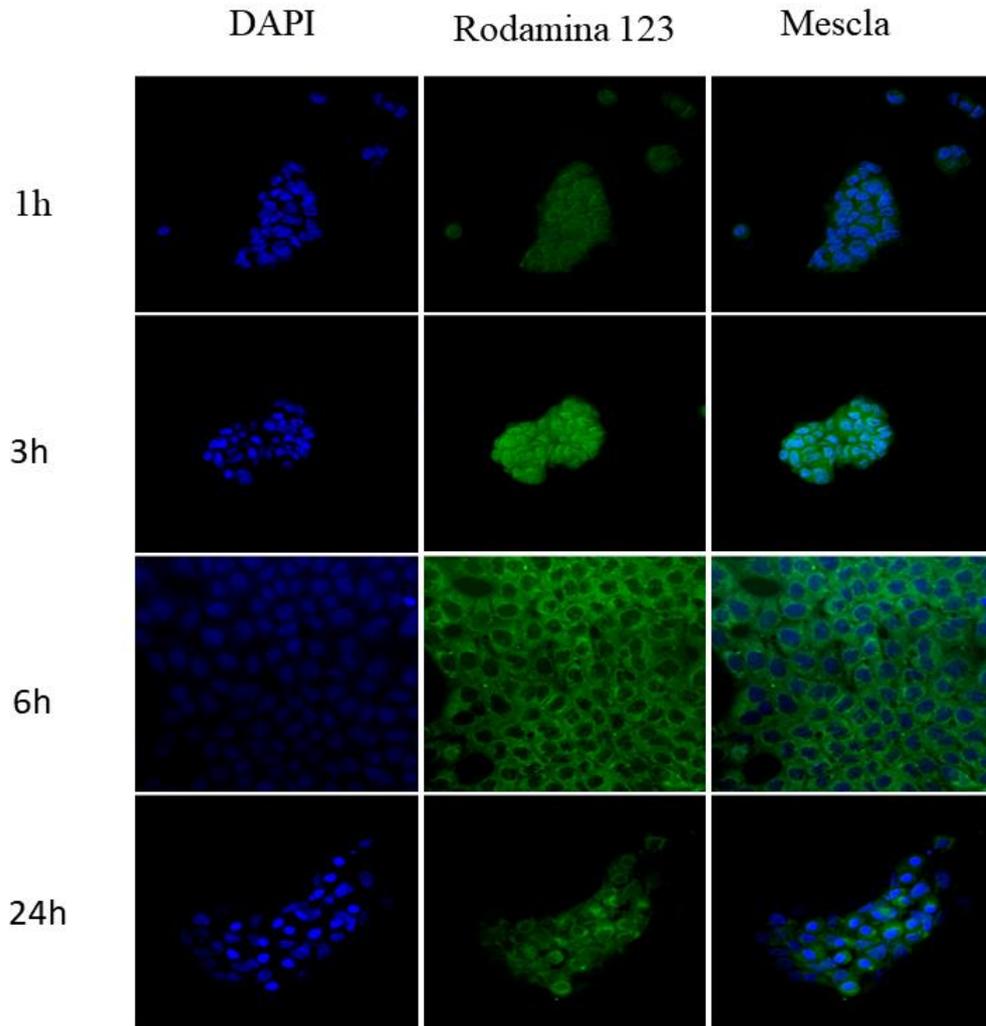
Embora haja uma escassez de estudos sobre a aplicação do AM e o uso de métodos físicos na penetração cutânea, um estudo conduzido por Johnson et al. forneceu evidências interessantes. Eles demonstraram que a iontoforese, aumentou o transporte de AM na camada epidérmica. Em um experimento específico, quando a pulsação foi ajustada para 3600 Vs, o corante conseguiu atravessar a camada córnea. Em doses mais elevadas de 7200 Vs, o AM penetrou tanto no EC quanto na epiderme. Finalmente, com pulsação a 14.400 Vs, observou-se a migração do AM através da camada córnea, uma alta concentração do corante na epiderme e até mesmo algum AM aparecendo na derme (JOHNSON et al., 1998)

Aqui, a combinação de sonoforese e nanotecnologia mostrou-se eficiente. Enquanto o primeiro provoca alterações na estrutura cutânea, os NPs, devido à sua maior área superficial, acumulam-se em apêndices cutâneos, como os folículos capilares, que podem contornar a formidável barreira do EC. Atualmente o AM tem obtido melhores resultados de penetração quando associado a nanocarreadores, como no estudo de Garcia et al., que ao desenvolver cristais líquidos e comparar as fases cristalinas lamelar e hexagonal, obteve maior entrega cutânea do AM com a fase lamelar, atingindo valores de $9,79 \pm 1,22$ a $15,70 \pm 1,54 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ em 6 h. Trabalhando com outro fotossensibilizador conhecido, o uso da sonoforese aumentou a penetração dérmica da ftalocianina de zinco, resultando na redução da viabilidade das células do melanoma (GARCIA et al., 2018; MARTINS et al., 2020). É importante destacar que, até o momento, não foram encontrados estudos na literatura que descrevam o uso combinado de azul de metileno (seja na forma encapsulada ou livre) e sonoforese. Portanto, este trabalho apresenta um aspecto inovador e pioneiro ao explorar essa combinação de terapias para a penetração cutânea do azul de metileno.

5.7 Captação Celular

A microscopia confocal objetiva a observação do mecanismo de captação celular das nanopartículas em diferentes tempos. Neste estudo, a Rodamina 123, um conhecido marcador mitocondrial, foi encapsulado para indicar qualitativamente a captação das nanopartículas pelas células nos tempos monitorados foram 1, 3, 6 e 24 h (Figura 20).

Figura 20. Captação celular das nanopartículas marcadas com Rodamina 123 e DAPI nos tempos 1, 3, 6 e 24 h por microscopia confocal.



Fonte: Elaborado pelo autor.

A observação revela um aumento na captação celular das nanopartículas à medida que o tempo passa, atingindo seu pico entre 3 e 6 horas. Esse aumento na captação celular contribui para explicar o aumento da foto/citotoxicidade observada anteriormente, especialmente quando o tempo de incubação das nanopartículas é estendido para 2 horas.

No entanto, é interessante notar que, próximo às 24 horas, há uma diminuição na fluorescência, sugerindo a possibilidade de degradação das nanopartículas pelas próprias células. Além disso, a observação de que os pontos fluorescentes se acumulam principalmente no citoplasma celular está em conformidade com vários estudos na literatura, nos quais a maioria das nanopartículas utilizadas em terapias contra o câncer tende a se acumular no

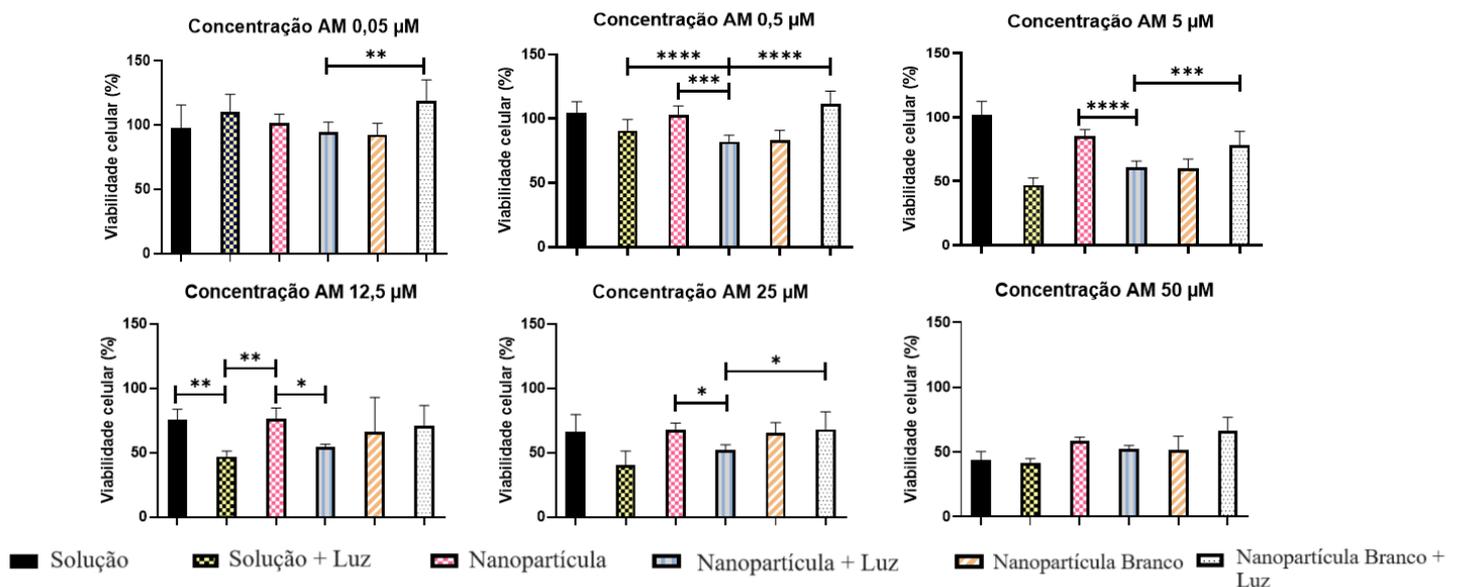
citoplasma das células (JESUS et al., 2018; QIN et al., 2011).

Seong e Kim (2015), encontraram resultados semelhantes trabalhando com AM encapsulado em nanopartículas de fosfato de cálcio, em que as amostras foram incubadas com células humanas de câncer de mama (MCF-7), por 1, 2, 4, 8, 16 e 24 h e exibiram captação celular rápida inicial dentro de 4 h (SEONG; KIM, 2015).

5.8 Avaliação da fotocitotoxicidade in vitro em células de carcinoma epidermóide

A TFD é uma abordagem menos invasiva no tratamento do câncer, e seu efeito pode ser amplificado quando combinada com a proteção do agente fotossensibilizador por meio da nanoencapsulação. As Figuras 21 e 22 demonstram as respectivas viabilidades celulares de cada formulação (solução, nanopartícula-AM e nanopartícula branco) em suas respectivas concentrações e exposição ou não a luz em células A431, com tempo de incubação de 5 min ou 2h. O efeito fototérmico, que está relacionado à exposição à luz, foi considerado insignificante, uma vez que a temperatura não apresentou variação durante a aplicação da TFD.

Figura 21. Viabilidade celular da solução e nanopartícula de azul de metileno e nanopartícula branco, com e sem luz, com tempo de incubação de 5 min. Teste ANOVA one-way com pós-teste de Bonferroni entre os grupos. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

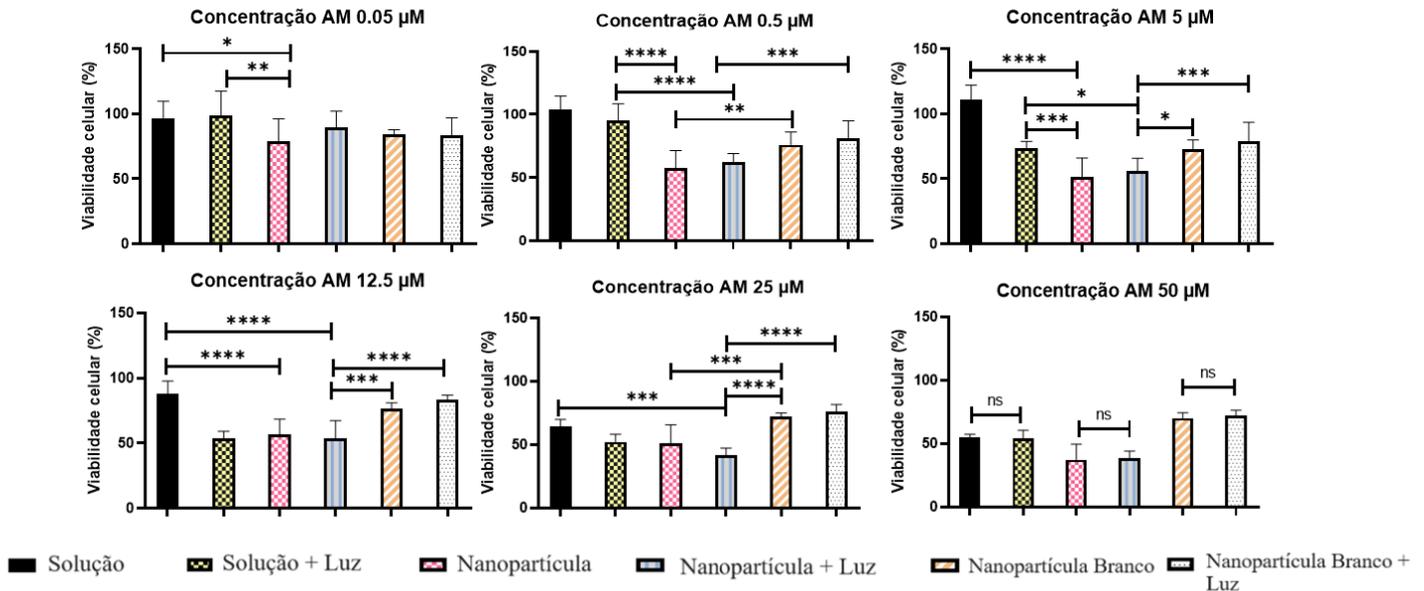


Fonte: Elaborado pelo autor.

Neste contexto, podemos discutir três aspectos principais: o efeito do encapsulamento, a influência do tempo de incubação e o impacto da luz na citotoxicidade do AM. Primeiramente, é importante notar que a citotoxicidade é dependente da concentração em todas as situações testadas. As diferenças estatisticamente significativas entre a solução e as nanopartículas são mais evidentes em concentrações intermediárias, como 0,5 μM , 5 μM , 12,5 μM e 25 μM . No caso do tempo de incubação de 5 minutos, observa-se um comportamento semelhante entre os dois grupos (solução e nanopartícula) na ausência de exposição à luz. As concentrações de AM testadas apresentaram viabilidades celulares de aproximadamente 104,21%, 101,94%, 75,56% e 66,42% para a solução, e 102,98%, 85,40%, 76,48% e 67,50% para as nanopartículas, nas concentrações mencionadas. Isso sugere que o AM tem uma toxicidade mínima no escuro, o que está de acordo com a literatura. Portanto, podemos inferir que a nanoencapsulação não interferiu nos mecanismos de toxicidade do AM nem os amplificou.

Por outro lado, a exposição à luz aumentou a citotoxicidade em ambos os grupos, mas foi mais intensa no grupo da solução. As viabilidades celulares diminuíram para valores de aproximadamente 90,87%, 47,00%, 46,96% e 40,70% para a solução, em comparação com 82,21%, 60,77%, 54,18% e 51,76% para as nanopartículas, nas mesmas concentrações. Quando consideramos apenas o grupo das nanopartículas, a influência da luz foi significativa em todas as concentrações intermediárias, sendo mais pronunciada em 5 μM , onde a viabilidade celular diminuiu de 85,40% para 60,77%. Embora o efeito da luz já fosse esperado pelo gatilho para a produção de espécies reativas de oxigênio, a performance negativa da nanopartícula frente a solução pode ser explicada pelo seu tempo reduzido de contato com a célula. Para avaliar essa hipótese os testes foram repetidos simulando as condições anteriores, alterando apenas o tempo de incubação dos tratamentos para 2 horas.

Figura 22. Viabilidade celular da solução e nanopartícula de azul de metileno e nanopartícula branco, com e sem luz, com tempo de incubação de 2 horas. Teste ANOVA one-way com pós-teste de Bonferroni entre os grupos. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.



Aqui, é notável a manutenção da resposta dose-dependente, como previamente observado, juntamente com o aumento significativo da morte celular devido à exposição à luz em todas as concentrações. No entanto, é relevante destacar que, embora durante esse período de incubação, a influência da luz sobre a fototoxicidade das nanopartículas seja menos evidente em comparação com a solução, nossa formulação apresentou um valor de IC_{50} menor. É sabido que, quando o AM está encapsulado, ele pode ser entregue de maneira mais eficiente ao seu alvo, sem sofrer degradação ou perder sua atividade fotodinâmica, como acontece quando está na forma livre. Isso resulta em um aumento dos efeitos fotocitotóxicos. Além disso, os fármacos fotossensibilizadores têm alguma toxicidade no escuro, e essa toxicidade se intensifica com o aumento do tempo de incubação. A combinação desses fatores nos ajuda a compreender o comportamento e a influência da aplicação da luz, especialmente quando consideramos a modulação do tempo de incubação.

Os resultados numéricos da concentração inibitória de 50% (IC_{50}) ilustram a diferença entre os tempos de incubação de 5 minutos e 2 horas (tabela 6). O valor da IC_{50} apresenta uma queda significativa de cerca de sete vezes quando a luz é aplicada no primeiro período, enquanto no segundo período essa queda é de apenas duas vezes. Essa diferença pode ser explicada pelo

fato de que a geração de espécies reativas de oxigênio é o principal mecanismo de citotoxicidade do AM. Como mencionado anteriormente na seção 5.5, a nanopartícula é capaz de gerar na de forma controlada e prolongada. Isso é consistente com os resultados que mostram uma maior citotoxicidade das nanopartículas quando o tempo de incubação é estendido para 2 horas.

Tabela 6. IC₅₀ da solução e nanopartículas contendo AM com ou sem irradiação luminosa nos tempos de incubação de 5 min e 2 h.

Amostras	IC ₅₀ (μM)	
	Tempo de incubação: 5 min	Tempo de incubação: 2h
Solução	49,26	79,83
Solução + Irradiação de luz	7,36	40,45
Nanopartícula	213,79	22,37
Nanopartícula + Irradiação de luz	26,81	9,90

Fonte: Elaborado pelo autor.

O resultado está de acordo com estudo realizado por Gontijo et al., 2017 que demonstrou maior citotoxicidade em concentrações mais elevadas de AM, utilizando a mesma linhagem celular. Entretanto, no nosso caso, as nanopartículas mostraram-se muito mais citotóxicas em todas as concentrações, enquanto houve uma piora no desempenho da solução, o que foi evidenciado estatisticamente nas concentrações de 0,5 e 5 μM, onde a viabilidade celular atingiu valores de 95,18 e 73,44% para a solução e 62,32 e 56,09% para a nanopartícula, sem e com irradiação de luz, respectivamente. O pior desempenho da solução pode ser explicado por uma possível degradação e redução enzimática no ambiente biológico, tornando a atividade fotodinâmica do AM livre insignificante. Essa questão já foi abordada em um estudo onde nanopartículas de fosfato de cálcio foram desenvolvidas para proteção enzimática do AM (CaP-5MB). Nesse estudo, os comportamentos de redução do AM livre e do CaP-5MB foram confirmados pelo monitoramento da diminuição da absorção a 663 nm. Enquanto, na solução de AM livre, houve uma diminuição de aproximadamente 100% na intensidade de absorção, a CaP-5MB apresentou uma diminuição mínima ao longo de meia hora. Além disso, nota-se também que o aumento do tempo de incubação favorece a nanopartícula, pois esta estimula a captação celular pela célula, fazendo com que o AM atue de forma mais efetiva no citoplasma.

Assim, ressalta-se a importância do encapsulamento na proteção da atividade fotodinâmica do AM (GONTIJO et al., 2017; SEONG; KIM, 2015).

Finalmente, as nanopartículas branco foram utilizadas como controle para avaliar a citotoxicidade da nanoestrutura e grupos de células sem qualquer tipo de tratamento utilizado como controle da toxicidade luminosa. Em ambos os casos, a influência na viabilidade celular não foi de grande magnitude, com valores variando de 93,03 a 77,46%. A partir da quantificação do IC50, percebeu-se que a nanopartícula com irradiação de luz se destaca com o melhor valor no período de incubação de 2 h, sendo uma possível escolha para potencializar a TFD e diminuir seus efeitos colaterais em tratamentos com longos tempos de aplicação.

6 CONCLUSÃO

O processo de desenvolvimento das nanopartículas poliméricas usando a técnica de dupla emulsificação e evaporação de solvente foi eficaz. As nanopartículas obtidas demonstraram uma alta capacidade de encapsular o azul de metileno, apresentaram uma distribuição de tamanho homogênea e um tamanho de partícula adequado, o que é fundamental para uma melhor penetração na pele. As imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura confirmam uma estrutura esférica. O FTIR permitiu uma análise qualitativa da composição da nanopartícula, sugerindo elevada encapsulação. O perfil de liberação *in vitro* das nanopartículas mostrou um início de liberação rápida, o que é consistente com o modelo de primeira ordem, o que pode ser vantajoso para a terapia fotodinâmica combinada com sonoforese. No que diz respeito à avaliação da toxicidade e sua captação celular, os resultados obtidos foram promissores, onde a morte celular A431 foi maior quando se combinou a formulação com a irradiação com luz LED vermelha e os efeitos puderam ser potencializados com o aumento do tempo de incubação. Também foi demonstrado que o possível mecanismo de ação da nanopartícula é através da geração de espécies de oxigênio, de forma controlada e gradual. Além disso, a absorção celular de nanopartículas aumentou com o tempo e foi maior entre 3 e 6 h. Mostramos que a combinação entre nanopartícula e sonoforese aumentou a penetração cutânea do AM, e ainda não foi encontrada quantidade significativa no compartimento receptor, indicando que a formulação é destinada apenas para aplicação tópica. Assim, espera-se que as nanopartículas de AM sejam tão ou mais eficientes no tratamento do carcinoma espinocelular, o que será investigado *in vivo* em estudos futuros.

REFERÊNCIAS

- 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, n. June, p. 101856, 2022.
- ALLISON, R. R.; MOGHISSI, K. Oncologic photodynamic therapy: Clinical strategies that modulate mechanisms of action. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 10, n. 4, p. 331–341, 2013.
- BERNABEU, E. *et al.* Paclitaxel: What has been done and the challenges remain ahead. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 526, n. 1–2, p. 474–495, 2017.
- 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, 2012.
- BRUSCHI, M. L. Mathematical models of drug release. **Strategies to Modify the Drug Release from Pharmaceutical Systems**, p. 63–86, 2015.
- BUTANI, D.; YEWALE, C.; MISRA, A. Topical Amphotericin B solid lipid nanoparticles: Design and development. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 139, p. 17–24, 2016.
- CAMPBELL, C. S. J. *et al.* Objective assessment of nanoparticle disposition in mammalian skin after topical exposure. **Journal of Controlled Release**, v. 162, n. 1, p. 201–207, 2012.
- CANNAVÀ, C. *et al.* Nanospheres based on PLGA/amphiphilic cyclodextrin assemblies as potential enhancers of Methylene Blue neuroprotective effect. **RSC Advances**, v. 6, n. 20, p. 16720–16729, 2016.
- CAVALCANTE DE FREITAS, P. G. *et al.* Resveratrol-Loaded Polymeric Nanoparticles: The Effects of D- α -Tocopheryl Polyethylene Glycol 1000 Succinate (TPGS) on Physicochemical and Biological Properties against Breast Cancer In Vitro and In Vivo. **Cancers**, v. 15, n. 10, 2023.
- CHACKO, I. A. *et al.* Lipid vesicles: A versatile drug delivery platform for dermal and transdermal applications. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 195, n. June, p. 111262, 2020.
- CHANDRA, J. *et al.* Nanotechnology-empowered strategies in treatment of skin cancer. **Environmental Research**, v. 235, n. July, p. 116649, 2023.
- COORS, E. A.; VON DEN DRIESCH, P. Topical photodynamic therapy for patients with therapy-resistant lesions of cutaneous T-cell lymphoma. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 50, n. 3, p. 363–367, 2004.
- CRAYTHORNE, E.; AL-NIAMI, F. Skin cancer. **Medicine (United Kingdom)**, v. 45, n. 7, p.

431–434, 2017.

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, 2022.

CRUCHO, C. I. C.; BARROS, M. T. Polymeric nanoparticles: A study on the preparation variables and characterization methods *Materials Science and Engineering C*, 2017.

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

D’ORAZIO, J. et al. UV radiation and the skin. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 6, p. 12222–12248, 2013.

DAWIDCZYK, C. M. et al. State-of-the-art in design rules for drug delivery platforms: Lessons learned from FDA-approved nanomedicines. **Journal of Controlled Release**, v. 187, p. 133–144, 2014.

DE JALÓN, E. G. et al. PLGA microparticles: Possible vehicles for topical drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 226, n. 1–2, p. 181–184, 2001.

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

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, 2017.

DOPPALAPUDI, S.; MAHIRA, S.; KHAN, W. Development and in vitro assessment of psoralen and resveratrol co-loaded ultradeformable liposomes for the treatment of vitiligo. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 174, n. July, p. 44–57, 2017.

DRAGICEVIC, N.; MAIBACH, H. Combined use of nanocarriers and physical methods for percutaneous penetration enhancement. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 127, p. 58–84, 2018.

DUMAN, O.; TUNÇ, S. Electrokinetic and rheological properties of Na-bentonite in some electrolyte solutions. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 117, n. 1–2, p. 331–338, 2009.

EL-BAZ, F. K. et al. Dunaliella salina chitosan nanoparticles as a promising wound healing vehicles: In-vitro and in-vivo study. **OpenNano**, v. 12, n. June, p. 100165, 2023.

ELMOWAFY, M. Skin penetration/permeation success determinants of nanocarriers: Pursuit of a perfect formulation. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 203, n. April, p. 111748, 2021a.

- ELMOWAFY, M. Skin penetration/permeation success determinants of nanocarriers: Pursuit of a perfect formulation. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 203, n. September 2020, p. 111748, 2021b.
- ELOY, J. O. et al. EGFR-targeted immunoliposomes efficiently deliver docetaxel to prostate cancer cells. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 194, n. April, p. 111185, 2020.
- EYERICH, S. et al. Cutaneous Barriers and Skin Immunity: Differentiating A Connected Network. **Trends in Immunology**, v. 39, n. 4, p. 315–327, 2018.
- FAN, H. et al. Doxorubicin combined with low intensity ultrasound suppresses the growth of oral squamous cell carcinoma in culture and in xenografts. **Journal of Experimental and Clinical Cancer Research**, v. 36, n. 1, p. 1–13, 2017.
- FARMOUDEH, A. et al. Methylene blue loaded solid lipid nanoparticles: Preparation, optimization, and in-vivo burn healing assessment. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 70, n. February, p. 103209, 2022.
- 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, 2007.
- GARCIA, M. T. J. et al. Improvement of cutaneous delivery of methylene blue by liquid crystals. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 548, n. 1, p. 454–465, 2018.
- GONTIJO, S. M. L. et al. Sub-additive effects of photodynamic therapy combined with erlotinib for the treatment of epidermoid carcinoma: An in vitro study. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 18, p. 252–256, 2017.
- GÜNGÖR, S.; KAHRAMAN, E. Nanocarriers Mediated Cutaneous Drug Delivery. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 158, n. June 2020, 2021.
- GUTIÉRREZ-VALENZUELA, C. A. et al. Evaluation of a combined emulsion process to encapsulate methylene blue into PLGA nanoparticles. **RSC Advances**, v. 8, n. 1, p. 414–422, 2018.
- HOSSEINI, S. M. et al. Theranostic polymeric nanoparticles as a new approach in cancer therapy and diagnosis: a review. **Materials Today Chemistry**, v. 29, p. 101400, 2023.
- HOSSEINZADEH, R.; KHORSANDI, K.; JAHANSHIRI, M. Combination photodynamic therapy of human breast cancer using salicylic acid and methylene blue. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 184, p. 198–203, 2017.
- IQBAL, M. et al. Preparation of biodegradable PCL particles via double emulsion evaporation method using ultrasound technique. **Colloid and Polymer Science**, v. 293, n. 3, p. 861–873, 2015.
- JAWALE, N. et al. Physical Approach To Transdermal Drug Delivery: a Review. **Journal of**

- Drug Delivery and Therapeutics**, v. 7, n. 3, p. 28–35, 2017.
- JESUS, V. P. S. et al. Nanoparticles of methylene blue enhance photodynamic therapy. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 23, n. May, p. 212–217, 2018.
- JIANG, L.; ZHANG, J. **Biodegradable and Biobased Polymers**. [s.l.] Elsevier, 2011.
- JOHNSON, P. G. et al. A pulsed electric field enhances cutaneous delivery of methylene blue in excised full-thickness porcine skin. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 111, n. 3, p. 457–463, 1998.
- JOSHI, A.; RAJE, J. S onicated transdermal drug transport. v. 83, p. 13–22, 2002.
- KAHRAMAN, E. et al. The combination of nanomicelles with terpenes for enhancement of skin drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 551, n. 1–2, p. 133–140, 2018.
- KASETVATIN, C.; RUJIVIPAT, S.; TIYABOONCHAI, W. Combination of elastic liposomes and low frequency ultrasound for skin permeation enhancement of hyaluronic acid. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 135, p. 458–464, 2015.
- KESSELS, J. et al. Two-fold illumination in topical 5-aminolevulinic acid (ALA)-mediated photodynamic therapy (PDT) for superficial basal cell carcinoma (sBCC): A retrospective case series and cohort study. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 74, n. 5, p. 899–906, 2016.
- 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, 2019.
- KIM, I. Y.; HE, Y. Y. Ultraviolet radiation-induced non-melanoma skin cancer: Regulation of DNA damage repair and inflammation. **Genes and Diseases**, v. 1, n. 2, p. 188–198, 2014.
- KRISHNAN, V.; MITRAGOTRI, S. Nanoparticles for topical drug delivery: Potential for skin cancer treatment. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 153, p. 87–10^a, 2020a.
- KRISHNAN, V.; MITRAGOTRI, S. Nanoparticles for topical drug delivery: Potential for skin cancer treatment. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 153, p. 87–108, 2020b.
- KWIATKOWSKI, S. et al. Photodynamic therapy – mechanisms, photosensitizers and combinations. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 106, n. July, p. 1098–1107, 2018.
- LAI-CHEONG, J. E.; MCGRATH, J. A. Structure and function of skin, hair and nails. **Medicine (United Kingdom)**, v. 49, n. 6, p. 337–342, 2021.
- LANE, M. E. Skin penetration enhancers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 447, n. 1–2, p. 12–21, 2013.
- LE, M. N. et al. Effects of methylene blue photodynamic therapy on oral carcinoma and leukoplakia cells. **Laryngoscope Investigative Otolaryngology**, v. 7, n. 4, p. 982–987, 2022.

- LIU, Y.; CAO, Z.; WEI, G. Effects of Photodynamic Therapy Using Red LED-light Combined with Hypocrellin B on Apoptotic Signaling in Cutaneous Squamous Cell Carcinoma A431 cells. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 43, n. June, p. 103683, 2023.
- 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, 2017.
- MADAN, V.; LEAR, J. T.; SZEIMIES, R. M. Non-melanoma skin cancer. **The Lancet**, v. 375, n. 9715, p. 673–685, 2010.
- MARIGLIA, J. et al. Analysis of the cytotoxic effects of combined ultrasound, microbubble and nucleoside analog combinations on pancreatic cells in vitro. **Ultrasonics**, v. 89, n. May, p. 110–117, 2018.
- MARTINS, Y. A. et al. Bifunctional therapeutic application of low-frequency ultrasound associated with zinc phthalocyanine-loaded micelles. **International Journal of Nanomedicine**, v. 15, p. 8075–8095, 2020.
- MASUI, T. et al. Low-intensity ultrasound enhances the anticancer activity of cetuximab in human head and neck cancer cells. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 5, n. 1, p. 11–16, 2013.
- MCKNIGHT, G.; SHAH, J.; HARGEST, R. Physiology of the skin. **Surgery (United Kingdom)**, v. 40, n. 1, p. 8–12, 2022.
- MD, S. et al. Lipid based nanocarriers system for topical delivery of photosensitizers. **Drug Discovery Today**, v. 22, n. 8, p. 1274–1283, 2017.
- MOHAMED, S. A.; HARGEST, R. Surgical anatomy of the skin. **Surgery (United Kingdom)**, v. 40, n. 1, p. 1–7, 2022.
- MOHSENI, H. et al. In vitro evaluation of the intensifying photodynamic effect due to the presence of plasmonic hollow gold nanoshells loaded with methylene blue on breast and melanoma cancer cells. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 40, n. February, p. 103065, 2022.
- MORA-HUERTAS, C. E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, 2010.
- MORADI KASHKOOLI, F. et al. Ultrasound-mediated nano drug delivery for treating cancer: Fundamental physics to future directions. **Journal of Controlled Release**, v. 355, n. November 2022, p. 552–578, 2023.
- NANCE, E. Careers in nanomedicine and drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 144, p. 180–189, 2019.
- OBSTOY, B. et al. Photodynamic therapy using methylene blue in lung adenocarcinoma

xenograft and hamster cheek pouch induced squamous cell carcinoma. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 15, p. 109–114, 2016.

OGURA, M.; PALIWAL, S.; MITRAGOTRI, S. Low-frequency sonophoresis: Current status and future prospects. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 60, n. 10, p. 1218–1223, 2008.

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

OVCHINNIKOV, O. V. et al. Manifestation of intermolecular interactions in FTIR spectra of methylene blue molecules. **Vibrational Spectroscopy**, v. 86, p. 181–189, 2016.

PARK, D. et al. Sonophoresis in transdermal drug delivery. **Ultrasonics**, v. 54, n. 1, p. 56–65, 2014.

PASZKO, E. et al. Nanodrug applications in photodynamic therapy. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, 2011.

PEREZ, M. et al. Skin cancer: Primary, secondary, and tertiary prevention. Part I. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 87, n. 2, p. 255–268, 2022.

PETRILLI, R. et al. Skin cancer treatment effectiveness is improved by iontophoresis of EGFR-targeted liposomes containing 5-FU compared with subcutaneous injection. **Journal of Controlled Release**, v. 283, n. May, p. 151–162, 2018.

PETRILLI, R.; LOPEZ, R. F. V. Physical methods for topical skin drug delivery: Concepts and applications. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 54, n. Special Issue, p. 1–19, 2018.

PIVETTA, T. P. et al. Liposomes encapsulating methylene blue and acridine orange: An approach for phototherapy of skin cancer. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 220, n. June, 2022.

QIAO, L. et al. ALA-PDT inhibits proliferation and promotes apoptosis of SCC cells through STAT3 signal pathway. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 14, p. 66–73, 2016.

QIN, M. et al. Methylene blue covalently loaded polyacrylamide nanoparticles for enhanced tumor-targeted photodynamic therapy. v. 23, n. 1, p. 1–7, 2011.

RIZVI, I. et al. A Combination of Visudyne and a Lipid-Anchored Liposomal Formulation of Benzoporphyrin Derivative Enhances Photodynamic Therapy Efficacy in a 3D Model for Ovarian Cancer. **Physiology & behavior**, v. 176, n. 1, p. 139–148, 2016.

ROMANHOLE, R. C. et al. Unplanned absorption of sunscreen ingredients: Impact of formulation and evaluation methods. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 591, n. October, 2020.

SAJID, M.; PŁOTKA-WASYLKA, J. Nanoparticles: Synthesis, characteristics, and

- applications in analytical and other sciences. **Microchemical Journal**, 2020.
- SALA, M. et al. Lipid nanocarriers as skin drug delivery systems: Properties, mechanisms of skin interactions and medical applications. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 535, n. 1–2, p. 1–17, 2018.
- SANNA, V. et al. Resveratrol-Loaded Nanoparticles Based on Poly(epsilon- caprolactone) and Poly(. 2013.
- SCHIRMER, R. H. et al. “Lest we forget you - methylene blue...” **Neurobiology of Aging**, v. 32, n. 12, p. 2325.e7-2325.e16, 2011.
- SEONG, D. Y.; KIM, Y. J. Enhanced photodynamic therapy efficacy of methylene blue-loaded calcium phosphate nanoparticles. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 146, p. 34–43, 2015.
- SHAIKH, M. V.; KALA, M.; NIVSARKAR, M. Formulation and optimization of doxorubicin loaded polymeric nanoparticles using Box-Behnken design: ex-vivo stability and in-vitro activity. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 100, p. 262–272, 2017.
- SHEN, X. et al. Treatment of infected wounds with methylene blue photodynamic therapy: An effective and safe treatment method. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 32, n. October, p. 102051, 2020.
- SHI, L. et al. In vitro evaluation of 5-aminolevulinic acid (ALA) loaded PLGA nanoparticles. **International Journal of Nanomedicine**, v. 8, p. 2669–2676, 2013.
- SILVA, A. P. et al. Effects of methylene blue-mediated photodynamic therapy on a mouse model of squamous cell carcinoma and normal skin. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 23, n. July, p. 154–164, 2018.
- SINHA, V. R. et al. Poly-ε-caprolactone microspheres and nanospheres: An overview **International Journal of Pharmaceutics**, 2004.
- SOARES LIMA, T. et al. Nanoencapsulation of Methylene-Blue for Enhanced Skin Cancer Cell Phototoxicity and Cutaneous Penetration in Association with Sonophoresis. **Pharmaceutics**, v. 15, n. 5, 2023.
- STRACKE, F. et al. Multiphoton microscopy for the investigation of dermal penetration of nanoparticle-borne drugs. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 126, n. 10, p. 2224–2233, 2006.
- STRATIGOS, A. et al. Diagnosis and treatment of invasive squamous cell carcinoma of the skin: European consensus-based interdisciplinary guideline. **European Journal of Cancer**, v. 51, n. 14, p. 1989–2007, 2015.
- SUN, T. et al. Physical triggering strategies for drug delivery. **Advanced Drug Delivery**

Reviews, v. 158, p. 36–62, 2020.

TANG, W. et al. Photodynamic Characterization and In Vitro Application of Methylene Blue-containing Nanoparticle Platforms¶. **Photochemistry and Photobiology**, v. 81, n. 2, p. 242, 2005.

TANG, W. et al. Encapsulation of methylene blue in polyacrylamide nanoparticle platforms protects its photodynamic effectiveness. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 369, n. 2, p. 579–583, 2008.

TAO, H. et al. A chlorin e6 derivative-mediated photodynamic therapy inhibits cutaneous squamous cell carcinoma cell proliferation via Akt/mTOR signaling pathway. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 42, n. January, p. 103332, 2023.

TARDIVO, J. P. et al. Methylene blue in photodynamic therapy: From basic mechanisms to clinical applications. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 2, n. 3, p. 175–191, 2005.

TELLO, T. L.; ARRON, S. T. **Nonmelanoma Skin Cancer**. Seventh Ed ed. [s.l.] Elsevier, 2018.

VANJA KLEPAC-CERAJ, PHD1, NIRAJ PATEL, BS, MS1, 3, XIAOQING SONG, MD1, C. H.; BS1, CHITRANG PATEL, BS1, RALPH KENT, SCD2, MANSOOR M. AMIJI, PHD3, AND N. S.; SOUKOS, DDS, P. Public Access. **Exp Biol Med**, v. 239, n. 11, p. 1476–1488, 2011.

VARY, J. C. Selected Disorders of Skin Appendages-Acne, Alopecia, Hyperhidrosis. **Medical Clinics of North America**, v. 99, n. 6, p. 1195–1211, 2015.

VENUS, M.; WATERMAN, J.; MCNAB, I. Basic physiology of the skin. **Surgery**, v. 29, n. 10, p. 471–474, 2011.

WAINWRIGHT, M.; CROSSLEY, K. B. Methylene Blue - A therapeutic dye for all seasons? **Journal of Chemotherapy**, v. 14, n. 5, p. 431–443, 2002.

WALKER, H. S.; HARDWICKE, J. Non-melanoma skin cancer. **Surgery (United Kingdom)**, v. 40, n. 1, p. 39–45, 2022.

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, 2015.

WONG, T. W. Electrical , magnetic , photomechanical and cavitation waves to overcome skin barrier for transdermal drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 193, p. 257–269, 2014.

WOODRUFF, M. A.; HUTMACHER, D. W. The return of a forgotten polymer - Polycaprolactone in the 21st century. **Progress in Polymer Science (Oxford)**, v. 35, n. 10, p.

1217–1256, 2010.

XIE, X. et al. Transdermal delivery of bFGF with sonophoresis facilitated by chitosan nanocarriers. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 75, n. May, p. 103675, 2022.

XU, L. et al. A combination of preoperative or intraoperative MB-PDT and surgery in the treatment of giant cutaneous squamous cell carcinoma with infection. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 36, n. August, p. 102545, 2021.

YAO, L.; ZHANG, Z. The reversal of MRP1 expression induced by low-frequency and low-intensity ultrasound and curcumin mediated by VEGF in brain glioma. **OncoTargets and Therapy**, v. 12, p. 3581–3593, 2019.

YOTSUMOTO, K. et al. Improvement of the skin penetration of hydrophobic drugs by polymeric micelles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 553, n. 1–2, p. 132–140, 2018.

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

ZHANG, G. LONG et al. Photodynamic therapy as an alternative treatment in patients with invasive cutaneous SCC where surgery is not feasible: Single center experience. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 32, n. August, p. 101980, 2020a.

ZHANG, L. et al. Photodynamic therapy enhances skin cancer chemotherapy effects through autophagy regulation. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 28, n. April, p. 159–165, 2019.

ZHANG, N. et al. Skin cancer diagnosis based on optimized convolutional neural network. **Artificial Intelligence in Medicine**, v. 102, n. October 2019, p. 101756, 2020b.

ZHANG, T. et al. Hyaluronic acid carrier-based photodynamic therapy for head and neck squamous cell carcinoma. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 37, n. December 2021, p. 102706, 2022.

ZHANG, X. et al. A heavy atom free semiconducting polymer with high singlet oxygen quantum yield for photodynamic and photothermal synergistic therapy. **Materials and Design**, v. 197, p. 109263, 2021.

ZHANG, X. F.; LI, X. The photostability and fluorescence properties of diphenylisobenzofuran. **Journal of Luminescence**, v. 131, n. 11, p. 2263–2266, 2011.

ZHANG, Y. et al. DDSolver: An add-in program for modeling and comparison of drug dissolution profiles. **AAPS Journal**, v. 12, n. 3, p. 263–271, 2010.

ZHANG, Z. et al. Polymeric nanoparticles-based topical delivery systems for the treatment of

dermatological diseases. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology**, v. 5, n. 3, p. 205–218, 2013.

ZHENG, Y. et al. Nanoparticle-based drug delivery systems for controllable photodynamic cancer therapy. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, 2020.