

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**THAIENE AVILA REIS**

**Desenvolvimento e avaliação *in vitro* de complexo de inclusão de cloreto de alumínio ftalocianina com ciclodextrina para a terapia fotodinâmica tópica de câncer de pele**

**BRASÍLIA**

**2018**

**THAIENE AVILA REIS**

**Desenvolvimento e avaliação *in vitro* de complexo de inclusão de cloreto de alumínio ftalocianina com ciclodextrina para a terapia fotodinâmica tópica de câncer de pele**

**Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Ciências Farmacêuticas**

**Orientador: Prof. Dr. Guilherme M. Gelfuso**

**BRASÍLIA – DISTRITO FEDERAL**

**2018**

Autorizo a reprodução e divulgação total e parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de ensino, estudo ou pesquisa, desde que citada a fonte.

### Catálogo da publicação

RR375d      Reis, Thaiene Avila  
Desenvolvimento e avaliação in vitro de complexo de inclusão de cloreto de alumínio ftalocianina com ciclodextrina para a terapia fotodinâmica tópica de câncer de pele / Thaiene Avila Reis; orientador Guilherme Martins Gelfuso; co-orientador Taís Gratieri. -- Brasília, 2018. 94 p.

Tese (Doutorado - Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade de Brasília, 2018.

1. Cloro-alumínio ftalocianina. 2. Iontoforese. 3. Ciclodextrina. 4. Complexo de inclusão. 5. Tumor cutâneo. I. Gelfuso, Guilherme Martins, orient. II. Gratieri, Taís, co orient. III. Título.

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Thaiene Avila Reis

Título do trabalho: Desenvolvimento e avaliação *in vitro* de complexo de inclusão de cloreto de alumínio ftalocianina com ciclodextrina para a terapia fotodinâmica tópica de câncer de pele

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Ciências Farmacêuticas

Aprovada em \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2018.

### Banca examinadora

---

Prof. Dr. Guilherme Martins Gelfuso  
Universidade de Brasília

---

Prof. Dr. Ricardo Neves Marreto  
Universidade Federal de Goiás

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lívia Cristina Lira Sá-Barreto  
Universidade de Brasília

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria de Fátima Borin  
Universidade de Brasília

*Aos meus pais,  
por sempre acreditarem que investir nos meus estudos seria o  
melhor para eu trilhar um caminho com sabedoria e sucesso.*

## AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por sempre guiar meus caminhos, me ajudar a percorrê-los com a máxima sabedoria e ser um conforto nas horas difíceis.

À **Universidade de Brasília** e agências de fomento **CAPES** e **FAP-DF** pela oportunidade e apoio financeiro para realização da pesquisa.

À **Prof. Dra. Graziella Anselmo Joanitti** e sua aluna **Ma. Khellida Loiane Vieira Ramos** que, através da parceria formada, contribuíram com muito empenho para a realização desse trabalho.

Ao **Prof. Dr. Marcílio Sérgio Soares da Cunha-Filho** e à **Prof. Dra. Taís Gratieri** por todo empenho para conseguir um espaço físico adequado para realização da nossa pesquisa, além do incentivo e disponibilidade em ajudar durante todas as etapas do trabalho realizado.

Ao meu orientador **Prof. Dr. Guilherme Martins Gelfuso** por ter aceitado me orientar durante toda a jornada científica. Muito obrigada pela confiança que sempre depositou em mim, muitas vezes fazendo com que eu conseguisse realizar o que eu nem acreditava ser possível. Foram muitos desafios, que foram mais fáceis de serem superados porque tinha seu apoio, carinho e compreensão.

Ao **LTMAC** e todos os seus alunos que são exemplo de trabalho em equipe. Em especial, ao agora mestre, e em breve doutor, **Breno Noronha Matos** por estar ao meu lado desde o início. Formamos uma bela dupla questionadora, com muito carinho e apoio um ao outro. Muito obrigada por estar ao meu lado em todos os momentos.

A **minha família** pela compreensão nas ausências devido a dedicação ao trabalho acadêmico e por sempre acreditarem no meu potencial. As palavras de incentivo, torcida e carinho de vocês são fundamentais na minha vida.

Aos meus pais, **Ricardo Luiz de Figueiredo Reis** e **Maria da Gloria Avila Reis**, que sempre se empenharam e se dedicaram ao máximo para minha formação e educação. Muito obrigada por me ensinarem a lutar pelos meus objetivos, por me colocarem sempre em primeiro lugar na vida de vocês e por me apoiar em todas as minhas decisões. Como disse ao final do mestrado, este trabalho é, sem dúvidas, um reconhecimento que todo esforço de vocês não foi em vão.

Ao meu namorado, noivo, marido e em breve doutor, **Kim Sampaio de Lacerda Mileski** por ter me incentivado a entrar na vida científica. Muito obrigada pelo seu companheirismo na vida pessoal e acadêmica, por todo seu amor, carinho e paciência nas horas difíceis de estresse. Tenho muito orgulho de ter alguém ao meu lado com tanta ética e que exerce a profissão com tanta dedicação e orgulho. Você foi essencial em toda essa longa jornada de seis anos de vida acadêmica.

*“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o  
que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê”  
(Arthur Schopenhauer)*

*“A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu  
tamanho original”  
(Albert Einstein)*

## RESUMO

Este trabalho teve como objetivo desenvolver complexos de ciclodextrinas com o agente fotossensibilizante altamente lipofílico cloro-alumínio ftalocianina (CIAIFc) para possibilitar a solubilização do fármaco em meio aquoso, melhorar sua estabilidade fotodinâmica e favorecer sua penetração cutânea para possibilitar o uso na terapia fotodinâmica (TFD) tópica de câncer de pele. Inicialmente, um método analítico por HPLC foi desenvolvido e validado em termos de seletividade, robustez, linearidade, limite de detecção e quantificação, precisão e recuperação para quantificação da CIAIFc recuperada de pele de suínos. A solubilidade da CIAIFc em metanol, etanol e solução aquosa de Tween® 20 a 5%, pH 7,4, foi calculada como sendo  $9,9 \pm 2,8$ ,  $5,7 \pm 0,3$  e  $0,7 \pm 0,4$  mg/mL, respectivamente. Os complexos foram formados com hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (HP- $\beta$ CD) e, após análise de diagrama de solubilidade, determinou-se a proporção de 20% de HP- $\beta$ CD no preparo do complexo. O complexo foi caracterizado por espectrofotometria de absorção e emissão de fluorescência, confirmando que a CIAIFc mantém suas características fotodinâmicas mesmo complexada. Análises calorimétricas do agente fotossensibilizante confirmaram sua estabilidade térmica sozinho e na mistura de 1:1 (m/m) com a HP- $\beta$ CD. Os ensaios de citotoxicidade com células de câncer de pele melanoma da linhagem B16F10, no escuro, mostraram que as concentrações tóxicas para CIAIFc e CIAIFc-HP- $\beta$ CD são de 39,06 e 625 ng/mL, respectivamente. Com a aplicação da TFD na mesma linhagem celular, a HP- $\beta$ CD, reduziu discretamente a viabilidade celular em baixas concentrações (1,56 e 6,25 mg/mL), mas reduziu para 37% quando utilizada a concentração de 25 mg/mL. A CIAIFc livre reduziu em 67% a viabilidade celular em quaisquer concentrações analisadas (0,08; 0,31 e 1,25 mg/mL). No entanto, o complexo CIAIFc-HP- $\beta$ CD reduziu significativamente ( $p < 0,05$ ) a viabilidade celular em 62% somente na concentração de 1,25 mg/mL. Por fim, ensaios de permeação *in vitro* foram realizados em células de difusão do tipo Franz modificadas, em pele de orelha de suínos e com o complexo em pH 7,4 por ter apresentado melhor estabilidade frente à corrente elétrica. A utilização de microagulhas sólidas antes da permeação não mostrou-se eficaz para aumentar a permeação da CIAIFc complexada. No entanto, a utilização da técnica não-invasiva e indolor de iontoforese promoveu um aumento de 2,3 vezes na penetração de CIAIFc e foi capaz de aumentar de maneira mais rápida a penetração do fármaco para camadas mais profundas da pele se comparado com o controle de permeação passiva. Assim, o complexo CIAIFc-HP- $\beta$ CD foi uma alternativa viável para a estabilização e solubilização de CIAIFc para aplicação na pele. A utilização da iontoforese possibilitou um acúmulo de agente fotossensibilizante em camadas mais profundas da pele de maneira rápida e não invasiva, possibilitando assim a TFD tópica de tumores de pele.

**Palavras-chave:** Cloro-alumínio ftalocianina, Iontoforese, Ciclodextrina, Complexo de inclusão, Tumor cutâneo, Terapia fotodinâmica.

## ABSTRACT

This work aimed to develop cyclodextrin complexes with the highly lipophilic photosensitizing agent chloro-aluminum phthalocyanine (CIAIFc) to enable the solubilization of the drug in aqueous media, improve its photodynamic stability and favor its skin penetration to favor its use in topical photodynamic therapy (PDT) of skin cancer. Initially, an HPLC analytical method was developed and validated in terms of selectivity, robustness, linearity, detection limit and quantification, precision and recovery for quantification of recovered CIAIFc from porcine skin. The solubility of CIAIFc in methanol, ethanol and 5% Tween<sup>®</sup> 20 aqueous solution, pH 7.4, was calculated to be  $9.9 \pm 2.8$ ,  $5.7 \pm 0.3$  and  $0.7 \pm 0.4$  mg/mL, respectively. Complexes were formed with hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin (HP- $\beta$ CD) and, after analysis of solubility diagram, the ratio of 20% HP- $\beta$ CD in the complex preparation was selected for use. The complex was characterized by absorption spectrophotometry and fluorescence emission, confirming that the CIAIFc maintains its photodynamic characteristics even complexed. Calorimetric analyzes of the photosensitizing agent confirmed its thermal stability alone and in the 1:1 (w/w) mixture with HP- $\beta$ CD. Cytotoxicity assays with melanoma skin cancer cells from the B16F10 line in the dark have shown the toxic concentrations for CIAIFc and CIAIFc-HP- $\beta$ CD are 39.06 and 625 ng/mL, respectively. With the application of PDT in the same cell line, HP- $\beta$ CD, discreetly reduced cell viability at low concentrations (1.56 and 6.25 mg/mL), but reduced to 37% when used at 25 mg/mL. Free CIAIFc reduced cell viability by 67% at any of the concentrations analyzed (0.08, 0.31 and 1.25 mg/mL). However, the CIAIFc-HP- $\beta$ CD complex significantly reduced ( $p < 0.05$ ) cell viability by 62% at the concentration of 1.25 mg/mL alone. Finally, *in vitro* permeation assays were performed on modified Franz-type diffusion cells in porcine ear skin and with the complex at pH 7.4 because it presented better stability against the electric current. The use of solid microneedles prior to permeation has not shown to enhance the permeation of complexed CIAIFc. However, the use of the noninvasive and painless iontophoresis technique promoted a 2.3-fold increase in the penetration of CIAIFc and was able to increase the penetration of the drug more rapidly to deeper layers of the skin when compared to the control of passive permeation. In this way, the complex CIAIFc-HP- $\beta$ CD seems to be a viable alternative for the stabilization and solubilization of CIAIFc for application to the skin. The use of iontophoresis enabled the accumulation of photosensitizing agent in deeper layers of the skin in a fast and non-invasive way, thus favoring the topical PDT of skin tumors.

**Keywords:** Chloro-aluminum phthalocyanine, Iontophoresis, Cyclodextrin, Inclusion complex, Skin cancer, Photodynamic therapy.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Camadas da pele indicando a célula de melanócito (A) e melanoma com suas características habituais como pinta assimétrica, com borda irregular, cor variável e diâmetro maior que 6 mm (B) (Adaptado de GORDON, 2013).....7
- Figura 2** – Esquema com evolução do carcinoma basocelular (CBC) e carcinoma de células escamosas (CCE) a partir da pele normal e íntegra, exemplificando uma das possíveis aparências clínicas e sua respectiva histologia (Adaptado de LUCENA et al., 2015).....9
- Figura 3** – Ilustração da aplicação da TFD em câncer de pele melanoma. Incidência de laser no comprimento de onda de absorção máxima do agente fotossensibilizante após sua permeação na pele (adaptado de BEACK et al., 2015). ..... 11
- Figura 4** – Esquema simplificado dos mecanismos de reação do tipo I e II das espécies reativas de oxigênio mediadas por luz (adaptado de DOLMANS et al., 2003 (A); fonte: OLIVEIRA et al., 2015 (B))..... 12
- Figura 5** – Janela ótica para aplicação de TFD, através de espectros de absorção de cromóforos importantes teciduais: água, desoxihemoglobina (Hb), oxihemoglobina (HbO<sub>2</sub>) e melanina (adaptado de CASTANO et al., 2004; PLAETZER et al., 2009)..... 15
- Figura 6** – Estrutura química da CIAIFc (MM = 574,96 g/mol;  $\lambda_{\text{máx}}$  = 680 nm)..... 16
- Figura 7** – Estrutura molecular das ciclodextrinas naturais  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  com seis, sete e oito unidades de glicose respectivamente (fonte: BOTELHO et al., 2011). ..... 17
- Figura 8** – Estrutura molecular da hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (HP- $\beta$ CD) (MM = ~1460 g/mol). ..... 18
- Figura 9** – Estrutura anatômica da pele dividida em epiderme, derme, hipoderme e anexos (A) e camadas celulares que constituem a epiderme (B) (adaptado de OBAGI, 2004 e PERETTI et al., 2015, respectivamente). ..... 19
- Figura 10** – Microagulhas antes e depois da inserção na pele. Microagulhas sólidas furam a pele e são removidas intactas (A); microagulhas revestidas furam a pele, o revestimento fica na epiderme e as microagulhas são removidas intactas (B); microagulhas dissolvíveis são formadas pelo ativo de interesse e fica retida na pele após a inserção (C); microagulhas ocas furam o EC para a formulação ser injetada e depois é retirada também intacta da pele (D) (adaptado de REIS et al., 2014). 21
- Figura 11** – Iontoforese utilizando sistemas de eletrodos de Ag/AgCl. O ânodo contém um fármaco ionizável D<sup>+</sup> e seu contra íon A<sup>-</sup> e Na<sup>+</sup>Cl<sup>-</sup> (Adaptado de KALIA et al., 2004). .....22
- Figura 12** – Remoção da pele de orelha de porco: a orelha é fixada em placa de isopor recoberta com papel alumínio (A); a pele da parte superior é removida com auxílio de bisturi (B); tecido adiposo e vasos sanguíneos são retirados com auxílio de tesoura (C); pele limpa é embalada e congelada a -6 °C por, no máximo, três meses (D). .....25

- Figura 13** – Confeção do eletrodo de cloreto de prata: fio de prata (A) cortado e com as pontas viradas (B); o fio de prata foi mergulhado em cloreto de prata fundido (C) formando um eletrodo com superfície lisa e uniforme (D). .....25
- Figura 14** – Capa termorretrátil para encapar o fio de Ag evitando sua oxidação (A); capa termorretrátil cortada no tamanho certo para cada eletrodo (B); capa termorretrátil encaixada no fio e passada sob a chama rapidamente para aderir ao fio de Ag (C). .....26
- Figura 15** – Preparo de cinco contra eletrodos de Ag com ligação em série (A); fio de platina e eletrodo de AgCl em água com excesso de NaCl para formação do contra eletrodo de Ag (B) e contra eletrodo de Ag (C). .....26
- Figura 16** – Célula de difusão do tipo Franz modificada montada para realização de ensaios *in vitro* de permeação de CIAIFc através de pele de orelha de suínos. ....34
- Figura 17** – Foto da pele presa com grampo (A); direções e sentidos em forma de asterisco em que os rolos com microagulhas foram passados na pele (B); rolo de microagulhas com 0,5 mm (C), 1,0 mm (D) e 2,5 mm (E). .....35
- Figura 18** – Célula tipo Franz montada com o eletrodo de Ag e AgCl no compartimento doador e receptor, respectivamente (A); Células ligadas em série (B). .....36
- Figura 19** – Cromatogramas sobrepostos obtidos por HPLC referente a curva de CIAIFc em metanol nas concentrações de 0,1; 0,25; 0,5; 1,0; 2,5 e 5,0 µg/mL com picos eluindo a 3,71 min e detecção em 670 nm. ....39
- Figura 20** – Seletividade do método analítico para determinação de CIAIFc a 5,0 µg/mL sozinho, com interferências da pele (EC, FP e PR) e com HP-βCD. ....40
- Figura 21** – Superfícies de resposta para a área de pico de CIAIFc no ensaio de robustez juntamente com equações preditivas e  $r^2$ . As áreas escuras mostram regiões com mudanças mais intensas nessas respostas. ....41
- Figura 22** – Curva analítica obtida pela análise de uma triplicata de CIAIFc por HPLC utilizando metanol como solvente de diluição do fármaco nas concentrações de 0,1; 0,25; 0,5; 1,0; 2,5 e 5,0 µg/mL, comprovando a linearidade do método. Equação da reta:  $y = 306119x + 42191,1$ . ....42
- Figura 23** – Caracterização térmica por DSC (A) e DTG (B), de 25 a 500 °C, da HP-βCD, CIAIFc e mistura física HP-βCD + CIAIFc (1:1, m/m). ....46
- Figura 24** – Análise visual obtida por DSC da CIAIFc, da HP-βCD e da mistura física HP-βCD + CIAIFc (1:1, m/m), na temperatura inicial de 25 °C, na temperatura com o principal evento térmico de cada composto e na temperatura final de 500 °C. .48
- Figura 25** – Diagrama de solubilidade de CIAIFc a partir do complexo CIAIFc-HP-βCD com diferentes proporções de CD em água ultrapurificada (m/v) em intervalo de 15 dias. ....50
- Figura 26** – Espectro de absorção do complexo CIAIFc-HP-βCD e da CIAIFc em metanol e Solução aquosa de Tween<sup>®</sup> 20 a 5%, pH 7,4, com varredura de 190 a 800 nm. ....52

- Figura 27** – Espectro de fluorescência do complexo CIAIFc-HP- $\beta$ CD e da CIAIFc em metanol e Solução aquosa de Tween<sup>®</sup> 20 a 5%, pH 7,4. Espectro de emissão analisado de 650 a 800 nm com comprimento de onda de excitação igual a 610 nm. ....52
- Figura 28** – Viabilidade de células de melanoma (B16F10) após incubação por 24 h com diferentes concentrações de CIAIFc-HP- $\beta$ CD e CIAIFc em etanol no escuro. \*p < 0,05 comparados ao controle. ....54
- Figura 29** – Viabilidade de células de câncer de pele melanoma (linhagem B16F10) com diferentes concentrações de HP- $\beta$ CD, CIAIFc livre ou no complexo CIAIFc-HP- $\beta$ CD na ausência de luz (A) e após a terapia fotodinâmica – TFD – (B). Utilizou-se etanol como controle de CIAIFc livre. \*p < 0,01; \*\*p < 0,001; \*\*\* p < 0,0001.....55
- Figura 30** – Estabilidade elétrica do complexo de CIAIFc-HP- $\beta$ CD nos pH 3,5, 5,0 e 7,4, com aplicação de corrente elétrica de 0,5 mA/cm<sup>2</sup>, durante 6 h, calculada pelo teor de CIAIFc; Característica visual do complexo após 6 h em pH 3,5 (C) e 5,0 (B) e pH 7,4 (A).....58
- Figura 31** – CIAIFc recuperada da pele inteira após 12 h de permeação *in vitro* com utilização de microagulhas de 0,5, 1,0 e 2,0 mm a partir do complexo CIAIFc-HP- $\beta$ CD, pH 7,4 (n=5). O controle da permeação com microagulhas foi uma permeação em pele sem EC. # abaixo do LQ; \*p < 0,05. ....60
- Figura 32** – CIAIFc recuperada do EC ou pele inteira após 12 h de permeação passiva ou 6 h de permeação iontoforética *in vitro* a partir do complexo CIAIFc-HP- $\beta$ CD, em pH 7,4 (n = 4-5). \*\*p < 0,01. ....62

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Dados estatísticos de estimativa de novos casos e número de mortes com cânceres de pele dos tipos melanoma e não-melanoma para o ano de 2018 (FONTE: INCA, 2018). .....	6
<b>Tabela 2</b> – Desenho experimental para ensaio de robustez. Temp: temperatura do forno; FR: vazão da fase móvel; Ácido: concentração de ácido fosfórico da fase móvel. ....	29
<b>Tabela 3</b> – Otimização das condições de cromatográficas para determinação de CIAIFc. FR: fase reversa; FN: fase normal. ....	38
<b>Tabela 4</b> – Precisão intra e inter-ensaio do método CIAIFc por HPLC. CV: coeficiente de variação. ....	43
<b>Tabela 5</b> – Recuperação do método analítico para determinação de CIAIFc a partir de camadas de pele. EC: estrato córneo; FP: folículo piloso; CV: coeficiente de variação. ....	44
<b>Tabela 6</b> – Solubilidade da CIAIFc nos solventes metanol, etanol e solução aquosa de Tween® 20 a 5%, pH 7,4. ....	45
<b>Tabela 7</b> – CIAIFc recuperada das frações da pele (EC, FP e PR) e da pele inteira após 12 h de permeação passiva <i>in vitro</i> , a partir do complexo CIAIFc-HP- $\beta$ CD (n=5). EC: Estrato Córneo; FP: Folículo Piloso; PR: Pele Remanescente. ....	59

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

(m/m)	massa/massa
(m/v)	massa/volume
(v/v)	volume/volume
CBC	carcinoma basocelular
CCE	carcinoma de células escamosas
CD	ciclodextrinas
CIAIFc-HP- $\beta$ CD	complexo de cloro-alumínio ftalocianina com hidroxipropil- betaciclodextrina
CIAIFc	cloro-alumínio ftalocianina
CV	coeficiente de variação
DMSO	dimetilsulfóxido
EC	estrato córneo
ERO	espécies reativas de oxigênio
FN	fase normal
FP	folículo piloso
FR	fase reversa
HPLC	cromatografia líquida de alta eficiência
HP- $\beta$ CD	hidroxipropil-betaciclodextrina
LD	limite de detecção
LQ	limite de quantificação
MM	massa molecular
PR	pele remanescente
SBE- $\beta$ CD	sulfabutileter-ciclodextrinas
TFD	terapia fotodinâmica
UV	ultravioleta
UV/VIS	ultravioleta visível
$\alpha$ CD	alfaciclodextrinas
$\beta$ CD	betaciclodextrinas
$\gamma$ CD	gamaciclodextrinas

## SUMÁRIO

<b>1. Introdução .....</b>	<b>1</b>
<b>2. Objetivos.....</b>	<b>4</b>
<b>3. Revisão da literatura .....</b>	<b>5</b>
3.1. Câncer .....	5
3.1.1. Câncer de pele .....	6
3.1.2. Tratamentos convencionais para o câncer de pele .....	10
3.2. Terapia fotodinâmica .....	11
3.2.1. Agentes fotossensibilizantes .....	14
3.3. Cloro-alumínio ftalocianina.....	15
3.4. Complexos com ciclodextrinas.....	17
3.5. Permeação de fármacos através da pele e técnicas para promover a permeação.....	19
3.5.1. Microagulhas .....	20
3.5.2. Iontoforese.....	22
<b>4. Material e Métodos .....</b>	<b>24</b>
4.1. Material .....	24
4.1.1. Pele .....	24
4.1.2. Obtenção de eletrodos.....	25
4.2. Desenvolvimento e validação de método analítico para quantificação da CIAIFc por HPLC com detecção no ultravioleta (UV) .....	27
4.2.1. Condições cromatográficas para quantificação da CIAIFc por HPLC .....	27
4.2.2. Validação do método analítico .....	27
4.3. Solubilidade da CIAIFc em diferentes meios .....	30
4.4. Estudo de compatibilidade de sólidos através de análises térmicas por DSC e DTG.....	31
4.5. Obtenção dos complexos de CIAIFc-CD .....	31
4.6. Caracterização do complexo CIAIFc-HP-βCD .....	32
4.7. Avaliação da citotoxicidade de CIAIFc-HP-βCD .....	32
4.7.1. Citotoxicidade da CIAIFc-HP-βCD.....	32
4.7.2. Avaliação da citotoxicidade do complexo CIAIFc-HP-βCD após aplicação de TFD.....	33
4.8. Estabilidade elétrica do complexo CIAIFc-HP-βCD .....	33

4.9. Estudos <i>in vitro</i> de permeação do complexo CIAIFc-HP- $\beta$ CD em pele de suínos .....	34
4.10. Análise estatística .....	37
<b>5. Resultados e Discussão .....</b>	<b>38</b>
5.1. Desenvolvimento e validação de método analítico para quantificação de CIAIFc por HPLC .....	38
5.1.1. Otimização das condições cromatográficas .....	38
5.1.2. Seletividade .....	40
5.1.3. Robustez .....	40
5.1.4. Linearidade .....	41
5.1.5. Limite de Detecção e Limite de Quantificação .....	42
5.1.6. Precisão.....	43
5.1.7. Exatidão/Recuperação.....	43
5.2. Determinação da solubilidade da CIAIFc em diferentes meios .....	45
5.3. Estudo de compatibilidade de sólidos por análises térmicas por DSC e DTG .....	46
5.4. Obtenção e caracterização dos complexos CIAIFc-HP- $\beta$ CD .....	49
5.4.1. Espectroscopia de absorção e emissão de fluorescência .....	51
5.5. Avaliação <i>in vitro</i> da citotoxicidade do complexo de CIAIFc-HP- $\beta$ CD .....	53
5.5.1. Avaliação da citotoxicidade.....	53
5.5.2. Avaliação da citotoxicidade sem luz e após TFD .....	54
5.6. Estabilidade elétrica da CIAIFc complexada.....	57
5.7. Estudos <i>in vitro</i> de permeação do complexo de CIAIFc-HP- $\beta$ CD em pele de suínos utilizando microagulhamento e iontoforese.....	59
<b>6. Síntese dos resultados .....</b>	<b>64</b>
<b>7. Conclusão.....</b>	<b>65</b>
<b>8. Referências Bibliográficas .....</b>	<b>66</b>
<b>9. Anexos .....</b>	<b>77</b>
9.1. Comitê de ética .....	77
9.2. Artigos publicados.....	77
9.2.1 CIAIFc.....	77
9.2.2 Oxaliplatina .....	78

## 1. Introdução

A terapia fotodinâmica (TFD) é uma modalidade terapêutica que vem sendo investigada clinicamente para o tratamento localizado de várias patologias cancerígenas ou pré-cancerígenas, como queratose actínica, doença de Bowen's, carcinoma de células escamosas e carcinoma basocelular (LEE e KLOSER, 2013; WESTERS-ATTEMA et al., 2015). Na TFD tópica, um agente fotossensibilizante é administrado ao paciente através da pele e se acumula no tecido afetado pelo tumor; essa área é então exposta à luz no comprimento de onda de absorção máxima do fotossensibilizante. Após a irradiação, o agente fotossensibilizante absorve fótons e inicia uma reação fotoquímica produzindo espécies de oxigênio altamente reativas (como  $^1O_2$ ) no local. Essas espécies são responsáveis pela morte do tecido em tratamento por meio de uma complexa reação bioquímica em cascata (ROBERTS e CAIRNDUFF, 1995).

A liberação do agente fotossensibilizante diretamente no local de ação, aliada ao fato de a TFD ser extremamente seletiva ao tecido tumoral, faz desse tipo de estratégia uma das mais vantajosas, se comparada a outras abordagens mais comumente utilizadas no tratamento do câncer de pele, como cirurgia, radioterapia ou quimioterapia, uma vez que não é invasiva e se minimizam efeitos adversos e tóxicos importantes para o paciente, como náusea, vômitos, perda de cabelo e fraqueza, que comprometem o sucesso da terapia.

As ftalocianinas são agentes fotossensibilizantes de segunda geração, que têm mostrado uma alta eficiência fotodinâmica no tratamento de tumores, além de apresentarem efeitos fototóxicos adversos reduzidos (BEEBY et al., 2001) e alta afinidade ao tecido tumoral (SEKIYA et al., 1988). Essas moléculas possuem uma meia-vida na forma de tripleto aumentada em relação a compostos de gerações anteriores, o que favorece sua reação com o substrato. A fotossensibilidade cutânea resultante da administração de ftalocianinas tem mostrado também ser bem menos acentuada do que com o Photofrin II<sup>®</sup>, que é um agente fotossensibilizante comercial de primeira geração. A cloro-alumínio ftalocianina (CIAIFc) é um agente fotossensibilizante relativamente novo, que se destaca por mostrar alta eficiência fotodinâmica (TAPAJÓS et al., 2008; LONGO et al., 2009; ROCHA et al., 2012; BICALHO et al., 2013; MUEHLMANN et al., 2014).

A maior limitação para a aplicação tópica das ftalocianinas, incluindo a CIAIFc, é o fato de serem substâncias muito lipofílicas que, além de apresentarem alta taxa de agregação, o que reduz seu efeito fotofísico, dificilmente atravessam a pele em quantidades suficientes para se obter efeito biológico adequado (YOSHIDA e ROBERTS, 1992). Entre os vários métodos empregados com o intuito de aumentar a penetração cutânea de fármacos – como adição de promotores cutâneos à formulação ou sua incorporação em sistemas nanoparticulados –, a iontoforese e a aplicação de microagulhas são estabelecidas como estratégias muito promissoras para estimular a penetração tópica e transdérmica de moléculas (JADOUL et al., 1999; KANIKKANNAN et al., 1999; GRATIERI et al., 2008; GELFUSO et al., 2008, 2011, 2013).

As microagulhas são pequenas agulhas de dimensões micrométricas utilizadas para perfurar o estrato córneo (EC), que é a camada de proteção mais externa da epiderme que limita a permeação de fármacos para o tecido subcutâneo. A abertura de pequenos orifícios somente no EC e epiderme viável, facilita o uso da via transdérmica com a liberação de moléculas grandes que teriam dificuldade em transpor a barreira do EC, além de ser uma terapia não invasiva e indolor, por não atingir regiões vascularizadas da derme (REIS et al., 2014). Ainda assim, a CIAIFc deve estar inserida em uma formulação que impeça sua agregação e facilite sua administração na pele microporada.

Já a iontoforese trata-se de um método físico não-invasivo e seguro, que consiste na aplicação de uma corrente elétrica de baixa intensidade, a qual propicia a liberação de moléculas carregadas ou não carregadas para a pele (LOPEZ et al., 2004). Muitos estudos já relatam o sucesso ao utilizarem a iontoforese para aumentar a penetração de compostos fotoativos, como porfirinas, 5-ALA e a ftalocianina tetrassulfonada (LOPEZ et al., 2003; GELFUSO et al., 2008; GELFUSO et al., 2011; SOUZA et al., 2011). No entanto, a aplicação da iontoforese para melhorar a liberação de compostos altamente lipofílicos, como é o caso da CIAIFc, é bastante limitada devido à baixa solubilidade em água e ausência de carga elétrica dessa molécula.

A baixa solubilidade aquosa da CIAIFc pode ser contornada complexando o agente fotossensibilizante com ciclodextrinas (CD). CD são oligossacarídeos cíclicos com forma espacial tronco-cônica que apresentam superfície externa

hidrofílica e cavidade central lipofílica, com larga aplicação na área de liberação de fármacos. Isto ocorre porque as CD conseguem aumentar solubilidade, estabilidade, segurança e biodisponibilidade de várias substâncias utilizadas na terapêutica (ZHANG e MA, 2013). Além disso, alguns complexos de CIAIFc em  $\beta$ -CD demonstraram melhorar as características fotofísicas dessa molécula (SILVA et al., 2011). No entanto, até o momento, a permeação tópica do agente fotossensibilizante ainda não foi determinada.

Para tornar a CIAIFc mais adequada para administração tópica e propícia para sofrer influência da iontoforese em sua penetração cutânea, esse trabalho propôs o desenvolvimento de complexos do agente fotossensibilizante CIAIFc com CD, de modo a aumentar a solubilidade do agente fotossensibilizante e então possibilitar seu acúmulo no tecido tumoral. De acordo com a literatura, essa também é a primeira vez que a iontoforese de um complexo contendo um agente fotossensibilizante será investigada para promover sua penetração cutânea.

## 2. Objetivos

Este trabalho teve como objetivo preparar e caracterizar complexos de CIAIFc com ciclodextrina e avaliar o efeito da iontoforese e de microagulhas para promover a penetração cutânea desses complexos, visando um tratamento de tumores cutâneos mais seguro e não invasivo baseado em terapia fotodinâmica.

Os objetivos específicos do trabalho foram:

- Padronizar e validar um método analítico por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) com detecção no UV/Vis para quantificar a CIAIFc extraída da pele e dar suporte ao desenvolvimento das formulações;
- Determinar a solubilidade da CIAIFc;
- Obter e caracterizar os complexos da CIAIFc com HP- $\beta$ CD (CIAIFc-HP- $\beta$ CD);
- Caracterizar a atividade fotodinâmica do complexo CIAIFc-HP- $\beta$ CD;
- Avaliar *in vitro* a atividade citotóxica do complexo CIAIFc-HP- $\beta$ CD com e sem aplicação de luz, frente a linhagem celular de câncer de pele melanoma;
- Verificar a estabilidade elétrica da CIAIFc e do complexo CIAIFc-HP- $\beta$ CD;
- Estudar *in vitro* a permeação da CIAIFc com utilização de microagulhas a partir do complexo CIAIFc-HP- $\beta$ CD;
- Estudar *in vitro* a permeação iontoforética da CIAIFc a partir do complexo CIAIFc-HP- $\beta$ CD.

### 3. Revisão da literatura

#### 3.1. Câncer

O câncer pode ser definido como um conjunto de doenças proveniente de uma proliferação anormal, desordenada e complexa de células (INCA, 2018), que formam um tecido tumoral heterogêneo com vários níveis de diferenciação e proliferação celular, vascularização, inflamação e invasividade (HANAHAN e WEIBERG, 2011). Sabendo que existem mais de 100 tipos diferentes de câncer e subtipos de tumores que podem se espalhar por todas as regiões do corpo (INCA, 2018), seis alterações na fisiologia celular podem justificar todos, ou quase todos os casos de crescimento maligno (HANAHAN e WEIBERG, 2000 e 2011). Essas alterações podem ser resumidas em:

1. Auto suficiência em sinais de crescimento: as células tumorais geram seus próprios sinais de crescimento e, portanto, possuem menor dependência de estímulo do microambiente, interrompendo assim um mecanismo homeostático que garante um comportamento adequado das células dentro de cada tecido;

2. Insensibilidade aos sinais de inibição do crescimento: perda dos sinais antiproliferativos para manter as células quiescentes, a homeostase do tecido e para bloquear a proliferação;

3. Evasão de programação de morte celular (apoptose): células cancerígenas possuem resistência adquirida contra a apoptose devido à perda do regulador proapoptótico através da mutação do gene p53;

4. Potencial replicativo ilimitado: células normais possuem potencial replicativo finito, chamado de senescência (interrupção do crescimento/duplicação celular). No câncer, a senescência pode ser contornada pela desativação da proteína supressora do tumor p53;

5. Angiogênese sustentada: as células cancerígenas formam sua rede de capilares e vasos sanguíneos para fornecimento de oxigênio e nutrientes para a proliferação celular descontrolada;

6. Invasão e metástase de tecido: células cancerígenas escapam da massa tumoral e invadem novos tecidos onde há mais espaço e nutrientes que o local inicial. A metástase dependerá da ocorrência das cinco características citadas anteriormente.

As características das células cancerígenas geram massas tumorais que podem acometer qualquer tecido ou órgão do corpo humano (INCA, 2018). De acordo com o *American Cancer Society* (2018), há uma estimativa de 1.735.350 novos casos de câncer nos Estados Unidos para o ano de 2018, com 609.640 mortes. Esses dados indicam a descoberta de três novos casos e uma morte por minuto no país.

No Brasil, o câncer de pele corresponde a mais de 30% de todos os tipos de neoplasias diagnosticadas, sendo o de maior incidência e menor mortalidade (INCA, 2018; SBD, 2018). Desse total, 171.840 novos casos de câncer de pele melanoma e não-melanoma são esperados, com a estimativa de 2.316 mortes entre homens e mulheres. Os dados estatísticos para câncer de pele melanoma e não-melanoma no país fornecidos pelo INCA para o ano de 2018 podem ser observados na Tabela 1 abaixo.

**Tabela 1** – Dados estatísticos de estimativa de novos casos e número de mortes com cânceres de pele dos tipos melanoma e não-melanoma para o ano de 2018 (FONTE: INCA, 2018).

	Melanoma		Não-melanoma	
	Homens	Mulheres	Homens	Mulheres
Estimativa de novos casos	2920	3340	85170	80410
Número de mortes	903	644	1000	769

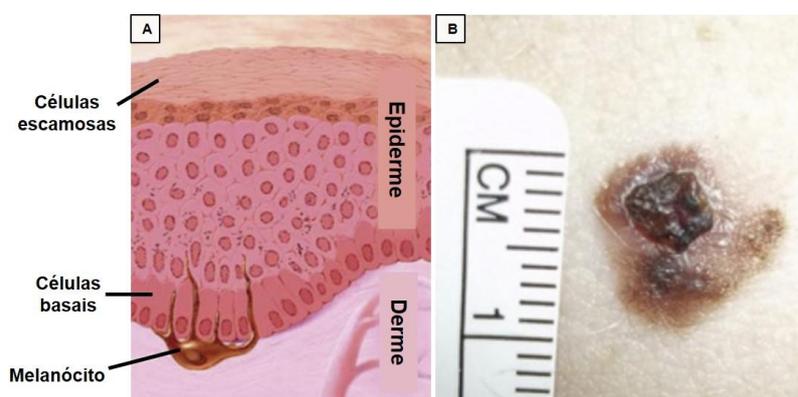
### 3.1.1. Câncer de pele

O principal fator de risco modificável para o câncer de pele é a exposição excessiva aos raios UV, principalmente, entre o período de 10 h e 14 h quando a incidência desses raios é maior (KARAGAS et al., 2007). Estudos apontam que a redução da exposição ao sol durante a infância e adolescência poderia reduzir em 78% o risco de desenvolver câncer de pele não-melanoma ao longo da vida (GELLER et al., 2002), porque há uma correlação entre a exposição acumulativa/crônica ao sol e o câncer de pele (CHANG et al., 2010). Embora a exposição total e ocupacional ao sol pareça estar associada principalmente ao desenvolvimento do carcinoma de células escamosas (CCE), tanto o melanoma

maligno quanto o carcinoma basocelular (CBC) estão associados à exposição ao sol não ocupacional ou recreativa (KVASNIAK e GARCIA-ZUAZAGA, 2011).

O câncer de pele pode ser definido pelo crescimento anormal e descontrolado das células que compõem a pele. Esse tipo de câncer pode ser dividido em dois grandes grupos: o Melanoma e o Não-Melanoma. Este último grupo engloba o câncer de Células de Merkel, Linfoma de pele, Sarcoma de Kaposi, CBC e CCE, sendo os dois últimos os de maior incidência (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2018).

O melanoma, melanoma maligno ou melanoma cutâneo é um câncer formado a partir dos melanócitos (Figura 1A). Essas células são as responsáveis pela produção da melanina, que pigmenta a pele, além de proteger camadas mais profundas da pele de alguns efeitos nocivos do sol (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2018). Geralmente, são identificados como sinais ou pintas assimétricas, com borda irregular, cor variável, diâmetro maior que 6 mm e evolução de mudanças dessas características, como pode ser observado na Figura 1B. Apesar de representar apenas 3% das neoplasias malignas de câncer de pele e possuir maior ocorrência em pessoas de pele clara, ele é um dos mais graves por apresentar altos índices de metástase (INCA, 2018).



**Figura 1** – Camadas da pele indicando a célula de melanócito (A) e melanoma com suas características habituais como pinta assimétrica, com borda irregular, cor variável e diâmetro maior que 6 mm (B) (Adaptado de GORDON, 2013).

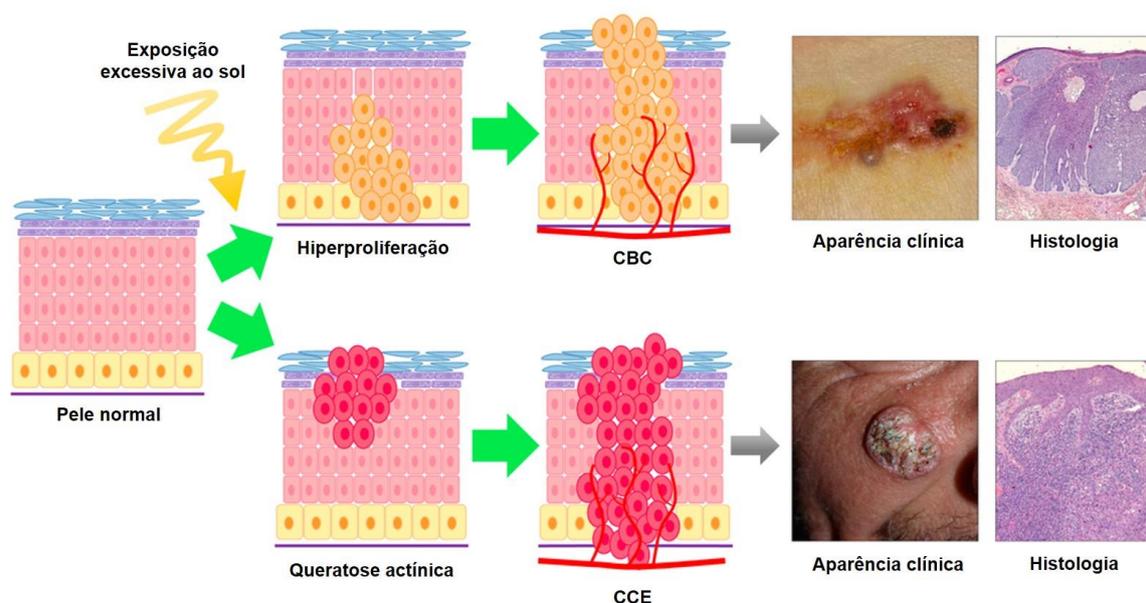
O CBC é o câncer mais comum dentro da neoplasia classificada como não-melanoma. A maioria deles resulta de dano no DNA sofrido por exposição ao sol recreativa intermitente (ARMSTRONG e KRICKER, 2001) e, aproximadamente,

65% dos casos apresentam mutação no gene PTCH. O restante tem mutações em genes associados com a mesma cascata de sinalização (HUTCHIN et al., 2005). Todos são localmente invasivos, mas dificilmente um CBC evolui para a metástase porque o crescimento das células cancerígenas é altamente dependente de um estroma específico consistindo de tecido conjuntivo solto com fibroblastos dérmicos e fibras de colágeno finas. Dentro deste tecido, as células danificadas expressam metaloproteinases e colagenases que degradam o tecido circundante (LEE e MILLER, 2009).

Os CBC se desenvolvem principalmente nos locais com maior número de unidades polissebáceas, explicando o porquê da alta incidência de 80% em regiões de cabeça e pescoço e 15% no tronco. Não há um padrão de crescimento histológico característico e nem uma lesão precursora. Portanto, o CBC pode ter diferentes apresentações clínicas e histopatológicas (Figura 2). Os principais subtipos clínicos são os nodulares, superficiais e infiltrantes, sendo os nodulares responsáveis por 60% de todos os casos. Quando não tratado, esse tumor com pigmento azul, marrom ou preto pode crescer lentamente até muitos centímetros, destruindo o tecido local circundante, cartilagem e osso. Os de características superficiais possuem um padrão de crescimento, predominantemente crescimento horizontal como placas finas eritematosas, podendo se tornar invasivos com o tempo. Por fim, os CBC infiltrantes são vistos como placas vermelhas ou brancas indeterminadas, com bordas sem definição e levemente elevadas, muitas vezes confundida com cicatrizes (RUBIN et al., 2005; LEE e MILLER, 2009).

Já o CCE é um câncer de pele não-melanoma mais agressivo do que o CBC. A exposição da pele normal a quantidades significativas de radiação solar, gera danos do DNA com mutações do gene p53 – com produção de células tumorais resistentes à apoptose –, ocasionando uma expansão e replicação de queratinócitos (LEE e MILLER, 2009). Acredita-se que o CCE seja iniciado com apenas um queratinócito (PONTEN, 1998) e, após seu desenvolvimento ao longo do tempo, mutações afetam genes importantes na proliferação celular, diferenciação, migração e apoptose. Esse processo é vantajoso para o crescimento seletivo das células cancerígenas, ocasionando uma maior instabilidade genética e, conseqüentemente, uma maior capacidade de metástase (LEE e MILLER, 2009).

O CCE pode ser benigno ou maligno, apresentar diferenças clínicas e diferentes graus de invasividade, podendo evoluir de CCE local para invasivo e, por fim, metastático. A proporção de CCE cutâneo com metástase é de aproximadamente 4% (BRANTSCH et al., 2008). A queratose actínica, é uma doença pré-cancerígena, caracterizada como uma lesão primária que apresenta uma placa eritematosa em diferentes tonalidades de branco ou amarelo. Estima-se que de 5 a 10% de queratoses actínicas evoluam para CCE (PATEL et al., 2011). O estágio prematuro e não invasivo do CCE é conhecido como Doença de Bowen e apresenta uma placa eritematosa, escamosa e ligeiramente elevada. O CCE invasivo pode crescer lento ou rapidamente e é caracterizado como pápulas, placas ou nódulos eritematosos, muitas vezes, com ocorrência de sangramentos intermitentes (Figura 2). As lesões não tratadas podem tornar-se indurações hiperqueratóticas e, às vezes, ulcerativas. Os queratoacantomas são uma variação de CCE que apresentam um nódulo de crescimento rápido com uma cratera central com muito material queratinoso, similar a um vulcão (LEE e MILLER, 2009). Devido a variações e possíveis evoluções do CCE, a detecção clínica precoce permite o tratamento correto e evita a invasão e metástase do tumor.



**Figura 2** – Esquema com evolução do carcinoma basocelular (CBC) e carcinoma de células escamosas (CCE) a partir da pele normal e íntegra, exemplificando uma das possíveis aparências clínicas e sua respectiva histologia (Adaptado de LUCENA et al., 2015).

### 3.1.2. Tratamentos convencionais para o câncer de pele

O tratamento adequado para o câncer de pele deve levar em consideração a idade e saúde geral do paciente, o estágio e extensão do câncer e a probabilidade de melhora ou cura dependendo da terapia (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2018), sabendo que todos os tratamentos possuem vantagens e desvantagens. Os tratamentos para cânceres superficiais utilizam a criocirurgia, curetagem e cauterização, entre outros. Quando há uma neoplasia mais grave, a terapia pode ser resumida em cirurgia, quimioterapia e/ou radioterapia, sendo as duas últimas utilizadas também como adjuvantes da opção cirúrgica ou dos tratamentos locais.

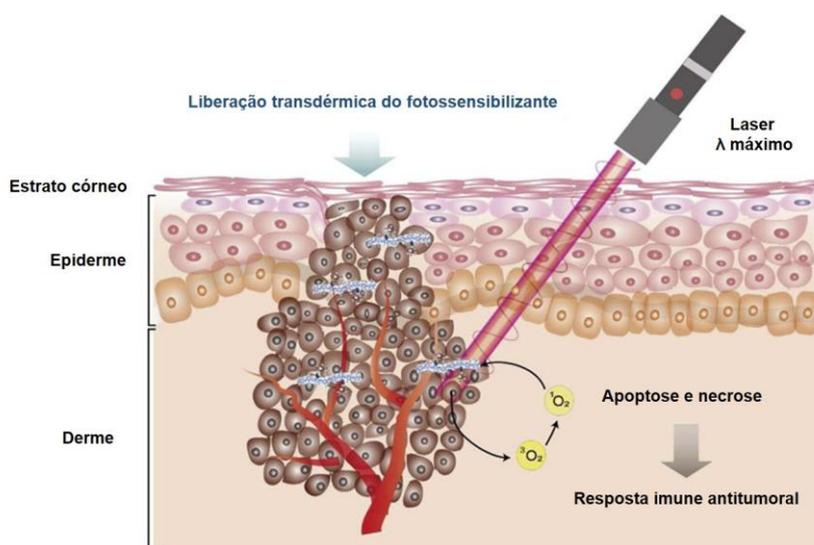
A radioterapia é, geralmente, utilizada para o tratamento de tumores malignos sólidos (BROWN et al., 2004) e, dentre os efeitos indesejados, a irradiação dos tecidos vizinhos pode aumentar a probabilidade de ocorrência de um segundo tumor ou, ainda, desenvolvimento de leucemia (MASSAMS et al., 2011). A quimioterapia é o tratamento recomendado aos pacientes com neoplasias em estágio avançado, metástase ou risco de recidivas. No entanto, a inespecificidade dos agentes quimioterápicos para células neoplásicas levam os pacientes a sofrerem com os diversos efeitos colaterais devido à sua toxicidade, além de ocorrer resistência frente ao tratamento (INCA, 2013). As altas taxas de eventos adversos induzidos pela quimioterapia sistêmica muitas vezes representam um fator limitante para o sucesso global do tratamento.

Em tratamentos tópicos, como na curetagem, o tecido tumoral é raspado até uma camada íntegra de derme. A técnica é rápida e econômica para lesões superficiais como de CBC, mas não há precisão nas bordas do tumor. Estudos relatam taxa de cura global variando de 91 a 97% em 5 anos (ROWE et al., 1989; BARLOW et al., 2006). No entanto, outros estudos relataram taxas de 19 a 27% de recorrência (THISSEN et al., 1999; JULIAN et al., 2009). A técnica da curetagem é efetiva para tumores de baixo risco, mas não é recomendada para tratar áreas com muito crescimento capilar, depende da habilidade e experiência de pessoa capacitada para distinguir a derme normal do tecido tumoral e, por fim, deve-se realizar biópsia do tecido tumoral retirado para garantir que não existam características patológicas de alto risco que exijam a combinação de outra terapia (BICHAKJIAN et al., 2016).

Nesse cenário, a terapia fotodinâmica (TFD) apresenta-se como uma modalidade nova e mais segura como tratamento de primeira linha ou neoadjuvante de câncer de pele.

### 3.2. Terapia fotodinâmica

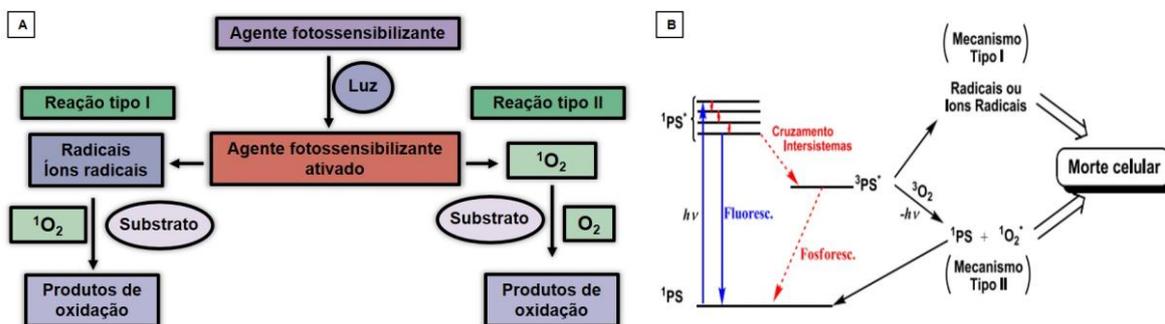
Na TFD tópica ou sistêmica, um agente fotossensibilizante é administrado ao paciente através das vias epidérmicas ou intravenosa, respectivamente, e se acumula no tecido afetado pelo tumor, mas sem nenhum efeito terapêutico. Essa área é então exposta à luz no comprimento de onda de absorção máxima do fotossensibilizante (Figura 3). Após a irradiação, o agente fotossensibilizante ativado absorve fótons e inicia uma reação fotoquímica produzindo espécies reativas de oxigênio (ERO) no local, que são tóxicas às células cancerígenas e inibem o crescimento tumoral (HENDERSON e DOUGHERTY, 1992; DOLMANS et al., 2003; CALZAVARA-PINTON et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2015).



**Figura 3** – Ilustração da aplicação da TFD em câncer de pele melanoma. Incidência de laser no comprimento de onda de absorção máxima do agente fotossensibilizante após sua permeação na pele (adaptado de BEACK et al., 2015).

Na TFD, após a absorção de luz, o agente fotossensibilizante é excitado e sai do seu estado fundamental ( $1\text{ PS}$ ) e vai para o estado singleto ( $1\text{ PS}^*$ ). Em seguida, ele pode retornar ao estado fundamental, emitindo energia por fluorescência ou ir para o estado excitado de tripleto ( $3\text{ PS}^*$ ). Nesse último estado

de tripleto, pigmentos orgânicos possuem níveis de energia compatíveis para transferir energia para o oxigênio molecular ( $O_2$ ). Assim, o  $O_2$  que ocorre naturalmente no estado tripleto ( $3 O_2$ ) é excitado pelo agente fotossensibilizante ( $3 PS^*$ ), indo para o estado singleto ( $1 O_2^*$ ). O estado singleto forma ERO altamente reativas às moléculas biológicas, causando destruição celular. Esse mecanismo é conhecido como mecanismo de reação tipo II. No mecanismo de reação do tipo I, o  $3 PS^*$  pode interagir diretamente com a membrana celular e formar radicais com a transferência de um elétron. Os radicais formados então reagem com o oxigênio para formar ERO, que inibirá o crescimento celular no local (HENDERSON e DOUGHERTY, 1992; DOLMANS et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2015) (Figura 4).



**Figura 4** – Esquema simplificado dos mecanismos de reação do tipo I e II das espécies reativas de oxigênio mediadas por luz (adaptado de DOLMANS et al., 2003 (A); fonte: OLIVEIRA et al., 2015 (B)).

Por definição, os três estados eletronicamente excitados, superiores ao oxigênio molecular, são conhecidos como oxigênio singleto (MACHADO, 2000). O oxigênio singleto é o principal agente citotóxico na TFD e seu tempo de vida varia de acordo com o solvente que está inserido, sendo inferior a  $0,04 \mu s$  em sistemas biológicos (MOAN e BERG, 1991).

As ERO induzem a necrose e apoptose celular devido à oxidação de lipídios, aminoácidos e proteínas, danificando as membranas plasmáticas, organelas celulares e, principalmente, causando a inibição das enzimas mitocondriais, alterando a permeabilidade e transporte entre os meios intra e extra celular (ROBERTS e CAIRNDUFF, 1995; MORTON, 2004; CALZAVARA-PINTON et al., 2007).

A TFD tópica vem sendo investigada clinicamente para o tratamento localizado de várias patologias cancerígenas ou pré-cancerígenas, como queratose actínica, doença de Bowen's, CCE e CBC (LEE; KLOSER, 2013; WESTERS-ATTEMA et al., 2015, CHOI et al., 2017), além de outros tratamentos cutâneos como acne, fotoenvelhecimento, verrugas, leishmaniose ou psoríase (ISSA e MANELA-AZULAY, 2010).

Guias internacionais descrevem os protocolos de como a TFD tópica deve ser utilizada na prática clínica de acordo com cada patologia, baseado nas experiências clínicas bem sucedidas. Inicialmente, o paciente lava a área a ser tratada com água e sabão e é passado algodão com álcool para a limpeza completa da região. Em seguida, é administrado o agente fotossensibilizante no local e espera-se de 30 min a 4 h para permeação. Posteriormente, é aplicada luz em doses que variam a fluência de 10 a 150 J/cm<sup>2</sup> por, aproximadamente, 20 min. Por fim, a área é novamente lavada para remoção de resíduos do agente fotossensibilizante. As variáveis de cada protocolo dependem da área com a neoplasia, do tipo de lesão e do agente fotossensibilizante utilizado (BRAATHEN et al., 2007; MORTON et al., 2015; OZOG et al., 2016). Em 2011, um consenso internacional foi publicado sobre a TFD com a luz do dia (TFD-D) (WIEGELL et al., 2011), onde é utilizado protetor solar sobre a área lesionada e, em seguida, aplica-se o agente fotossensibilizante. Após a permeação, os pacientes são expostos a luz solar e, ao término da exposição removem o excesso de agente fotossensibilizante e reaplica-se o protetor solar.

No Brasil, o INCA iniciou um estudo clínico com 70 instituições em mais de 6 mil pacientes com o objetivo de definir um protocolo do uso da TFD para o tratamento de CBC (INCA, 2012). Além deste, a literatura apresenta estudos clínicos realizados no Brasil (RAMIREZ et al., 2014) e, principalmente em São Paulo (GRINBLAT et al., 2014) que mostram alta eficácia do uso da TFD e TFD-D para câncer de pele não-melanoma, com a redução de até 86% das lesões superficiais.

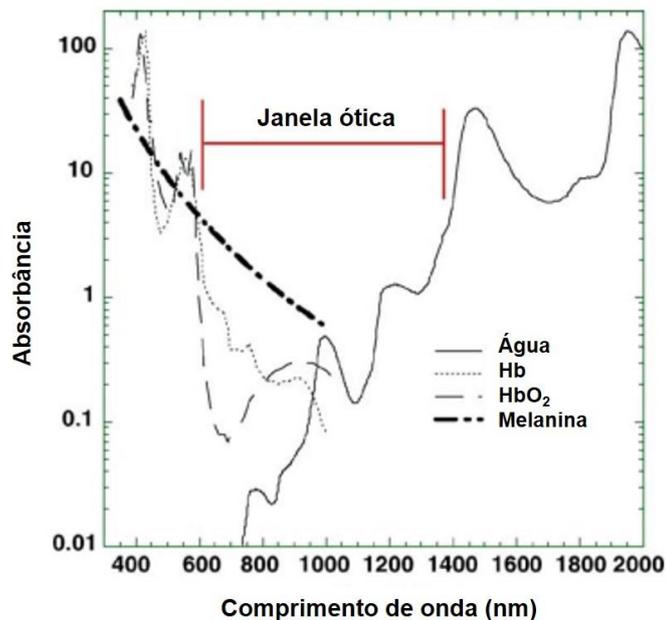
Como mencionado anteriormente, a liberação do agente fotossensibilizante diretamente no local de ação, aliada ao fato da TFD ser extremamente seletiva ao tecido tumoral, faz desse tipo de estratégia uma das mais vantajosas, se comparadas a outras abordagens mais comumente utilizadas no tratamento do

câncer de pele, uma vez que não é invasiva e se minimizam efeitos adversos e tóxicos importantes que comprometem o sucesso da terapia.

### **3.2.1. Agentes fotossensibilizantes**

A TFD é baseada na combinação tripla do agente fotossensibilizante, estímulo por luz e oxigênio. Os agentes fotossensibilizantes devem apresentar características fotofísicas favoráveis à TFD como ser solúvel em água ou em solvente aquoso não tóxico, ter baixa toxicidade na ausência de luz, ter fotossensibilidade não prolongada e farmacocinética que favoreça a eliminação do corpo evitando a necessidade de proteger a pele após o tratamento. Ainda, o agente fotossensibilizante deve possuir baixa agregação em soluções aquosas e matrizes biológicas para não haver redução da eficiência fotoquímica e, principalmente, alta seletividade e penetração no tecido doente em relação ao tecido sadio (CASTANO et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2015). A seletividade dos agentes fotossensibilizantes às células tumorais já ocorre devido à associação dele com lipoproteínas do plasma, que possuem um alto número de receptores de lipoproteínas de baixa densidade e, o transportam para as células anormais (MACHADO, 2000).

A molécula utilizada como agente fotossensibilizante para aplicação da TFD deve possuir bandas de absorção em comprimentos de onda na região do vermelho, variando entre 600 e 850 nm (CASTANO et al., 2004; PLAETZER et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2015). Essa região é conhecida como janela ótica fototerapêutica (Figura 5). Comprimentos de onda menores possuem menor poder de penetração na pele, enquanto em comprimentos de onda maiores não há transferência de energia para as moléculas de oxigênio a partir do estado tripleto PS. Ou seja, irradiações nesses comprimentos de onda proporcionam penetrações de 5 a 20 mm, não há interferência dos cromóforos biológicos naturais da pele e as lesões podem ser tratadas adequadamente (CASTANO et al., 2004; PLAETZER et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2015).



**Figura 5** – Janela ótica para aplicação de TFD, através de espectros de absorção de cromóforos importantes teciduais: água, desoxihemoglobina (Hb), oxihemoglobina (HbO<sub>2</sub>) e melanina (adaptado de CASTANO et al., 2004; PLAETZER et al., 2009).

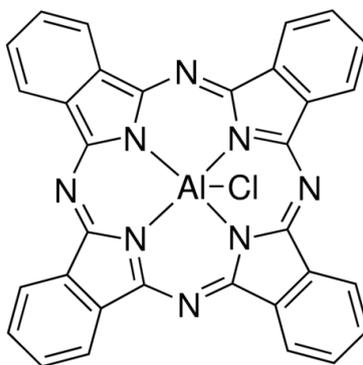
Compostos químicos das classes das porfirinas, clorinas e ftalocianinas têm características fotofísicas ideais para a aplicação de TFD. Esses grupos de moléculas apresentam comprimento de onda de máxima absorção de luz na região compreendida entre 600 e 750 nm e bons rendimentos de oxigênio singleto (OLIVEIRA et al., 2015). A cloro-alumínio ftalocianina (CIAIFc) foi o agente fotossensibilizante utilizado neste trabalho uma vez que suas propriedades contribuem para o sucesso do tratamento de câncer de pele por meio de sua TFD.

### 3.3. Cloro-alumínio ftalocianina

As ftalocianinas são agentes fotossensibilizantes de segunda geração, sintetizadas a partir de uma reação de tetramerização de derivados de ftalimidas, anidrido ftálicos, derivados de idindóis ou ftalonitrilos. Elas possuem quatro grupos com compostos aromáticos geralmente com conformação planar, alta conjugação eletrônica e apresentam bandas de absorção na região de 600 a 750 nm, ideal para aplicação da TFD (BONNETT, 1995; OLIVEIRA et al., 2015). As ftalocianinas têm mostrado uma alta eficiência fotodinâmica no tratamento de tumores, além de apresentarem efeitos fototóxicos adversos reduzidos (BEEBY et al., 2001) e alta

afinidade ao tecido tumoral (SEKIYA et al., 1988). Essas moléculas possuem uma meia-vida na forma de tripleto aumentada em relação a compostos de gerações anteriores, o que favorece sua reação com o substrato. A fotossensibilidade cutânea resultante da administração de ftalocianinas tem mostrado também ser bem menos acentuada do que com o Photofrin II<sup>®</sup>, que é um agente fotossensibilizante comercial de primeira geração.

Ftalocianinas complexadas com elementos como zinco, alumínio e silício apresentam atividade anti-tumoral (BONNETT, 1995). A CIAIFc (Figura 6) é um agente fotossensibilizante, que se destaca por mostrar alta eficiência fotodinâmica (TAPAJÓS et al., 2008; LONGO et al., 2009; ROCHA et al., 2012; BICALHO et al., 2013; MUEHLMANN et al., 2014).



**Figura 6** – Estrutura química da CIAIFc (MM = 574,96 g/mol;  $\lambda_{\text{máx}}$  = 680 nm).

A maior limitação para a aplicação tópica das ftalocianinas, incluindo a CIAIFc, é o fato de serem substâncias muito lipofílicas que, além de apresentarem alta taxa de agregação, o que reduz seu efeito fotofísico, dificilmente atravessam a pele em quantidades suficientes para se obter efeito biológico adequado (YOSHIDA e ROBERTS, 1992). Talvez por essa razão nenhum estudo publicado até o momento mostrou de forma consistente a penetração cutânea de compostos pertencentes a essa classe de fotossensibilizantes.

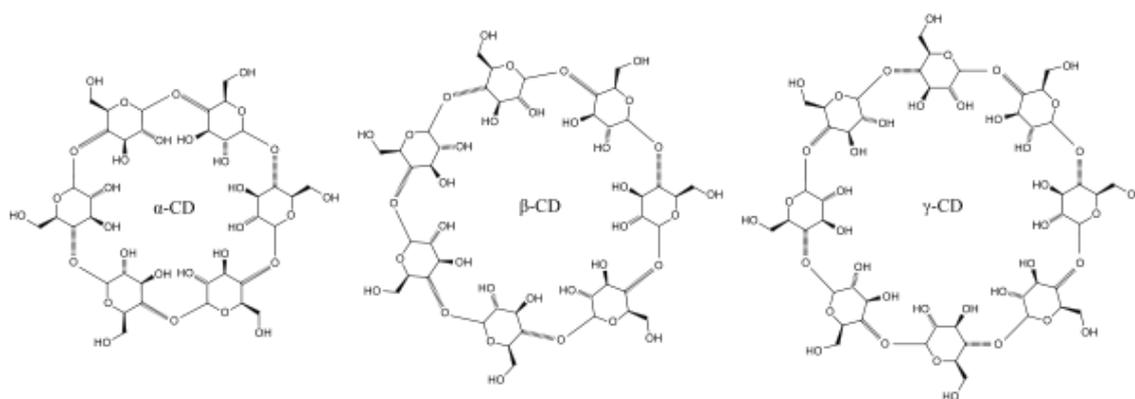
Para tornar a CIAIFc adequada para ser administrada na pele, sobretudo com a aplicação da técnica de iontoforese (item 3.5.2.), esse trabalho propõe o desenvolvimento de complexos do agente fotossensibilizante com hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrinas (HP- $\beta$ CD), de modo a aumentar a solubilidade aquosa da molécula, facilitando a sua formulação, aumentar a estabilidade da molécula que é

obviamente fotossensível e então possibilitar sua adequada liberação para acúmulo no tecido tumoral.

### 3.4. Complexos com ciclodextrinas

As ciclodextrinas (CD) são oligossacarídeos cíclicos que possuem, no mínimo, seis unidades de D-(+) glicopiranosose unidas por ligações glicosídicas. Elas possuem forma espacial tronco-cônica que apresentam superfície externa hidrofílica e cavidade interna lipofílica e, por isso, são capazes de interagir e formar complexos de inclusão com uma ampla variedade de moléculas (CHALLA et al., 2005).

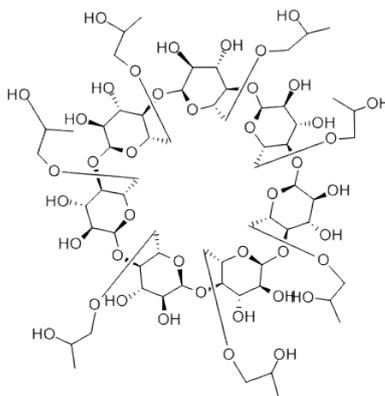
As três CD naturais  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  possuem seis, sete e oito unidades de glicose respectivamente (Figura 7). Não é possível formar CD com menos de seis unidades devido aos impedimentos estéreis dos grupos cíclicos, enquanto CD com mais de nove unidades de glicose são muito difíceis e caras de purificar (CHALLA et al., 2005). As CD possuem larga aplicação na área de liberação de fármacos porque conseguem aumentar a solubilidade, estabilidade, segurança e biodisponibilidade de várias substâncias utilizadas na terapêutica (ZHANG e MA, 2013). Na administração transdérmica, os complexos aumentam a liberação e/ou permeação do fármaco, proporcionam maior estabilidade do fármaco na formulação, controlam sua liberação para a pele e diminuem a irritação cutânea (CHALLA et al., 2005).



**Figura 7** – Estrutura molecular das ciclodextrinas naturais  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  com seis, sete e oito unidades de glicose respectivamente (fonte: BOTELHO et al., 2011).

O tamanho da cavidade interna das  $\alpha$ -CD é pequeno para formar complexos com muitas moléculas de fármacos, enquanto as  $\gamma$ -CD são mais caras. Portanto, as  $\beta$ CD têm sido amplamente utilizadas para aplicações farmacêuticas devido à sua disponibilidade e tamanho adequado de cavidade por comportar maior variedade de moléculas (CHALLA et al., 2005). Além disso, complexos de CIAIFc com  $\beta$ CD e HP- $\beta$ CD previamente preparados demonstraram melhorar as características fotofísicas da molécula fotossensibilizante (SILVA et al., 2011), o que é de relevante interesse para este trabalho.

As  $\beta$ CD apresentam como desvantagem uma baixa solubilidade em meio aquoso quando comparadas com as outras CD. Nesse sentido, CD quimicamente modificadas com óxido de propileno formam as HP- $\beta$ CD (Figura 8) (PITHA et al., 1986), que aumentam as propriedades físico-químicas de solubilidade do complexo, a capacidade de inclusão quando comparadas às  $\beta$ CD e até a permeação de fármacos quando aplicadas na pele (SZEJTLI, 1991; JARHO et al., 1996; CHALLA et al., 2005).



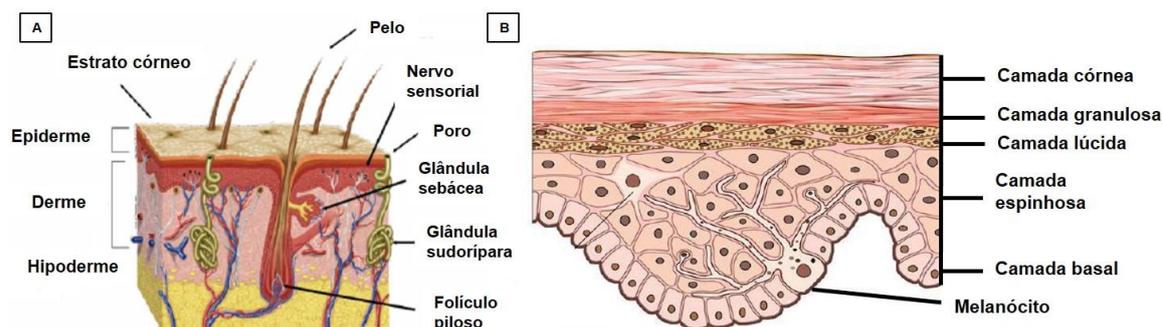
**Figura 8** – Estrutura molecular da hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (HP- $\beta$ CD) (MM = ~1460 g/mol).

A quantidade de fármaco complexada que permeia a pele não é significativa em muitos casos, visto o tamanho molecular do complexo formado e o baixo coeficiente de partição octanol/água da ciclodextrina (CHALLA et al., 2005; LOFTSSON et al., 2005). Por isso, espera-se que a aplicação do complexo na pele concentre a liberação da CIAIFc para o estrato córneo (EC), que é a camada mais externa e lipofílica da pele, à medida que o complexo vá liberando o fármaco. Neste contexto, propõe-se nesse trabalho a utilização das técnicas de iontoforese e

microagulhamento para aumentar a permeação de CIAIFc para camadas mais profundas da pele a partir do complexo de CIAIFc com HP- $\beta$ CD (CIAIFc-HP- $\beta$ CD).

### 3.5. Permeação de fármacos através da pele e técnicas para promover a permeação

A pele é o maior órgão do corpo humano. Anatomico-fisiologicamente, a pele é dividida em epiderme, derme e hipoderme (Figura 9A). A hipoderme, ou tecido subcutâneo, que confere proteção mecânica e térmica ao organismo, está localizada abaixo do sistema vascular. Na derme, encontram-se uma rede de fibras de colágeno e elastina, importantes por conferir à pele propriedades elásticas; é uma camada conjuntiva vascularizada e contém inervações nervosas. Já a epiderme (Figura 9B) é uma camada de proteção, avascular formada por células estratificadas (os queratinócitos). Ela é dividida em camadas basal ou germinativa, espinhosa, granulosa, lúcida e córnea. O EC, camada mais superficial da epiderme, é constituído pelas células mortas queratinizadas, os corneócitos, circundadas por uma matriz de natureza lipídica. Devido à sua estrutura e composição, a camada córnea é a principal barreira limitante à difusão de fármacos para o interior da pele (OBAGI, 2004; GRATIERI et al., 2008; PEREIRA, 2009).



**Figura 9** – Estrutura anatômica da pele dividida em epiderme, derme, hipoderme e anexos (A) e camadas celulares que constituem a epiderme (B) (adaptado de OBAGI, 2004 e PERETTI et al., 2015, respectivamente).

Os fármacos e agentes fotossensibilizantes podem atravessar a barreira do EC através da *via intercelular*, passando ao redor dos corneócitos (células do EC), se difundindo pela matriz lipídica, através da *via transcelular*, atravessando diretamente os corneócitos e a matriz intercelular intermediária, ou por *rotas alternativas* em que eles podem ser absorvidos pelas estruturas capilares,

glândulas sebáceas e/ou sudoríparas (GRATIERI et al, 2008). A via de penetração dos fármacos e a sua permeação através do EC está associada às propriedades físico-químicas de cada ativo, que precisa ter baixa massa molecular, coeficiente de partição adequado, ou seja deve ser lipofílico, mas possuir hidrofiliidade para não ter completa afinidade pelo EC, além da sua concentração na formulação (MICHALUN e MICHALUN, 2011).

Devido a sua alta lipofiliidade, a CIAIFc foi complexada com HP- $\beta$ CD para aumentar sua solubilidade em meio aquoso. Essa complexação apesar de favorecer a sua formulação, aumenta ainda mais o tamanho da molécula de CIAIFc (MM = ~1460 g/mol). Portanto, nesse trabalho foram utilizadas técnicas não invasivas como o uso de microagulhas e iontoforese para promover a maior difusão do agente fotossensibilizante através da pele, facilitando e aumentando a passagem pelo EC.

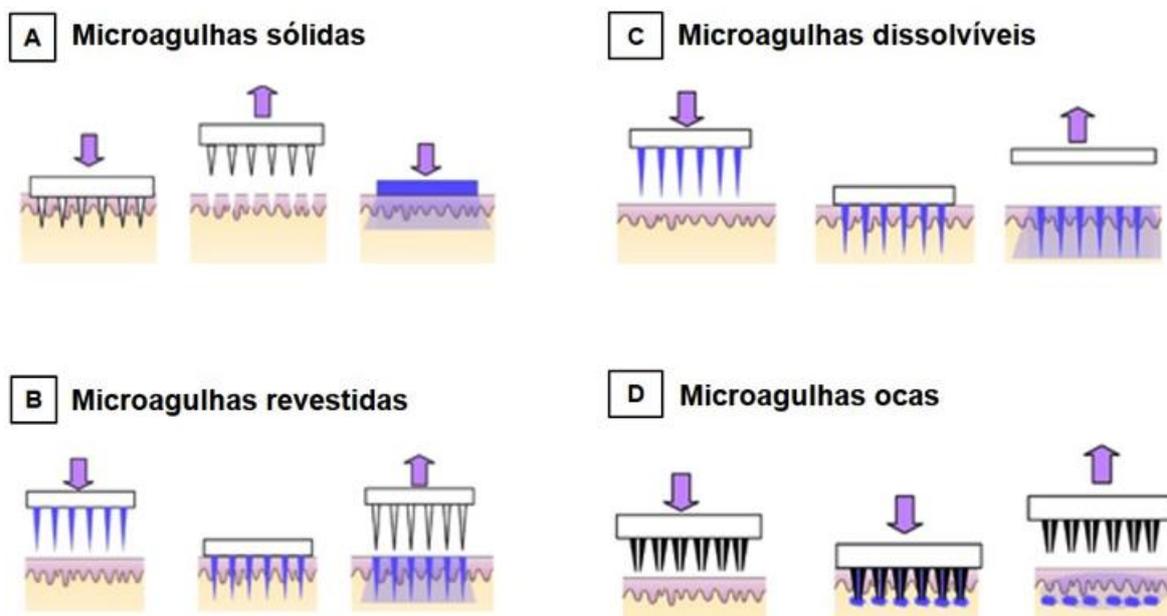
### **3.5.1. Microagulhas**

As microagulhas são um conjunto de agulhas de pequenas dimensões (comprimento variando entre 50 e 900  $\mu$ m), produzidas com os mais diversos tipos de materiais (metais, silicones, açúcares solúveis, polímeros biodegradáveis, vidro, cerâmica), capazes de perfurar somente as primeiras camadas da pele que compreendem o EC e epiderme viável (DONNELLY et al., 2011). Dessa forma, moléculas ativas são liberadas diretamente na epiderme viável sem atingir terminações nervosas que são localizadas na derme e, conseqüentemente, a utilização é indolor ao paciente.

O uso das microagulhas permite uma administração transdérmica de moléculas com alto ou baixo peso molecular de forma segura e eficaz. Em sua maioria são utilizadas substituindo agulhas ou seringas convencionais hipodérmicas (REIS et al., 2014) e podem se apresentar de quatro formas distintas: sólidas, revestidas, dissolvíveis e ocas (Figura 10).

As microagulhas sólidas (Figura 10A) são utilizadas para um esquema de pré-tratamento, em que elas perfuram o EC e epiderme viável para uma posterior aplicação de formulação contendo o fármaco. Assim, há a liberação de fármacos através dos microporos formados. Ou ainda, esse tipo de microagulhas podem ser utilizadas para estimular a produção de colágeno na pele (DODDABALLAPUR, 2009; LIEBL e LUTHER, 2012).

As microagulhas sólidas são de aço inoxidável esterilizadas e comercializadas, usualmente, em oito tamanhos que variam de 0,25 a 2,5 mm. Elas podem estar inseridas em um rolo giratório e seu manuseio acontece através de cabos de polietileno (LEE et al., 2010) ou ainda em equipamento elétrico onde é possível graduar o tamanho da microagulha que perfura o EC dependendo da região corpórea que será utilizado (DERMAPEN, 2018).



**Figura 10** – Microagulhas antes e depois da inserção na pele. Microagulhas sólidas furam a pele e são removidas intactas (A); microagulhas revestidas furam a pele, o revestimento fica na epiderme e as microagulhas são removidas intactas (B); microagulhas dissolvíveis são formadas pelo ativo de interesse e fica retida na pele após a inserção (C); microagulhas ocas furam o EC para a formulação ser injetada e depois é retirada também intacta da pele (D) (adaptado de REIS et al., 2014).

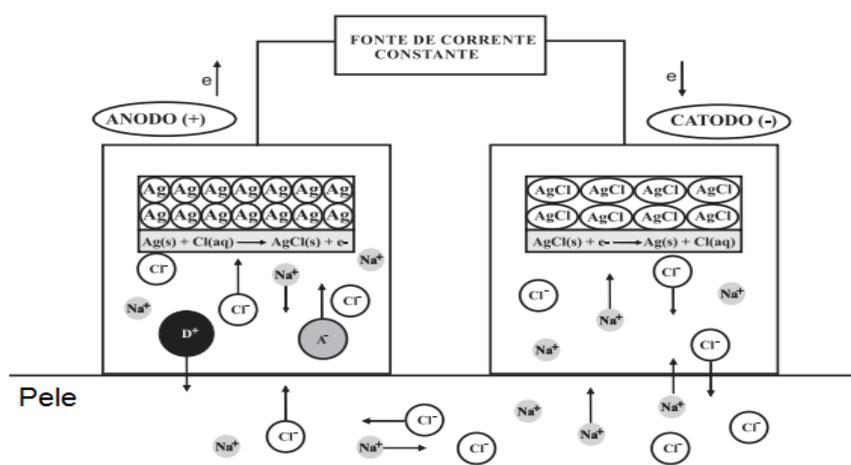
As microagulhas revestidas (Figura 10B) são fabricadas com material inerte e revestidas com a formulação contendo o ativo de interesse. Após a perfuração do EC, o revestimento das microagulhas é liberado na pele e elas são retiradas intactas.

Nas microagulhas dissolvíveis/biodegradáveis (Figura 10C), a formulação com o ativo de interesse compõe a microagulha, que é produzida com uma matriz biodegradável e, após a inserção na pele, ela se dissolve ou é degradada por enzimas cutâneas e libera o ativo gradativamente.

Por fim, as microagulhas ocas (Figura 10D) diferem das tradicionais agulhas hipodérmicas apenas pelo tamanho, de modo que a formulação contendo o princípio ativo é injetada na pele e, em seguida, a agulha é retirada intacta de maneira indolor ao paciente (REIS et al., 2014).

### 3.5.2. Iontoforese

A iontoforese é uma técnica não invasiva que consiste na aplicação de uma corrente elétrica de baixa intensidade (de até  $0,5 \text{ mA/cm}^2$ ), permitindo que uma maior quantidade de fármacos ionizados ou não, solúveis em água, e que não apresentariam potencial para se transportarem através da pele, consigam de fato atravessar o EC e atingir as camadas cutâneas mais profundas (KALIA et al., 2004; GRATIERI et al., 2008; DUBEY e KALIA, 2011; GELFUSO et al., 2011). Uma fonte de energia ou bateria é responsável por gerar corrente elétrica de baixa intensidade e baixa voltagem, que é distribuída por eletrodos positivo e negativo para a pele através de uma solução eletrolítica aplicada sobre sua superfície (Figura 11) (LOPEZ et al., 2001; LOPEZ et al., 2003). Assim, a quantidade de fármaco transportada para o tecido pode ser controlada pela intensidade da corrente e duração da aplicação, assim como pela área de exposição na pele da formulação em contato com o eletrodo (GRATIERI et al., 2008).



**Figura 11** – Iontoforese utilizando sistemas de eletrodos de Ag/AgCl. O ânodo contém um fármaco ionizável  $\text{D}^+$  e seu contra íon  $\text{A}^-$  e  $\text{Na}^+\text{Cl}^-$  (Adaptado de KALIA et al., 2004).

Os dois mecanismos que explicam o transporte iontoforético de substâncias são a eletromigração e a eletrosmose. A eletromigração está ligada à movimentação ou fluxo dos íons em presença de corrente elétrica. Logo, moléculas positivamente carregadas colocadas em contato com o eletrodo positivo, por repulsão de cargas, são transportadas para o interior da pele e o oposto também é verdadeiro (KALIA et al., 2004; GRATIERI et al., 2008). Já a eletrosmose está ligada à movimentação de íons que ocorre quando existe uma diferença de potencial elétrico aplicado sobre a pele, que é um tecido que varia sua quantidade de cargas superficiais dependendo do pH em que é mantido. Como a pele humana é negativamente carregada em pH fisiológico ( $pK_a$  da pele = 4,5), há favorecimento do transporte de cátions, em especial o  $Na^+$  do eletrodo positivo em direção à pele durante a aplicação de uma corrente elétrica, levando consigo um volume de solvente a partir deste eletrodo. Assim, substâncias colocadas em contato com o eletrodo positivo, independentemente de ter carga ou não, conseguem ser transportadas para dentro da pele levadas por esse fluxo aquoso (GRATIERI et al., 2008).

Espera-se, desta forma, que a aplicação da iontoforese sobre a formulação contendo a CIAIFc formando complexos hidrofílicos com CD seja capaz de favorecer a penetração destas estruturas para o interior da pele, estimulando a penetração do agente fotossensibilizante.

## 4. Material e Métodos

### 4.1. Material

A CIAIFc (85%) utilizada foi adquirida da Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha). As HP- $\beta$ CD e SBE- $\beta$ CD utilizadas pertenciam à marca Cavasol<sup>®</sup> W7 Pharma e foram gentilmente doadas pela Ashland (Kentucky, EUA). Metanol grau HPLC utilizado como fase móvel e como solvente extrator do fármaco da pele foi obtido da JTBaker (Pensilvânia, EUA). Hidróxido de sódio para correção de pH, etanol grau HPLC utilizado no estudo de solubilidade, ácido fosfórico utilizado nas análises cromatográficas e Tween<sup>®</sup> 20 utilizado no meio receptor dos estudos de permeação foram adquiridos da Dinâmica Química Contemporânea (São Paulo, Brasil). Todas as soluções aquosas foram preparadas com água ultrapurificada (Millipore, Illkirch-Graffenstaden, França).

No ensaio de viabilidade celular, a linhagem celular de câncer de pele melanoma B16F10 foi adquirida da American Type Culture Collection (ATCC). O meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) foi obtido da empresa Gibco (Estados Unidos). O Brometo de 3(4,5dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil-tetrazólio (MTT) foi obtido da empresa Invitrogen (Estados Unidos). Ainda, foram utilizados dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich, EUA) e o tampão fosfato salino PBS (Laborclin, São Paulo, Brasil).

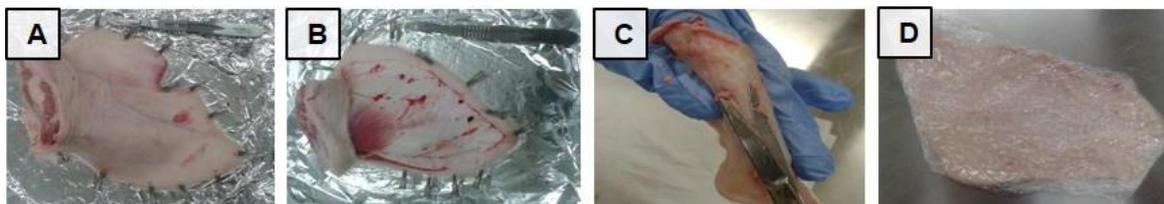
Nas permeações foram utilizados a cola de cianoacrilato e a fita adesiva para realização da técnica de tape stripping da Loctite Super Bonder (São Paulo, Brasil) e da Scotch 3M (Minnesota, Estados Unidos), respectivamente. As microagulhas sólidas em três tamanhos foram adquiridas da marca Derma roller system<sup>®</sup> (Estados Unidos). Filtros 0,22 e 0,45  $\mu$ m foram obtidos da Analítica (São Paulo, Brasil).

Os eletrodos para iontoforese foram preparados com fio de prata (Ag) 1,0 mm, fio de platina (Pt) 0,5 mm e cloreto de prata (AgCl) em pó adquiridos da Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha), e com NaCl obtido pela Serva (Rio de Janeiro, Brasil).

#### 4.1.1. Pele

As orelhas de porco, cuja a pele foi utilizada nos estudos de permeação cutânea, foram gentilmente cedidas pela Bonasa (Brasília, Brasil). As orelhas foram obtidas imediatamente após o abate do animal e antes do processo de escalda. As

peles utilizadas foram removidas das orelhas com auxílio de bisturi. A camada adiposa, muscular e vasos sanguíneos foram removidas com tesoura. As peles limpas foram congeladas por, no máximo três meses, antes do uso (Figura 12).

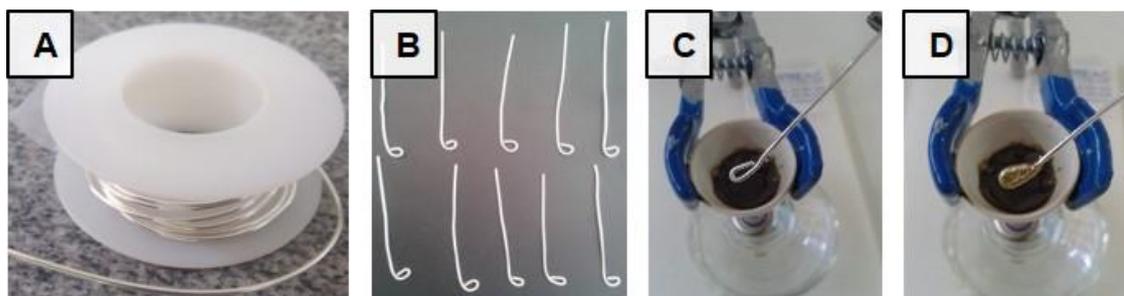


**Figura 12** – Remoção da pele de orelha de porco: a orelha é fixada em placa de isopor recoberta com papel alumínio (A); a pele da parte superior é removida com auxílio de bisturi (B); tecido adiposo e vasos sanguíneos são retirados com auxílio de tesoura (C); pele limpa é embalada e congelada a  $-6^{\circ}\text{C}$  por, no máximo, três meses (D).

#### 4.1.2. Obtenção de eletrodos

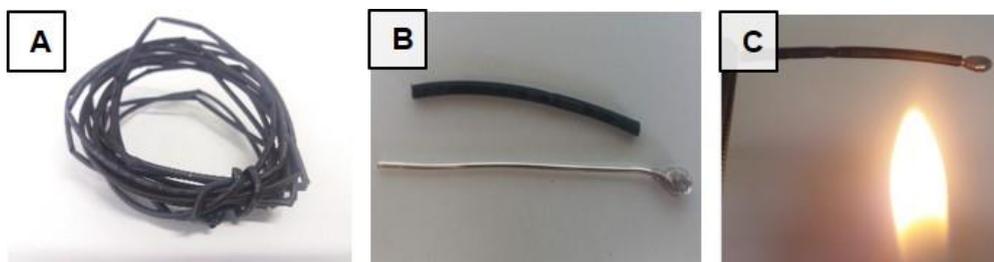
Os eletrodos utilizados para avaliar a estabilidade do fármaco frente à corrente (item 4.7.) bem como nos ensaios de permeação iontoforética (item 4.8.3) foram confeccionados no laboratório utilizando fio de platina 0,5 mm e fio de prata 1,0 mm.

Para preparar o eletrodo de AgCl, o fio de Ag foi cortado em pedaços de, aproximadamente, sete centímetros e uma das pontas foi virada com o auxílio de um alicate. Em seguida, fundiu-se AgCl em pó em cadinho de porcelana. Após a completa fusão do AgCl, o fio de Ag foi mergulhado três vezes no AgCl fundido, formando um eletrodo de superfície lisa e uniforme (Figura 13).



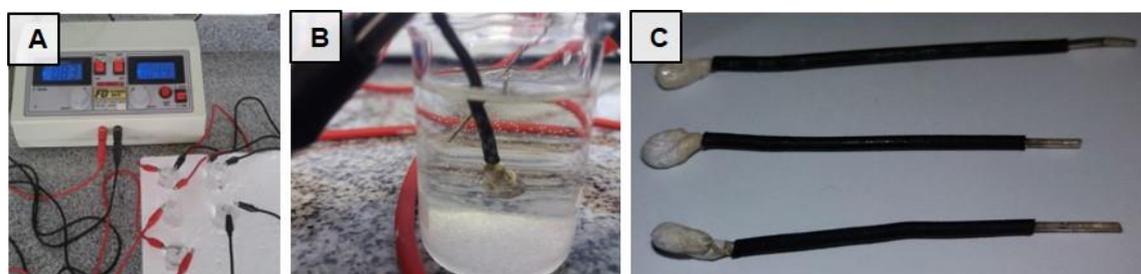
**Figura 13** – Confeção do eletrodo de cloreto de prata: fio de prata (A) cortado e com as pontas viradas (B); o fio de prata foi mergulhado em cloreto de prata fundido (C) formando um eletrodo com superfície lisa e uniforme (D).

O fio de Ag de cada eletrodo de AgCl foi encapado com capa termorretrátil com 1,0 mm de diâmetro a fim de evitar a total oxidação. A capa foi medida e cortada para cada eletrodo, encaixada no fio e passada rapidamente no fogo (Figura 14).



**Figura 14** – Capa termorretrátil para encapar o fio de Ag evitando sua oxidação (A); capa termorretrátil cortada no tamanho certo para cada eletrodo (B); capa termorretrátil encaixada no fio e passada sob a chama rapidamente para aderir ao fio de Ag (C).

Para o preparo do eletrodo de Ag, o fio de Pt foi conectado no polo vermelho positivo da fonte. O eletrodo de AgCl, preparado anteriormente, foi colocado no polo preto negativo da mesma fonte. Então, o fio de Pt e o eletrodo de AgCl foram imergidos em solução aquosa com excesso de NaCl. O circuito foi ligado em série para o preparo de vários eletrodos de Ag ao mesmo tempo, com corrente de 1,0 mA, e deixados *overnight* até que a redução ocorresse (Figura 15).



**Figura 15** – Preparo de cinco contra eletrodos de Ag com ligação em série (A); fio de platina e eletrodo de AgCl em água com excesso de NaCl para formação do contra eletrodo de Ag (B) e contra eletrodo de Ag (C).

## **4.2. Desenvolvimento e validação de método analítico para quantificação da CIAIFc por HPLC com detecção no ultravioleta (UV)**

Uma solução metanólica de CIAIFc preparada a uma concentração de 5 µg/mL foi analisada por espectrofotômetro UV/Vis (Shimadzu, UV-1800) usando uma célula de quartzo com comprimento de caminho óptico de 10 mm para se determinar o comprimento de onda de maior absorção para análises por HPLC. Diferentes condições cromatográficas, tais como diferentes colunas (uma fase reversa C<sub>18</sub> e uma coluna de fase normal), composição da fase móvel (60% a 80% de metanol e água acidificada) e taxa de vazão (1,0 mL/min e 1,5 mL/min) foram testados, visando obter picos cromatográficos CIAIFc com desempenho analítico aceitável.

### **4.2.1. Condições cromatográficas para quantificação da CIAIFc por HPLC**

O sistema de HPLC (modelo LC-20AD, Shimadzu, Kyoto, Japão) utilizado foi composto por duas bombas (modelo LC 20-AT), um injetor automático (modelo 9SIL-20AD), um forno (modelo CTO-20AS), um detector espectrofotométrico DAD (modelo SPD-M20A) e um computador equipado com o software de análise Shimadzu LC. Uma coluna uPorasil™ de fase normal (300 mm × 3,9 mm, 10 µm) da Waters (Massachusetts, EUA) foi utilizada como fase estacionária. A fase móvel consistiu em metanol:ácido fosfórico 0,01 M (80:20, v/v), com fluxo isocrático a uma taxa de 1,5 mL/min. O forno foi mantido a 30 °C e a detecção foi realizada em 670 nm. Volumes de amostras de 20 µL foram injetados em cada análise. As soluções estoque de CIAIFc (50,0 µg/mL) foram preparadas por dissolução de 2,5 mg do fármaco em 50 mL de metanol e as soluções de trabalho foram preparadas a partir das soluções estoque por diluição adequada com metanol. Este solvente foi selecionado com base em um estudo de solubilidade preliminar que mostrou que a solubilidade de CIAIFc em metanol foi maior se comparada a outros solventes. A metodologia do teste de solubilidade será descrita no item 4.3 a seguir.

### **4.2.2. Validação do método analítico**

O método analítico foi validado de acordo com os atuais regulamentos de saúde para o controle de qualidade dos medicamentos (ICH, 2005), considerando os parâmetros de seletividade, robustez, linearidade, limite de detecção (LD), limite

de quantificação (LQ), precisão e exatidão.

### **a) Seletividade**

Inicialmente, os contaminantes da pele EC, folículos pilosos (FP) e a pele remanescente (PR) foram obtidos após a realização do *tape stripping* diferencial na pele da orelha de porco (1 cm<sup>2</sup>), conforme descrito na literatura (PEREIRA et al, 2017). Resumidamente, cada camada de pele (EC, FP e PR) foi colocada em frascos de vidro fechados individuais com 5 mL de metanol e deixados durante a noite sob agitação (300 rpm). Após esse tempo, filtrou-se em uma membrana de 0,22 µm.

A capacidade de um método para distinguir e quantificar CIAIFc inequivocamente na presença de interferentes foi avaliada usando os contaminantes da pele, bem como o agente solubilizante HP-βCD que comporá a formulação do agente fotossensibilizante. Foram preparadas amostras contendo CIAIFc com concentração de 5,0 µg/mL, com e sem cada um dos contaminantes. Os ensaios foram realizados em seis replicatas e os resultados da área do pico foram analisados após a análise de variância (ANOVA) *one way* com nível de significância fixado em 0,05.

### **b) Robustez**

A robustez do método foi avaliada a partir de um desempenho experimental de variações intencionais em três parâmetros cromatográficos importantes de análise seguindo um projeto fatorial 2<sup>3</sup> (PINHO et al., 2016). Os parâmetros selecionados foram a temperatura do forno (Temp), a vazão da fase móvel (FR) e a concentração ácida da fase móvel (Ácido). Eles foram testados com variação na faixa de 3-10% como descrito na Tabela 2. Todos os ensaios foram realizados com amostras de CIAIFc a 2,5 µg/mL, em triplicata e em uma ordem aleatória. Uma equação de predição para cada área de pico foi proposta usando a análise de regressões múltiplas por etapas. O modelo foi validado após a ANOVA com um nível de significância de 0,05. Todos os cálculos estatísticos foram realizados usando o software DesignExpert, versão 9 (Minneapolis, EUA).

**Tabela 2** – Desenho experimental para ensaio de robustez. Temp: temperatura do forno; FR: vazão da fase móvel; Ácido: concentração de ácido fosfórico da fase móvel.

Experimento	Temp (°C)	FR (mL/min)	Ácido (mM)
1	29	1,425	0,009
2	31	1,425	0,009
3	29	1,575	0,009
4	31	1,575	0,009
5	29	1,425	0,011
6	31	1,425	0,011
7	29	1,575	0,011
8	31	1,575	0,011

### c) Linearidade

Uma curva de calibração foi construída com soluções CIAIFc no intervalo de 0,1 µg/mL a 5 µg/mL usando seis níveis de concentração avaliados aleatoriamente em triplicata. Os dados foram ajustados usando regressão linear de mínimos quadrados. O teste Student-t ( $p = 0,05$ ) foi utilizado para calcular os testes de significância do coeficiente angular e de proporcionalidade, enquanto os fatores de resposta foram calculados pela relação entre a área do pico e a concentração de CIAIFc (ANGELO et al., 2016). Os resíduos foram estimados com base na diferença entre valores teóricos e experimentais, que foram calculados a partir da curva de calibração.

### d) Limite de detecção (LD) e Limite de quantificação (LQ)

O LD e LQ teóricos foram calculados a partir da curva de calibração de acordo com as seguintes equações 1 e 2:

$$LD = 3,3 \times \sigma / S \quad (1)$$

$$LQ = 10 \times \sigma / S \quad (2)$$

onde:  $\sigma$  é o desvio padrão dos valores de intercepção do eixo y e S é o coeficiente angular.

### e) Precisão

Dois níveis de precisão foram avaliados: repetibilidade e precisão intermediária. Repetibilidade (intra-ensaio) foi verificada para três concentrações de CIAIFc (1,0; 2,5 e 5,0 µg/mL) utilizando três repetições. A precisão intermediária (inter-ensaio) foi avaliada em dois dias diferentes, utilizando dois sistemas de HPLC diferentes e dois analistas diferentes nas mesmas concentrações e em triplicata cada. Os resultados de precisão foram expressos como coeficiente de variação (CV) em cada condição de ensaio e em todos os níveis de variação para cada concentração de fármaco (CV geral).

$$CV = (m / \sigma) \times 100 \quad (3)$$

onde: m é igual a média e  $\sigma$  é o desvio padrão dos valores para cada concentração.

### f) Exatidão

A exatidão foi avaliada com base na porcentagem de recuperação de CIAIFc nas matrizes de pele (EC, FP e PR). Primeiro, as camadas de fragmentos de pele foram separadas seguindo a técnica de *tape stripping* diferencial. Cada camada de pele foi dopada com diferentes volumes de uma solução metanólica de CIAIFc, que correspondeu a 5,0, 12,5 e 25,0 µg do fármaco. Após a evaporação do solvente, foram adicionados 5 mL de metanol em cada fração da pele e a extração foi realizada por 1 h, sob agitação magnética (1000 rpm) e a temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram filtradas e analisadas utilizando o método proposto. A recuperação de CIAIFc foi determinada a partir da proporção da quantidade de fármaco extraída das amostras de pele para a quantidade de CIAIFc adicionada a cada camada de pele. As análises foram realizadas com três amostras de cada concentração final avaliada (1,0; 2,5 e 5,0 µg/mL). Os resultados de exatidão foram calculados em termos de recuperação (R) de acordo com a equação 4:

$$R = (\text{concentração medida} / \text{concentração nominal}) \times 100 \quad (4)$$

### 4.3. Solubilidade da CIAIFc em diferentes meios

A solubilidade da CIAIFc foi determinada nos meios: metanol, etanol e em solução aquosa de Tween<sup>®</sup> 20 à 5%, pH 7,4. Um excesso do fármaco foi colocado em cada um dos solventes. As dispersões formadas foram deixadas sob agitação magnética de 500 rpm, à 25 ± 2° C, durante 24 h. Após esse período, as dispersões foram filtradas em filtros de 0,45 µm, acoplados a seringas. As soluções filtradas

foram diluídas em metanol fazendo com que a concentração obtida fosse, no máximo de 5 µg/mL, estando assim dentro da curva de trabalho estabelecida pela linearidade do método analítico. As análises de solubilidade em cada solvente foram realizadas em triplicata utilizando o HPLC.

#### **4.4. Estudo de compatibilidade de sólidos através de análises térmicas por DSC e DTG**

Curvas de calorimetria diferencial de varredura (DSC) foram obtidas em um equipamento DSC-60A (Shimadzu, Japão). Amostras de 2-4 mg de CIAIFc, da HP-βCD e da mistura física HP-βCD + CIAIFc (1:1, m/m) foram pesadas em cadinhos de alumínio e foram analisadas sob atmosfera dinâmica de nitrogênio, fluxo de 50 mL/min, usando taxa de aquecimento de 10 °C/min, até 500 °C.

Análises visuais das amostras foram realizadas por DSC utilizando o protocolo citado acima. No entanto, o aquecimento foi realizado com o cadinho exposto e coberto apenas com vidro, sendo possível a captura de imagens.

Variações de perda de peso e faixas de decomposição foram avaliadas por Termogravimetria derivada (*Derivative thermogravimetry*, DTG) utilizando uma termobalança DTG-60 (Shimadzu, Japão) sob atmosfera dinâmica de nitrogênio, fluxo de 50 mL/min. Amostras de 3-5 mg foram pesadas em cadinhos de platina não herméticas e foram analisadas usando taxa de aquecimento de 10 °C/min, com temperatura inicial de 25° C até 500° C.

#### **4.5. Obtenção dos complexos de CIAIFc-CD**

Inicialmente, foi avaliada a complexação da CIAIFc com a Sulfabutileter-β-Ciclodextrina (SBE-βCD) e a Hidroxipropil-β-Ciclodextrina (HP-βCD) por meio da construção de diagramas de solubilidade. Foram preparados 10,0 mL de solução aquosa de cada CD nas concentrações de 10, 15, 20, 25 e 30% (m/v) em água ultrapurificada. Após 24 h de agitação magnética, foi adicionado um excesso de 1 mg de CIAIFc em cada solução, deixado sob agitação magnética de 500 rpm, a 25 ± 2°C por 48 h. Os complexos, então, foram filtrados e tiveram o pH ajustados para 7,4 com solução de NaOH a 0,005 M. Após a formação do complexo final, estes foram diluídos em metanol e analisados em HPLC para determinação de CIAIFc complexada.

A constante de estabilidade de complexação (K) foi calculada a partir da regressão linear da equação de reta obtida com a relação entre a concentração de HP- $\beta$ CD e a solubilidade de CIAIFc, de acordo com a equação 5 (HIGUCHI e CONNOR, 1965):

$$K = \text{Slope} / S_0 (1 - \text{Slope}) \quad (5)$$

onde: Slope representa a inclinação da curva obtida da porção linear do diagrama e  $S_0$  representa a solubilidade intrínseca da CIAIFc em água que foi estimada pelo coeficiente linear da equação da reta.

Além disso, a eficiência de complexação (EC) foi calculada de acordo com a equação 6 (LOFTSSON e MÁSSON, 2005):

$$EC = S_0 K = [D/CDX] / [CDX] = \text{Slope} / (1 - \text{Slope}) \quad (6)$$

onde:  $[D/CDX]$  representa a concentração de CD complexada e  $[CDX]$  representa a concentração de CD livre.

## 4.6. Caracterização do complexo CIAIFc-HP- $\beta$ CD

### 4.6.1. Espectroscopia de absorção e emissão de fluorescência

O espectro de absorção e a emissão de fluorescência foram verificados analisando-se o complexo CIAIFc-HP- $\beta$ CD colocado em células de quartzo. O espectro de absorção foi obtido em um espectrofotômetro UV/Vis (Shimadzu, UV-1800) com varredura de 190 a 800 nm. A fluorescência foi detectada em espectrofluorímetro Fluorolog 3 (New Jersey, EUA) utilizando como comprimento de onda de excitação 610 nm e a emissão foi capturada na faixa de 650 a 800 nm.

Ambos os espectros foram também obtidos de soluções em controle de CIAIFc a 10  $\mu\text{g/mL}$  em metanol, etanol e solução aquosa de Tween<sup>®</sup> 20 a 5%.

## 4.7. Avaliação da citotoxicidade de CIAIFc-HP- $\beta$ CD

### 4.7.1. Citotoxicidade da CIAIFc-HP- $\beta$ CD

A avaliação da toxicidade foi realizada com células de câncer de pele melanoma da linhagem B16F10. Uma quantidade de  $10^4$  células foi semeada em quadruplicata em placas de 96 poços e incubadas em meio de cultura DMEM, por

24 h, a 37 °C e atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> e 80% de umidade. Após esse período, retirou-se os 100 µL de meio, deixando apenas as células aderidas no fundo da placa. As células foram incubadas por 15 min com 200 µL do CIAIFc-HP-βCD e dos controles, HP-βCD e CIAIFc em solução. Após esses períodos de incubação, as formulações foram removidas, os poços lavados com PBS e o meio de cultura foi adicionado e deixado por mais 24 h. Após esta última etapa, foi adicionada uma solução de MTT a 5 mg/mL e meio de cultura na proporção de 1:10 (v/v). As células foram incubadas à 37°C por duas horas. Em seguida, a solução contendo MTT foi removida e então, foram adicionados 200 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) em cada poço da placa para a solubilização dos cristais de formazan. A análise de viabilidade em cada poço foi realizada por meio da leitura de absorbância em comprimento de onda de 595 nm em espectrofotômetro.

#### **4.7.2. Avaliação da citotoxicidade do complexo CIAIFc-HP-βCD após aplicação de TFD**

As células foram plaqueadas considerando a resposta das melhores concentrações utilizadas para os testes no escuro (item 4.6.1). Transcorridas 24 h após o plaqueamento, as células foram incubadas com o complexo CIAIFc-HP-βCD e com os controles por quinze minutos. Decorrido esse período, o sobrenadante foi removido e os poços lavados com PBS. A placa foi irradiada com luz LED a 660 nm, em PBS por 8 minutos, a uma distância de 8 cm da fonte luminosa, o equivalente a 52 mW de potência e fluência de 25,33 J/cm<sup>2</sup>/s. Após a exposição, as células foram mantidas sob condições de cultivo por mais 24 h protegidas da luz e, então, a viabilidade delas foi mensurada por ensaio de MTT em espectrofotômetro, como descrito no item anterior.

#### **4.8. Estabilidade elétrica do complexo CIAIFc-HP-βCD**

A estabilidade elétrica do complexo proposto foi analisada aplicando uma corrente elétrica de 0,5 mA/cm<sup>2</sup>, por 6 h. Os eletrodos de Ag/AgCl foram conectados a fonte e imersos em 2 mL do complexo CIAIFc-HP-βCD. Amostras do complexo foram coletadas em 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 90, 120, 150, 180, 240 e 360 min. As amostras foram filtradas, diluídas em metanol e analisadas por HPLC para análise da concentração de CIAIFc.

#### 4.9. Estudos *in vitro* de permeação do complexo CIAIFc-HP- $\beta$ CD em pele de suínos

Todos os ensaios de permeação *in vitro* foram realizados em quintuplicata para cada variável com pele de suínos previamente limpas e todas as células de difusão foram cobertas com papel alumínio para evitar possível degradação da CIAIFc com a exposição à luz.

##### 4.9.1. Permeação passiva

Os ensaios de permeação *in vitro* foram realizados utilizando células de difusão verticais do tipo Franz modificadas. O compartimento doador (superior) das células foi preenchido com 1 mL da solução do complexo CIAIFc-HP- $\beta$ CD, pH 7,4, com concentração igual a  $10 \pm 2$   $\mu$ g/mL de CIAIFc. O compartimento receptor foi preenchido com 15 mL de solução aquosa de Tween<sup>®</sup> 20 à 5%, pH 7,4 e foi mantido sob agitação magnética a 1000 rpm e a  $32 \pm 2^\circ$  C, durante às 12 h de experimento. Entre os dois compartimentos de cada célula foi colocada a pele de suíno (Figura 16).



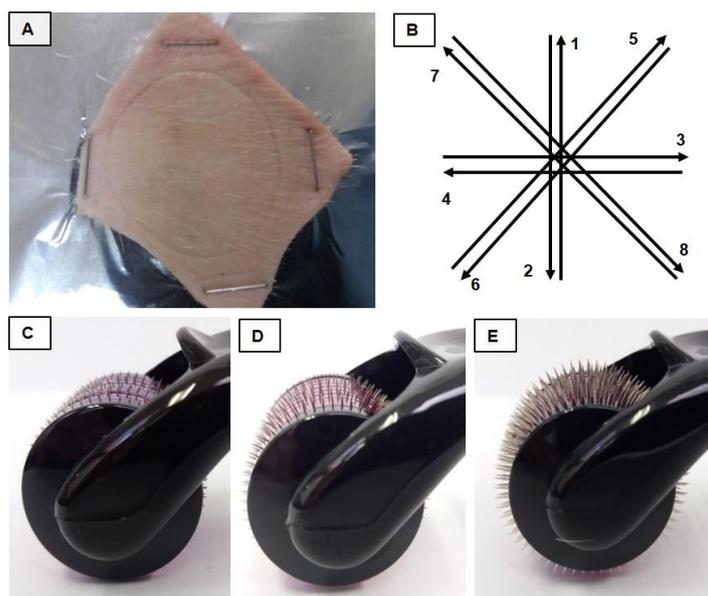
**Figura 16** – Célula de difusão do tipo Franz modificada montada para realização de ensaios *in vitro* de permeação de CIAIFc através de pele de orelha de suínos.

Após as 12 h de experimento, as células foram desmontadas e retirou-se o excesso de formulação sobre a área difusional da pele. Cada fragmento de pele foi fixado em superfície lisa e o EC foi removido pela técnica de *tape stripping* com o auxílio de 15 fitas adesivas. Na área da pele sem EC, foi colocada uma gota de cola de cianoacrilato. Sobre a gota, uma fita adesiva foi pressionada durante,

aproximadamente, um minuto e retirada com um único movimento para retirada dos FP. A PR foi então picotada e transferida para um tubo de vidro âmbar separado, assim como as fitas com o EC e a cola com o FP. Assim, as frações da pele (EC, FP e a PR) foram analisadas separadamente. Foram adicionados 5 mL de metanol em cada fração, deixados sob agitação magnética de 1000 rpm, por 1 h, como validado na recuperação (item 4.2.2.f). As amostras foram então filtradas e analisadas por HPLC para quantificação de CIAIFc.

#### 4.9.2. Permeação utilizando microagulhas

A pele de suíno foi presa em superfície lisa com o auxílio de grampos para ficar o mais esticada possível (Figura 17A). Após, o rolo com 540 microagulhas sólidas de 0,5 mm (Figura 17C) foi passado sobre a pele em quatro direções (horizontal, vertical e diagonais) e nos dois sentidos de cada direção (Figura 17B). O mesmo procedimento foi realizado com o rolo de microagulhas nos tamanhos de 1,0 mm (Figura 17D) e 2,0 mm (Figura 17E).



**Figura 17** – Foto da pele presa com grampo (A); direções e sentidos em forma de asterisco em que os rolos com microagulhas foram passados na pele (B); rolo de microagulhas com 0,5 mm (C), 1,0 mm (D) e 2,5 mm (E).

As células de difusão do tipo Franz modificadas foram montadas e o experimento seguiu o método como descrito no item 4.9.1. Após 12 h, as células foram desmontadas e retirou-se o excesso de formulação. A área difusional foi

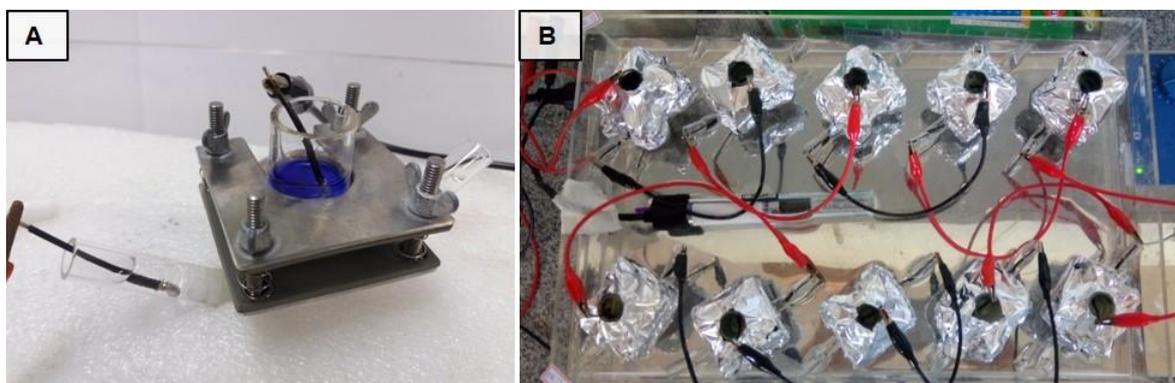
picotada sem separar as frações da pele. Foram adicionados 5 mL de metanol em cada pele picotada, deixados sob agitação magnética de 500 rpm, por 1 h, como validado anteriormente. A dispersão foi, então, filtrada e analisada por HPLC para quantificação de CIAIFc.

#### 4.9.3. Permeação iontoforética

A montagem das células de difusão do tipo Franz modificadas, o preenchimento dos meios doador/receptor e as condições para realização do experimento foram as mesmas já descritas para a realização da permeação passiva (item 4.9.1).

Com todas as células montadas, os eletrodos de Ag foram colocados no meio doador em contato apenas com a formulação, enquanto os eletrodos de AgCl foram colocados no meio receptor em contato com a solução aquosa de Tween 20 à 5%, pH 7,4 (Figura 18A). Todas as células foram ligadas em série e conectadas a fonte de alimentação (Figura 18B). Uma corrente elétrica constante de 0,5 mA/cm<sup>2</sup> foi então aplicada sobre a formulação. Após 6 h de experimento, a fonte de energia foi desligada e os eletrodos retirados das células. Coletou-se 1 mL do meio receptor para posterior quantificação de CIAIFc permeado.

As células foram desmontadas e, a partir da área difusional, foram separadas as frações da pele (EC, FP e PR) e seguiu-se o processo de extração para recuperação do CIAIFc e quantificação por HPLC.



**Figura 18** – Célula tipo Franz montada com o eletrodo de Ag e AgCl no compartimento doador e receptor, respectivamente (A); Células ligadas em série (B).

#### **4.10. Análise estatística**

A análise estatística dos dados tanto de cultura celular quanto de permeação foi realizada com a utilização do programa GraphPad Prism v.3.00. As diferenças significativas foram verificadas por análise de variância *one-way* ANOVA, seguido do teste de Tukey com comparação múltipla dos dados. O nível de significância estatística foi fixado como sendo  $p < 0,05$ . Os dados de, no mínimo, uma triplicata estão representados como média  $\pm$  desvio padrão. As regressões lineares e equações de reta foram obtidas com a utilização do programa Microsoft Excel 2013.

## 5. Resultados e Discussão

### 5.1. Desenvolvimento e validação de método analítico para quantificação de CIAIFc por HPLC

O método analítico foi desenvolvido e validado com o objetivo de determinar de maneira rápida, precisa e seletiva a CIAIFc utilizando um equipamento cromatográfico simples. Esse método deu suporte tanto para o desenvolvimento da formulação aquosa contendo o fármaco complexado, como para os experimentos *in vitro* de permeação cutânea.

#### 5.1.1. Otimização das condições cromatográficas

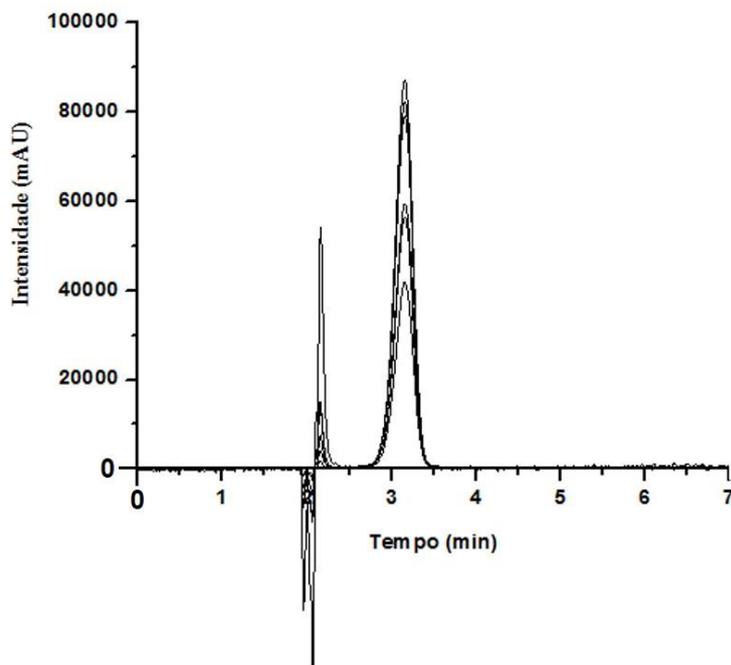
O espectro de absorção em UV-Vis da CIAIFc mostrou dois picos de absorção máxima a 354 nm e 670 nm. O comprimento de onda de 670 nm mostrou menor absorção para interferências analíticas, especialmente para os contaminantes da pele (EC, FP e PR) durante as análises cromatográficas posteriores e, portanto, foi selecionado para os estudos subsequentes. Os principais testes realizados para a fase de desenvolvimento do método e os resultados analíticos estão apresentados e resumidos na Tabela 3.

**Tabela 3** – Otimização das condições de cromatográficas para determinação de CIAIFc. FR: fase reversa; FN: fase normal.

Teste	Coluna	Fase móvel (v:v)	Vazão (mL/min)	Fator de cauda	Resolução	Tempo de retenção (min)	Característica do pico
1	FR C <sub>18</sub> , 15 cm	MeOH:H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 0,01M (60:40)	1,0	-	3,104	2,7	Pico frontal
2	FR C <sub>18</sub> , 15 cm	MeOH:H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 0,01M (63:37)	1,0	0,813	2,954	2,7	Pico frontal
3	FN, 30 cm	MeOH:H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 0,01M (60:40)	1,0	1,065	1,860	2,5	Pico sobreposto
4	FN, 30 cm	MeOH:H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 0,01M (70:30)	1,0	0,947	3,143	2,89	Pico sobreposto
5	FN, 30 cm	MeOH:H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 0,01M (75:25)	1,0	0,901	3,881	3,21	Pico sobreposto
6	FN, 30 cm	MeOH:H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 0,01M (80:20)	1,0	0,908	5,070	4,77	Pico adequado
<b>7</b>	<b>FN, 30 cm</b>	<b>MeOH:H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,01M (80:20)</b>	<b>1,5</b>	<b>0,876</b>	<b>4,475</b>	<b>3,71</b>	<b>Pico adequado</b>

As condições cromatográficas utilizadas como ponto de partida foram baseadas no método já descrito na literatura, que utilizou detecção de fluorescência (MUEHLMANN et al., 2014). Nestas condições (ensaios 1 e 2), obteve-se um pico assimétrico do analito, com eluição muito próxima a do solvente, em cerca de 2,7 min.

Uma coluna de fase normal de maior comprimento foi testada na tentativa de aumentar o tempo de retenção de CIAIFc e melhorar a qualidade do pico obtido. Modificações subsequentes na composição da fase móvel com aumento da proporção de metanol foram realizadas com o intuito de aumentar o tempo de retenção do fármaco (ensaios 3-6). Depois, a última alteração na vazão da fase móvel foi capaz de ajustar o tempo de retenção de CIAIFc para 3,71 min (ensaio 7). Desta forma, as condições cromatográficas finais produziram um pico simétrico de analito com parâmetros adequados, incluindo o tempo de retenção, e um tempo de corrida curto, de aproximadamente 6 min (Figura 19).

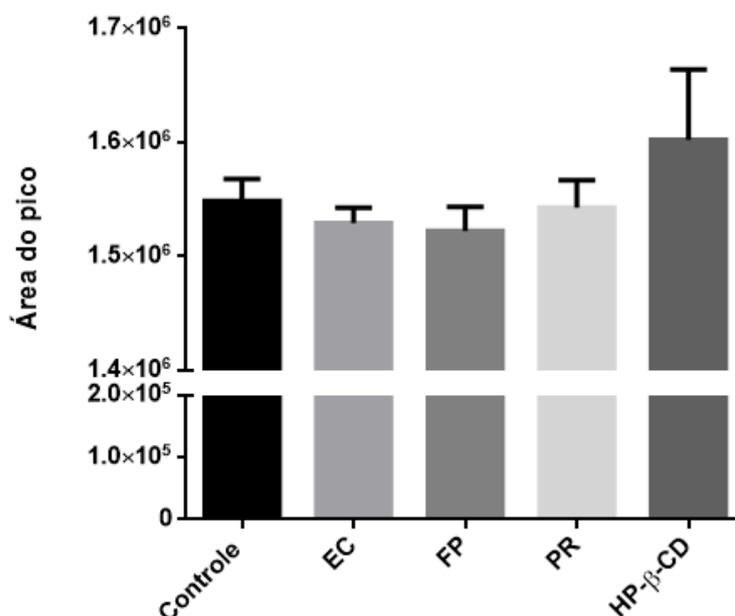


**Figura 19** – Cromatogramas sobrepostos obtidos por HPLC referente a curva de CIAIFc em metanol nas concentrações de 0,1; 0,25; 0,5; 1,0; 2,5 e 5,0  $\mu\text{g/mL}$  com picos eluindo a 3,71 min e detecção em 670 nm.

### 5.1.2. Seletividade

Um requisito fundamental para permitir o uso do método em estudos de permeação cutânea é provar sua seletividade contra as interferências das camadas da pele. Além disso, a sua seletividade contra o agente solubilizante HP- $\beta$ CD também foi realizada uma vez que a interação do fármaco poderia modificar os parâmetros físico-químicos da molécula (CUNHA-FILHO et al., 2007).

Não houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as áreas de pico de CIAIFc eluídas sozinhas ou em combinação com os interferentes, conforme pode ser observado na Figura 20. Além disso, não foram observadas alterações no tempo de retenção ou nos parâmetros de desempenho cromatográfico, demonstrando a ausência de interação entre os componentes durante as análises. Assim, o método provou ser seletivo para avaliar o analito na presença de componentes da pele (EC, FP e PR) e HP- $\beta$ CD.



**Figura 20** – Seletividade do método analítico para determinação de CIAIFc a 5,0  $\mu\text{g/mL}$  sozinho, com interferências da pele (EC, FP e PR) e com HP- $\beta$ CD.

### 5.1.3. Robustez

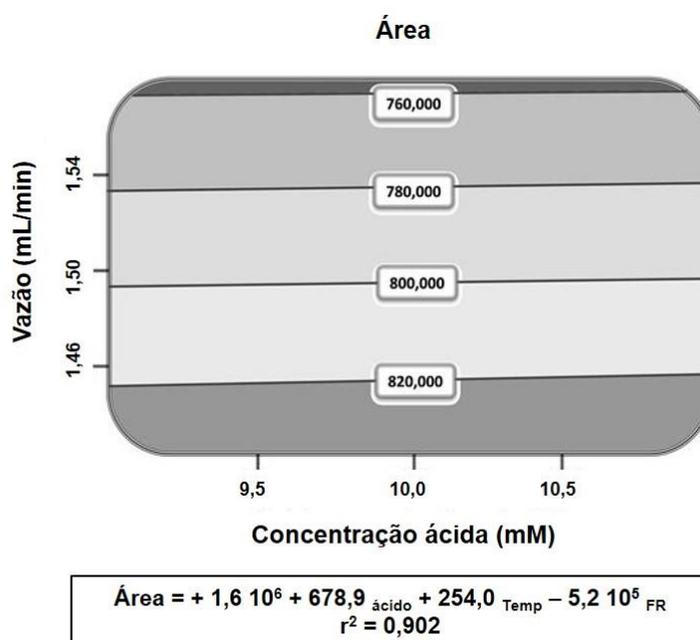
As variações nos parâmetros cromatográficos podem interferir na área do pico do analito e, portanto, a robustez do método foi avaliada durante a validação.

As oscilações na concentração ácida da fase móvel ou da temperatura do forno não causaram nenhum efeito estatístico nesta resposta ( $p = 0,8163$  e  $p =$

0,9307, respectivamente). A vazão da fase móvel, por outro lado, foi decisiva para a resposta analítica ( $p < 0,0001$ ). Na verdade, esse fator é responsável por mais de 90% da resposta, enquanto o erro aleatório explica os restantes 9%.

No gráfico de superfície de resposta apresentado na Figura 21, a variação da área do pico até 8% é observada de acordo com a vazão. Um efeito semelhante é comumente descrito na literatura para outros métodos cromatográficos (ANGELO et al.; 2016; NUNES-FERREIRA et al., 2017; ANGELO et al., 2017), evidenciando a importância de manter este parâmetro controlado e realizar manutenção periódica nas suas bombas que controlam o fluxo da fase móvel.

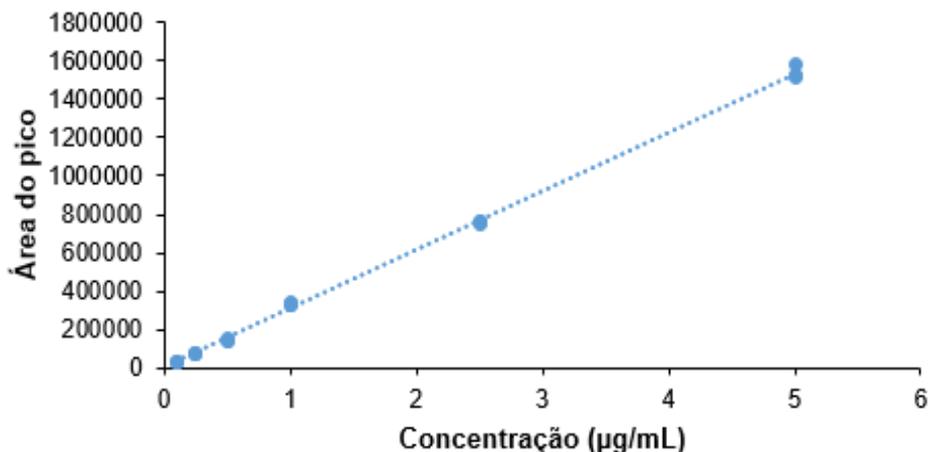
A equação preditiva ajustou um modelo linear e mostrou uma alta capacidade de extrapolação ( $r^2 = 0,902$ ). O coeficiente negativo para o fator de taxa de vazão mostrou que uma vazão maior conduz a uma redução na sensibilidade do método (Figura 21).



**Figura 21** – Superfícies de resposta para a área de pico de CIAIFc no ensaio de robustez juntamente com equações preditivas e  $r^2$ . As áreas escuras mostram regiões com mudanças mais intensas nessas respostas.

#### 5.1.4. Linearidade

A curva de calibração construída para a CIAIFc está apresentada na Figura 22 a seguir.



**Figura 22** – Curva analítica obtida pela análise de uma triplicata de CIAIFc por HPLC utilizando metanol como solvente de diluição do fármaco nas concentrações de 0,1; 0,25; 0,5; 1,0; 2,5 e 5,0 µg/mL, comprovando a linearidade do método. Equação da reta:  $y = 306119x + 42191,1$ .

A regressão linear forneceu a equação  $y = 306119x + 4219,1$ , onde  $y$  é a área do pico e  $x$  é a concentração de CIAIFc em µg/mL. O coeficiente de correlação foi próximo a um (0,9994) e atendeu aos requisitos de validação [mínimo de 0,999 (ICH, 2005)], comprovando a capacidade do método de fornecer proporcionalidade entre a área e valores de concentração em uma ampla gama de concentrações (0,1 a 5,0 µg/mL).

O coeficiente angular foi diferente de zero de acordo com o teste  $t$  de Student e seu alto valor numérico de 306119 indicou resposta apropriada do método contra alterações de concentração. O teste de proporcionalidade calculado após o teste  $t$  provou que a curva passa pela origem das coordenadas, o que indica a adequação do intervalo de concentração utilizado (intervalo de confiança de -13,470 a 21,908) (NUNES-FERREIRA et al., 2017). Os resíduos apresentaram, aproximadamente, o mesmo valor absoluto e uma distribuição aleatória de dados sem tendência.

#### 5.1.5. Limite de Detecção e Limite de Quantificação

O LD e LQ foram calculados como sendo 0,03 e 0,09 µg/mL, respectivamente. Os valores reduzidos desses limites indicaram a alta sensibilidade do método, particularmente interessante neste caso, considerando o potente efeito de CIAIFc usado em doses muito baixas em TFD (ROCHA et al., 2012), conforme será mostrado a seguir. Consequentemente, LD e LQ foram

apropriados para determinar a CIAIFc nos estudos cinéticos de permeação em pele, bem como, em futuros ensaios com a formulação farmacêutica.

#### 5.1.6. Precisão

Os resultados da precisão intra-ensaio apresentaram CV abaixo de 5,0% em todas as três concentrações testadas (Tabela 4). A precisão entre ensaios apresentou respostas consistentes para variação de analista, equipamento e dia de análise, com CV até 7,8% para a menor concentração e menos de 2% para as demais concentrações. Este resultado está de acordo com os limites recomendados de até 15% estabelecidos para métodos bioanalíticos (ANGELO et al., 2017).

**Tabela 4** – Precisão intra e inter-ensaio do método CIAIFc por HPLC. CV: coeficiente de variação.

Concentração teórica (µg/mL)			Concentração experimental (µg/mL)	CV (%)	CV geral (%)
1,0	Analista 1	Dia 1	1,00	1,49	7,80
	Equipamento 1	Dia 2	1,03	2,71	
	Analista 2	Dia 1	0,88	3,74	
	Equipamento 2	Dia 2	0,83	3,07	
2,5	Analista 1	Dia 1	2,49	1,12	1,72
	Equipamento 1	Dia 2	2,54	4,33	
	Analista 2	Dia 1	2,49	0,88	
	Equipamento 2	Dia 2	2,49	1,94	
5,0	Analista 1	Dia 1	5,05	1,39	1,66
	Equipamento 1	Dia 2	5,03	4,26	
	Analista 2	Dia 1	4,53	2,58	
	Equipamento 2	Dia 2	4,48	1,82	

#### 5.1.7. Exatidão/Recuperação

Devido à lipofilicidade da CIAIFc, a exatidão do método foi verificada considerando as possíveis interações do fármaco com as diferentes substâncias

que compõem as camadas da pele, que é um tecido complexo, bem como o processo de extração a partir do EC, FP e PR e também com a pele inteira. Deste modo, a porcentagem de CIAIFc recuperado das camadas da pele é apresentado na Tabela 5.

**Tabela 5** – Recuperação do método analítico para determinação de CIAIFc a partir de camadas de pele. EC: estrato córneo; FP: folículo piloso; CV: coeficiente de variação.

Concentração teórica de CIAIFc ( $\mu\text{g/mL}$ )	EC		FP		PR		Pele Inteira	
	CIAIFc recuperado (%)	CV (%)						
1,0	50,3 $\pm$ 2,6	4,97	76,4 $\pm$ 7,0	8,94	84,3 $\pm$ 1,7	1,99	69,7 $\pm$ 5,4	7,5
2,5	44,3 $\pm$ 2,1	4,78	71,1 $\pm$ 2,1	2,97	84,2 $\pm$ 3,3	3,90	69,2 $\pm$ 2,8	4,0
5,0	49,9 $\pm$ 1,1	2,21	74,3 $\pm$ 3,2	4,26	88,5 $\pm$ 3,3	3,70	65,8 $\pm$ 1,3	1,9

O método desenvolvido mostrou uma alta capacidade de recuperação de CIAIFc na PR, com valores superiores a 80% para os três níveis de concentrações avaliadas (Tabela 5). Desempenho semelhante foi alcançado no FP e Pele Inteira que apresentou valores próximos a 70%. Ambos os resultados de recuperação podem ser considerados adequados para determinações em matrizes biológicas assim como os dados apresentados na literatura (ANGELO et al., 2016; CAMPOS et al., 2016; HUO et al., 2014; KONDA et al., 2012).

Em contraste, a recuperação de fármaco do EC foi baixa (cerca de 50% em todos os níveis de concentração testados), causada pela alta afinidade do fármaco lipofílico com o EC também lipofílico. Nesse caso, os baixos valores de CV (abaixo de 5%) endossam o uso de um fator de correção para a quantificação de CIAIFc desta camada da pele específica. Este procedimento está de acordo com a orientação da FDA em casos de resultados de recuperação consistentes, precisos e reprodutíveis (FDA, 2001).

## 5.2. Determinação da solubilidade da CIAIFc em diferentes meios

A caracterização físico-química de uma molécula quanto à sua solubilidade aquosa é essencial para o desenvolvimento de uma forma farmacêutica estável e eficaz (ANSEL et al., 2007), pois para exercer seu efeito terapêutico o fármaco precisa estar em solução. Portanto, os dados de solubilidade da CIAIFc em diferentes meios foram determinados e os resultados estão apresentados na Tabela 6.

**Tabela 6** – Solubilidade da CIAIFc nos solventes metanol, etanol e solução aquosa de Tween® 20 a 5%, pH 7,4.

Solvente	Concentração (mg/mL)
Metanol	9,9 ± 2,8
Etanol	5,7 ± 0,3
Solução aquosa de Tween® 20 a 5%, pH 7,4	0,7 ± 0,4

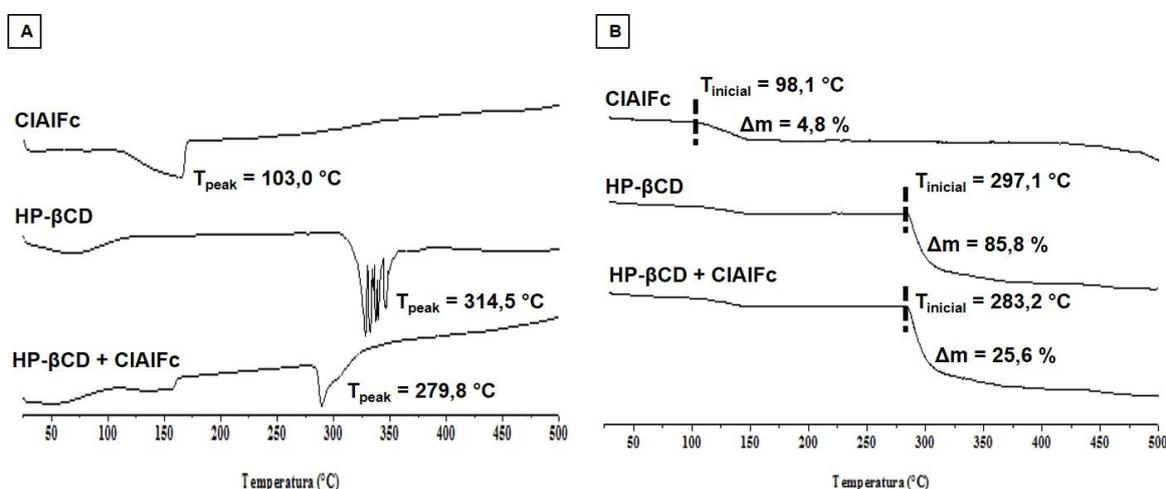
A molécula de CIAIFc apresenta alta lipofilicidade, sendo melhor solubilizada em solventes orgânicos como metanol e etanol, em que apresentaram solubilidade, a 25 °C, iguais a 9,9 ± 2,8 mg/mL e 5,7 ± 0,3 mg/mL, respectivamente. Muitos trabalhos na literatura utilizaram o etanol como solvente de solubilização de CIAIFc (TAPAJÓS et al., 2008; MUEHLMANN et al., 2014; MUEHLMANN et al., 2015) porque ele é menos tóxico e causa menos irritabilidade para estar presente em uma formulação final. Como os experimentos apresentados neste trabalho têm como objetivo o desenvolvimento de uma formulação aquosa e mais biocompatível contendo a CIAIFc, o metanol – solvente de maior solubilidade – foi utilizado tanto no desenvolvimento do método analítico e para desfazer os complexos com HP-βCD, possibilitando a quantificação do fármaco complexado, quanto para a extração do fármaco da pele nos ensaios de permeação cutânea.

Além disso, a análise da solubilidade da CIAIFc em solução aquosa de Tween® 20 a 5%, pH 7,4, permitiu verificar que durante os experimentos *in vitro* de permeação cutânea não houve saturação do meio receptor com o complexo analisado nessas proporções, ou seja, os experimentos foram realizados todos em “*sink conditions*”. Assim, considerando-se que no compartimento doador foi colocado uma formulação contendo 1 mL do complexo contendo 10 µg/mL de

CIAIFc (10 µg do fármaco) e que o volume do meio receptor composto Tween® 20 a 5%, pH 7,4 foi de 15 mL, a maior concentração que se poderia ter de fármaco no receptor era de 0,66 µg/mL, que corresponde a 0,001% da solubilidade no meio utilizado. A não saturação do meio receptor garante não haver impedimento do fluxo de CIAIFc através da pele, assegurando-se assim a boa condução dos ensaios *in vitro* de permeação cutânea.

### 5.3. Estudo de compatibilidade de sólidos por análises térmicas por DSC e DTG

O estudo de compatibilidade utilizando as técnicas de análises térmicas foi realizado para confirmar a compatibilidade entre os dois sólidos presentes no complexo. As técnicas de análises térmicas são utilizadas para analisar uma propriedade física de uma amostra, enquanto elas são submetidas a variações de temperatura controlada. No DSC, são analisadas as variações de entalpia com suas mudanças de fase e, no DTG, as variações de massa da amostra indicando a decomposição/desidratação (MACKENZIE, 1970; DENARI e CAVALHEIRO, 2012). Os perfis térmicos da CIAIFc, da HP-βCD e da mistura física HP-βCD + CIAIFc (1:1, m/m) estão apresentados na Figura 23 (COLOCAR A E B NA FIGURA E NA LEGENDA).

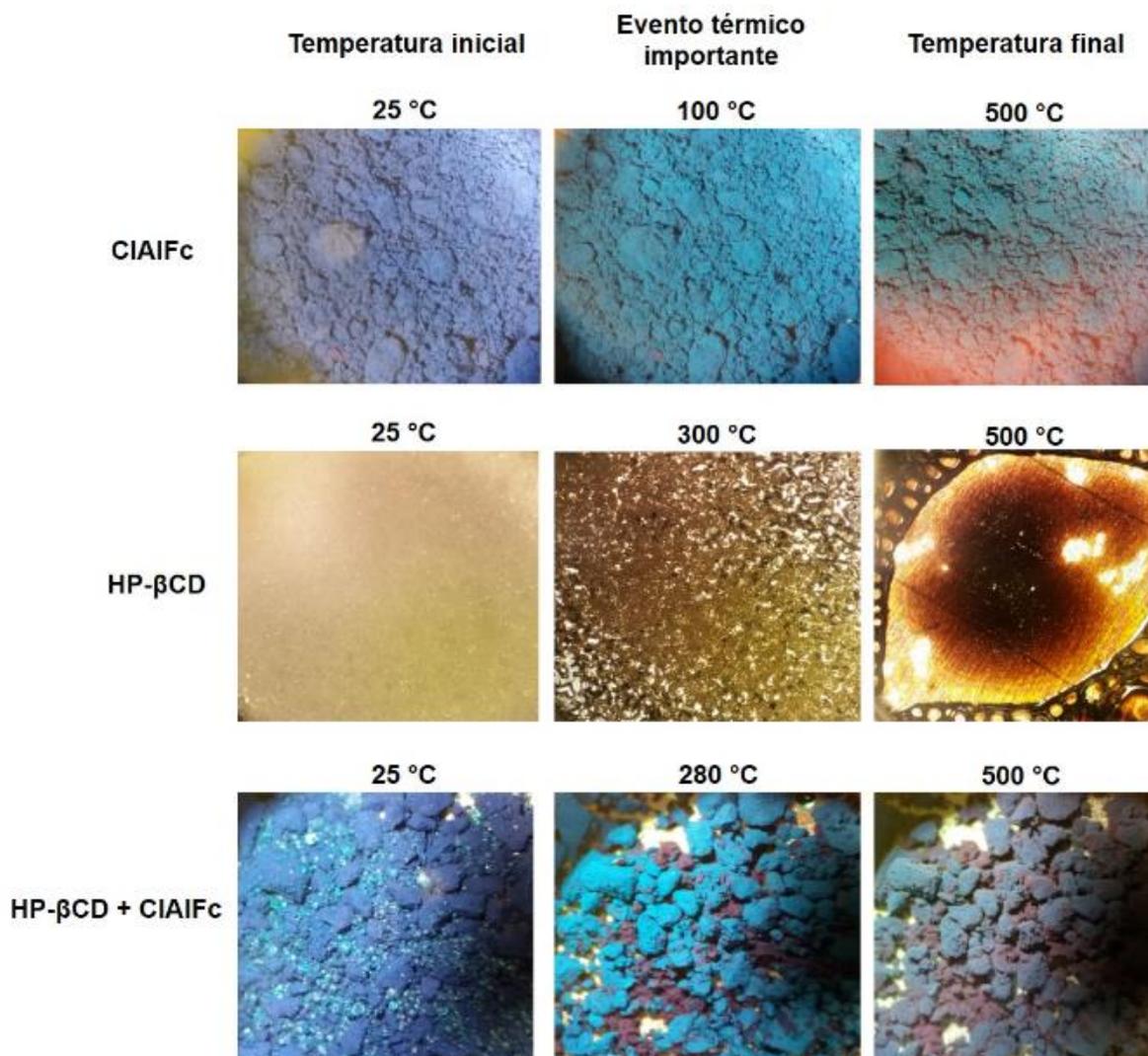


**Figura 23** – Caracterização térmica por DSC (A) e DTG (B), de 25 a 500 °C, da HP-βCD, CIAIFc e mistura física HP-βCD + CIAIFc (1:1, m/m).

A CIAIFc apresentou um evento endotérmico em 103,0 °C, acompanhado de uma perda de massa de apenas 4,8%, que pode estar relacionada com a desidratação da molécula ou ainda pela instabilidade das impurezas presentes na matéria-prima. Almeida et al. (2012) também obtiveram por DTG uma perda de baixa porcentagem para a mesma molécula, que foi correlacionada com a evaporação de voláteis como N<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O ou a baixa temperatura de degradação de fragmentos químicos instáveis na amostra. A baixa perda de massa não causa instabilidade na molécula, visto que é bem estabelecido que as ftalocianinas possuem alta estabilidade térmica (LAWTON, 1957; DELMAN et al., 1970; ACHAR et al., 1982; TOLBIN et al., 2014).

A HP-βCD apresenta sua fusão acompanhada de decomposição a partir de 314,5 °C, confirmada pela análise termogravimétrica com perda de massa de 85,5%. A mistura física de HP-βCD com CIAIFc apresentou menor resistência térmica do oligossacarídeo, visto que foi observado o surgimento de um evento endotérmico a uma temperatura menor de 279,8 °C. No entanto, a análise de DTG mostrou uma perda de massa de apenas 25,6 %. Esse resultado sugere que a menor temperatura de degradação da HP-βCD não afeta a estabilidade térmica do CIAIFc em sistemas sólidos.

A análise visual obtida por DSC, referente às análises térmicas apresentadas na Figura 23, pode ser observada na Figura 24, onde estão representadas as imagens de cada composto na temperatura inicial de 25 °C, na temperatura com o principal evento térmico de cada composto e na temperatura final de 500 °C.



**Figura 24** – Análise visual obtida por DSC da CIAIFc, da HP-βCD e da mistura física HP-βCD + CIAIFc (1:1, m/m), na temperatura inicial de 25 °C, na temperatura com o principal evento térmico de cada composto e na temperatura final de 500 °C.

A CIAIFc não mudou sua coloração ou característica aparente durante toda a análise. A 500° C podem ser observados pequenos pontos brilhantes, provavelmente, referente ao metal alumínio procedente do agente fotossensibilizante. A HP-βCD em temperatura ambiente é um pó fino e branco, que começa a se fundir a 300° C e, ao final da análise, a 500 °C, já está totalmente degradada.

Na mistura física HP-βCD + CIAIFc (1:1, m/m), a 25 °C, os dois sólidos podem ser facilmente distinguidos a olho nu, sendo que a HP-βCD se apresenta corada pelo contato com o corante CIAIFc. Durante a análise térmica, é possível

observar uma opacidade na coloração azul da CIAIFc, ao final da análise a 500 °C, mas sem perda de forma. Enquanto na HP- $\beta$ CD, é possível observar sua degradação através da completa mudança nas suas características. Provavelmente quando a HP- $\beta$ CD começa sua fusão, ela forma complexos *in situ* com a CIAIFc, que passa a lhe conferir proteção térmica, conferindo opacidade a CIAIFc que não se degrada devido sua elevada estabilidade térmica.

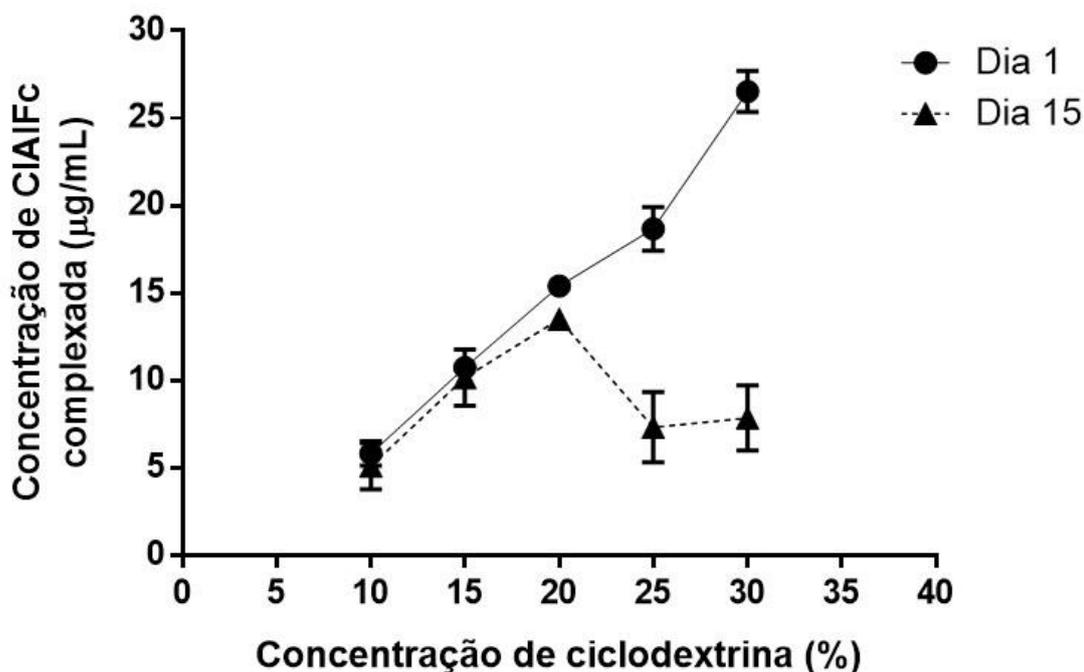
Assim, a interação física entre as duas substâncias não diminui a estabilidade da CIAIFc e parece não ter promovido qualquer tipo de instabilidade marcante no complexo.

#### **5.4. Obtenção e caracterização dos complexos CIAIFc-HP- $\beta$ CD**

Os complexos do fármaco com CD foram preparados a fim de aumentar a solubilidade da molécula em meio aquoso e evitar a sua agregação, possibilitando assim o desenvolvimento de uma formulação adequada contendo a CIAIFc para aplicação na pele.

Os diagramas de solubilidade foram preparados e analisados pela farmacêutica Ana Elise Lima Jaculi, cujo trabalho acadêmico é norteado pelo mesmo tema. Inicialmente, foram preparados diagramas de solubilidade dos complexos utilizando a SBE- $\beta$ CD e a HP- $\beta$ CD para a obtenção da melhor proporção de CIAIFc com cada CD. No entanto, mesmo após a diluição do complexo com metanol, não foi possível detectar por HPLC a CIAIFc quando complexada com a SBE- $\beta$ CD. Possivelmente, a concentração de fármaco solubilizada no complexo foi inferior ao LD do método validado de 0,03  $\mu$ g/mL, ou seja, a complexação com a SB- $\beta$ CD não foi adequada para o que se esperava.

O diagrama de solubilidade do complexo CIAIFc-HP- $\beta$ CD analisados um dia e 15 dias após o preparo pode ser analisado na Figura 25.



**Figura 25** – Diagrama de solubilidade de CIAIFc a partir do complexo CIAIFc-HP- $\beta$ CD com diferentes proporções de CD em água ultrapurificada (m/v) em intervalo de 15 dias.

A constante de estabilidade e a eficiência de complexação foram calculadas utilizando a regressão linear do dia 1 do diagrama de solubilidade (Figura 23) e apresentaram valores de 28,6 e  $2,0 \times 10^{-4} \text{ M}^{-1}$ , respectivamente, confirmando que a HP- $\beta$ CD foi capaz de solubilizar a CIAIFc em meio aquoso. A constante de estabilidade estima o grau da força de ligação do complexo (SINHA et al., 2004), enquanto a eficiência de complexação indica a relação de HP- $\beta$ CD complexada e livre (LOFTSSON e MÁSSON, 2004). Apesar dos valores encontrados serem inferiores aos encontrados na literatura para moléculas lipofílicas (JARHO et al., 1996; DOLIWA et al., 2001), as concentrações finais obtidas de CIAIFc complexadas foram suficientes para a realização dos ensaios posteriores. Além disso, a solubilidade da CIAIFc aumentou linearmente em função da concentração de HP- $\beta$ CD, classificando o diagrama de solubilidade como do tipo  $A_L$  e o valor do coeficiente angular da equação de reta obtida foi inferior a uma unidade, indicando uma estequiometria do complexo de 1:1 (HIGUCHI e CONNOR, 1965).

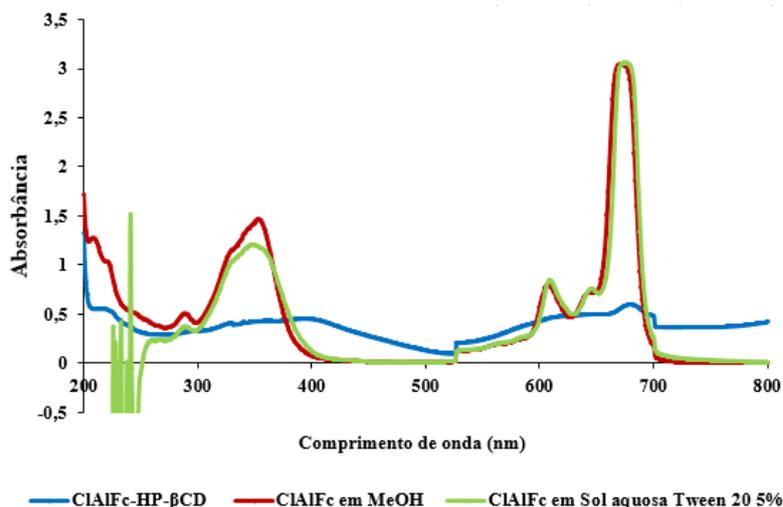
Os complexos de CIAIFc-HP- $\beta$ CD foram analisados em dois momentos distintos, com 14 dias de intervalo. Os complexos preparados com as maiores proporções de 25 e 30% de HP- $\beta$ CD em água ultrapurificada (m/v) apresentaram a

maior concentração de CIAIFc solubilizada em meio aquoso. No entanto, o complexo não apresentou estabilidade uma vez que após 15 dias de preparo a concentração de CIAIFc detectada foi menor do que a metade. Além disso, concentrações muito altas conferem uma viscosidade excessiva às formulações além de encarecer o produto final por conter uma quantidade excessiva de CD (POULIQUEN et al., 2007; CHEN et al., 2017).

Por outro lado, nos complexos preparados com as menores proporções de 10 e 15% de HP- $\beta$ CD em água ultrapurificada (m/v), a concentração de CIAIFc quantificada foi de, aproximadamente 6,0 e 11,0  $\mu$ g/mL, respectivamente, e não houve diferença estatística na concentração de CIAIFc presente no complexo após 15 dias de preparo. Por fim, a proporção intermediária de 20% de HP- $\beta$ CD em água ultrapurificada (m/v) solubilizou, aproximadamente, 15  $\mu$ g/mL do fármaco. Apesar de ter havido diferença estatística ( $p < 0,001$ ) entre os dias 1 e 15 de leitura, esta proporção foi selecionada para a realização dos complexos nos testes de permeação pois apresentou a maior solubilidade de CIAIFc com estabilidade considerável.

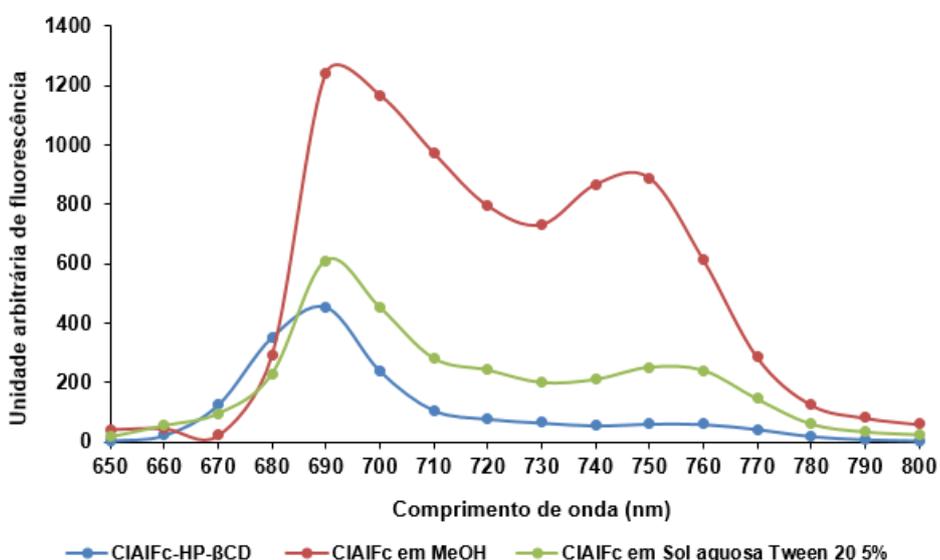
#### **5.4.1. Espectroscopia de absorção e emissão de fluorescência**

O espectro de absorção da CIAIFc (Figura 26) apresentou um pico de maior intensidade em 670 nm quando o agente fotossensibilizante estava solubilizado em metanol ou em solução aquosa de Tween<sup>®</sup> 20 a 5%, pH 7,4. Quando complexado com HP- $\beta$ CD, a CIAIFc apresentou um pico de menor intensidade nesse mesmo comprimento de onda. Esse comprimento de onda é ideal para aplicação da TFD, visto que a janela fototerapêutica ideal para penetração de luz no tecido acontece entre 600 e 850 nm, aumentando a eficiência do dano celular e a resposta tumoral à TFD (SILVA et al., 2011).



**Figura 26** – Espectro de absorção do complexo CIAIFc-HP- $\beta$ CD e da CIAIFc em metanol e Solução aquosa de Tween<sup>®</sup> 20 a 5%, pH 7,4, com varredura de 190 a 800 nm.

No espectro de emissão de fluorescência apresentado na Figura 27, a CIAIFc teve pico de maior intensidade em 690 nm quando diluído em metanol. Quando diluído em solução aquosa de Tween<sup>®</sup> 20 a 5%, pH 7,4, ou complexado com HP- $\beta$ CD, o agente fotossensibilizante apresentou fluorescência no mesmo comprimento de onda, mas também com menor intensidade.



**Figura 27** – Espectro de fluorescência do complexo CIAIFc-HP- $\beta$ CD e da CIAIFc em metanol e Solução aquosa de Tween<sup>®</sup> 20 a 5%, pH 7,4. Espectro de emissão analisado de 650 a 800 nm com comprimento de onda de excitação igual a 610 nm.

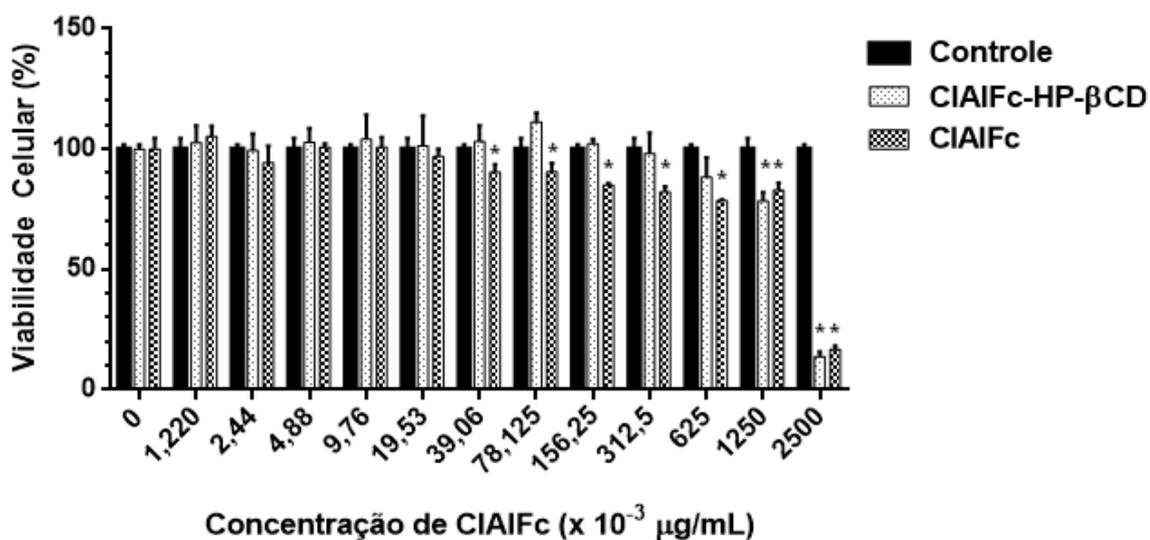
As propriedades fotofísicas de um agente fotossensibilizante podem ser alteradas dependendo da polaridade do solvente que estão dissolvidos ou ainda, pela restrição de movimentos da cavidade das CD. Silva e colaboradores (SILVA et al., 2011) em seus estudos também mostraram que o sinal de emissão e absorção do CIAIFc diminuía proporcionalmente com o aumento da quantidade de CD na solução. E ainda, a diminuição do sinal foi mais expressiva quando o agente fotossensibilizante esteve complexado com HP- $\beta$ CD e não com  $\beta$ CD, devido a maior interação da CIAIFc com HP- $\beta$ CD. Ou seja, a interação com as CD tende a reduzir drasticamente o sinal de fluorescência do composto em análise, o que corrobora nossos resultados.

No entanto, apesar da redução do sinal de fluorescência e absorção da CIAIFc devido as interações com as CD, ficou claro que o agente fotossensibilizante não perde suas características de absorção e emissão no mesmo comprimento de onda, ou seja, o complexo com CD que aumenta a solubilidade aquosa da CIAIFc, não inibe suas propriedades fototerapêuticas. De qualquer forma, espera-se que após aplicação cutânea, o agente fotossensibilizante se dissocie do complexo para penetrar a pele.

## **5.5. Avaliação *in vitro* da citotoxicidade do complexo de CIAIFc-HP- $\beta$ CD**

### **5.5.1. Avaliação da citotoxicidade**

A influência do complexo CIAIFc-HP- $\beta$ CD sobre a viabilidade celular foi analisada em cultura de células de melanoma da linhagem B16F10. Inicialmente, foi analisada a citotoxicidade sem nenhuma aplicação de luz, ou seja, as células foram expostas à formulação de interesse sem ativação por luz do agente fotossensibilizante. Os resultados estão apresentados na Figura 28.



**Figura 28** – Viabilidade de células de melanoma (B16F10) após incubação por 24 h com diferentes concentrações de CIAIFc-HP-βCD e CIAIFc em etanol no escuro. \*p < 0,05 comparados ao controle.

Ambas as amostras avaliadas contendo o agente sensibilizante (CIAIFc-HP-βCD e CIAIFc livre) apresentaram perfil de citotoxicidade dose-dependente. As amostras começaram a apresentar discreta toxicidade entre a faixa de concentração de 0,156 à 1,25 μg/mL. Na maior concentração avaliada (2,5 μg/mL), a citotoxicidade é significativa (p < 0,05) e expressiva, reduzindo a viabilidade celular para aproximadamente 16%.

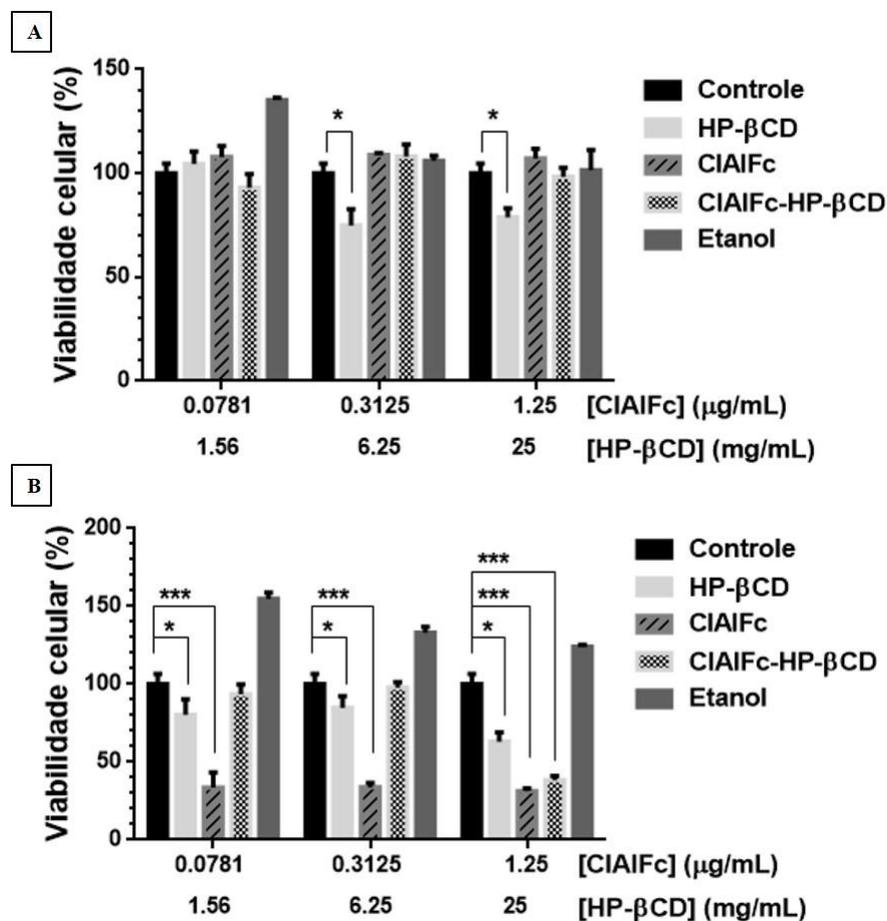
É interessante notar que a forma complexada da CIAIFc aumentou a concentração em que se começou a notar toxicidade do agente no escuro, uma vez que para a CIAIFc livre a toxicidade começou a ser percebida a 39,06 ng/mL enquanto para a forma complexada (CIAIFc-HP-βCD), somente a concentrações superiores a 625 ng/mL em relação ao controle. Esse resultado ocorre, possivelmente, pois o complexo reduz o contato direto da célula com o agente fotossensibilizante.

Considerando as concentrações iniciais que apresentaram diminuição da viabilidade celular, selecionou-se as concentrações de 0,0781; 0,3125 e 1,25 μg/mL para os próximos ensaios com aplicação da TFD (Figura 28).

### 5.5.2. Avaliação da citotoxicidade sem luz e após TFD

A TFD foi aplicada após tratamento das células com o complexo CIAIFc-HP-βCD com o objetivo de verificar a concentração de CIAIFc necessária para reduzir

a viabilidade celular. Na Figura 29, estão expressos os resultados da viabilidade celular na ausência de luz e após a TFD do complexo CIAIFc-HP- $\beta$ CD, da HP- $\beta$ CD em água, do CIAIFc livre em etanol, do etanol e do controle, ou seja, do meio celular sem nenhum tipo de tratamento.



**Figura 29** – Viabilidade de células de câncer de pele melanoma (linhagem B16F10) com diferentes concentrações de HP- $\beta$ CD, CIAIFc livre ou no complexo CIAIFc-HP- $\beta$ CD na ausência de luz (A) e após a terapia fotodinâmica – TFD – (B). Utilizou-se etanol como controle de CIAIFc livre. \* $p < 0,01$ ; \*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*  $p < 0,0001$ .

Os resultados de citotoxicidade das amostras não submetidas à TFD (sem incidência de luz) estão apresentados na Figura 29A. A HP- $\beta$ CD induziu discreta citotoxicidade, reduzindo a viabilidade celular em 26% nas concentrações de 6,25 e 25 mg/mL. Os demais grupos não mostraram alterações em relação ao controle.

A HP- $\beta$ CD apresentou baixo nível de toxicidade que varia de acordo com o composto complexado e a via de administração utilizada. Enquanto estudos relatam que a administração subcutânea da  $\beta$ CD já apresentou diminuição do peso

corporal, do peso do fígado e nefrotoxicidade, com aumento do peso do rim, outros estudos com administração oral não relatam nenhum efeito citotóxico (GOULD e SCOTT, 2005; RODRIGUES et al., 2017). Hodyna e colaboradores (HODYNA et al 2015) relataram a redução de toxicidade do fármaco veiculado quando complexado com  $\beta$ CD, aumentando a  $DL_{50}$  de 7,0 para 100 mg/mL.

Além de melhorar a solubilidade do agente fotossensibilizante no complexo e permitir sua veiculação em meio aquoso, a HP- $\beta$ CD é menos tóxica do que sua CD originária (GOULD e SCOTT, 2005). A HP- $\beta$ CD apresenta baixa toxicidade e é bem tolerada na maioria das espécies. As pequenas alterações já relatadas na administração por via oral ou intravenosa, como histopatologias nos pulmões, fígado e rins, foram todas reversíveis. Em humanos, doses diárias de 16 a 24 g administradas por 14 dias, apresentou como único efeito adverso e reversível, diarreia (IRIE e UEKAMA, 1997; SCOTT e GOULD, 2005). Recentemente, Agabio e colaboradores (AGABIO et al., 2017) conseguiram complexar a molécula hidrofóbica de tetrahidrocanabidiol com HP- $\beta$ CD sem nenhum efeito adverso em ratos, propondo assim o teste em humanos. Na administração tópica, Chen e colaboradores (CHEN et al., 2017) complexaram minoxidil – utilizado para o crescimento capilar – com HP- $\beta$ CD, obtendo resultados satisfatórios e sem o aparecimento de nenhum efeito indesejado com a aplicação cutânea.

Importante ressaltar que o objetivo desse trabalho é a administração por via tópica da formulação. Portanto, acredita-se que a HP- $\beta$ CD não permeie a pele devido seu tamanho. Assim, o efeito sistêmico esperado é desprezível ou até mesmo nulo.

A atividade citotóxica de uma ftalocianina dependerá do tipo de complexo formado ou da formulação em que estará inserida. A literatura apresenta resultados recentes bem expressivos da inibição da viabilidade celular com a utilização da TFD para a CIAIFc incorporada em nanoemulsões e nanocápsulas com ação antimicrobiana (RIBEIRO et al., 2013), para tratamento de câncer de células mamárias (MUEHLMANN et al., 2015) e câncer de próstata (LEANDRO et al., 2017). Formulações poliméricas de Pluronic F-123 e F-127 contendo o mesmo agente fotossensibilizante para eliminação de *S. aureus* e *C. albicans* (VILSINSKI et al., 2015) e contra linhagem celular humana de carcinoma de pulmão (PY-DANIEL et al., 2016) também demonstraram bons resultados.

Neste estudo, foi verificado que após a TFD (Figura 29B), ou seja, a irradiação das células tratadas com as diferentes formulações e controle, observou-se que a HP- $\beta$ CD manteve o padrão de citotoxicidade similar ao da Figura 29A, reduzindo discretamente a viabilidade celular nas menores doses. Em contrapartida, na dose de 25 mg/mL, a redução na viabilidade foi mais expressiva (37%). Os grupos tratados com CIAIFc livre, independente da concentração avaliada, mostraram redução de aproximadamente 67% na viabilidade celular. Já o complexo CIAIFc-HP- $\beta$ CD induziu alterações na viabilidade celular apenas na concentração equivalente de CIAIFc de 1,25  $\mu$ g/mL, em que reduziu aproximadamente 62% da viabilidade celular.

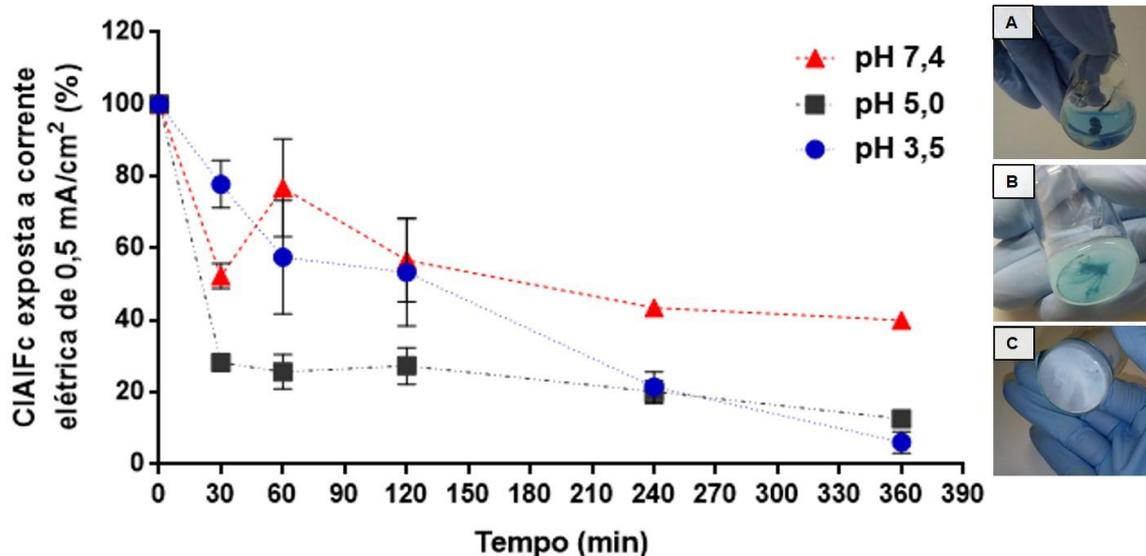
A forma complexada da CIAIFc manteve a atividade fotodinâmica da observada para o fármaco livre, principalmente na maior concentração avaliada. Em concentrações inferiores a 1,25  $\mu$ g/mL, a atividade citotóxica frente aos melanomas foi muito discreta, o que é esperado devido à proteção que a complexação confere ao agente fotossensibilizante. Este controle foi maior que o observado para outros sistemas, como nanoemulsões (MUEHLMANN et al., 2015; LEANDRO et al., 2017) ou micelas poliméricas (PY-DANIEL et al., 2016).

De qualquer maneira, os complexos têm a vantagem de serem formados de maneira dinâmica, de modo que a interação do fármaco com a CD é reversível (SZEJTLI, 1991; CRINI, 2004). Ou seja, uma vez que a CIAIFc for sendo liberada para dentro do tecido neoplásico, ela estará em sua forma livre e terá o efeito esperado mesmo que em menores concentrações.

### **5.6. Estabilidade elétrica da CIAIFc complexada**

A estabilidade elétrica dos complexos foi verificada para garantir que a aplicação da corrente elétrica durante os experimentos envolvendo iontoforese não reverteria a formação da forma complexada da CIAIFc-HP- $\beta$ CD.

Inicialmente verificou-se que o complexo formado CIAIFc-HP- $\beta$ CD apresentava pH igual a 3,5. Sabendo que o pH da pele varia de 5 a 5,5 (OHMAN e VAHLQUIST, 1998) e que o pH mais ácido pode causar irritabilidade cutânea, o pH da formulação foi ajustado para 7,4 e a estabilidade foi determinada nas três faixas de pH (Figura 30).



**Figura 30** – Estabilidade elétrica do complexo de CIAIFc-HP-βCD nos pH 3,5, 5,0 e 7,4, com aplicação de corrente elétrica de 0,5 mA/cm<sup>2</sup>, durante 6 h, calculada pelo teor de CIAIFc; Característica visual do complexo após 6 h em pH 3,5 (C) e 5,0 (B) e pH 7,4 (A).

Os complexos em pHs 3,5 e 5,0 perderam sua estabilidade antes de 1 h de exposição à corrente elétrica de 0,5 mA, podendo ser observado o precipitado do complexo à olho nu (ver Figuras 30B e 30C). Como a CIAIFc é praticamente insolúvel em água, ao desfazer o complexo com HP-βCD ocorre a precipitação do agente fotossensibilizante e, ao final das 6h, a concentração de CIAIFc decaiu em quase 100% da concentração inicial.

O complexo com pH ajustado para 7,4 permaneceu com todas as características visuais após as 6h de exposição a corrente elétrica de 0,5 mA (Figura 30A). Apesar disso, ele parece ir decaindo até aproximadamente 60% da quantidade de CIAIFc inicial. Essa quantidade de complexo remanescente após 6 h, foi diferente estatisticamente ( $p < 0,0001$ ) dos outros pHs testados.

Conforme foi discutido anteriormente, os complexos com CD são formados de maneira que o fármaco se acomoda na cavidade da CD interagindo de maneira reversível (SZEJTLI, 1991; CRINI, 2004). É esperado, portanto, que qualquer perturbação no meio desfaça essa dinâmica. De fato, a passagem da corrente elétrica parece ter perturbado essa interação, mas a variação notada de tempos em tempos que inicialmente não mostrou uma lógica de decaimento, além da não

observação de precipitados no fim das 6 h de experimento, indicam que o complexo em pH 7,4 tende a manter sua estabilidade em um nível aceitável. Desta forma, eles foram utilizados nos experimentos subsequentes que envolviam a iontoforese.

### 5.7. Estudos *in vitro* de permeação do complexo de CIAIFc-HP- $\beta$ CD em pele de suínos utilizando microagulhamento e iontoforese

Todos os ensaios de permeação foram realizados com o complexo CIAIFc-HP- $\beta$ CD em pH 7,4, por ter sido o mais estável frente a corrente elétrica, como apresentado no item 5.5.

A permeação passiva foi realizada por 12 h e os resultados estão expressos na Tabela 7 como porcentagem de CIAIFc recuperada em relação à concentração da formulação inicial. Essa normalização se deu ao fato de haver pequenas variações da quantidade de CIAIFc complexada em cada formulação preparada ( $\pm 2\%$ ).

**Tabela 7** – CIAIFc recuperada das frações da pele (EC, FP e PR) e da pele inteira após 12 h de permeação passiva *in vitro*, a partir do complexo CIAIFc-HP- $\beta$ CD (n=5). EC: Estrato Córneo; FP: Folículo Piloso; PR: Pele Remanescente.

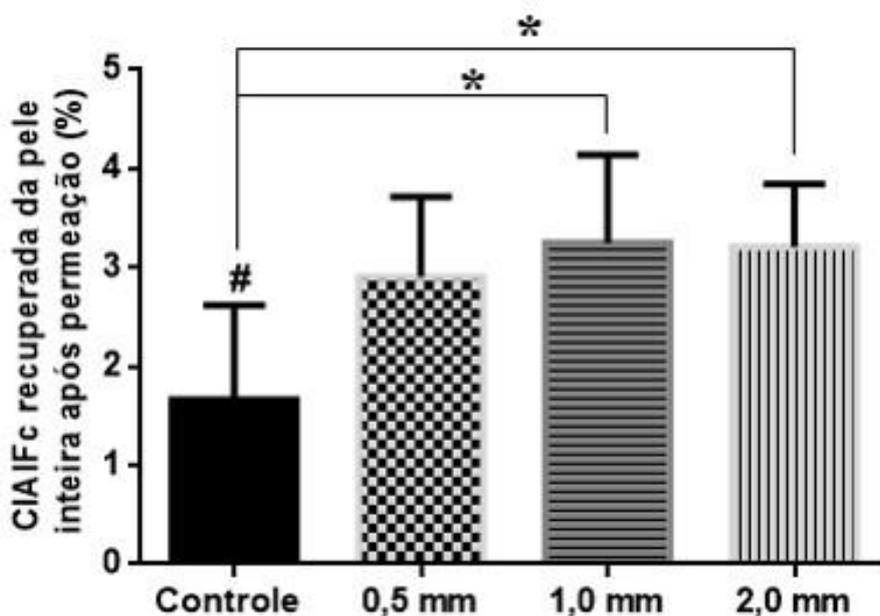
Camadas da pele	CIAIFc recuperado (%)
EC	5,0 $\pm$ 1,2
FP	abaixo do LQ
PR	abaixo do LQ
Pele inteira	5,5 $\pm$ 0,8

No FP e PR, a CIAIFc foi detectada, mas as concentrações ficaram abaixo do LQ do método analítico validado. Portanto, o experimento foi realizado e dosado também na pele inteira. Assim, nota-se que 5% da dose aplicada ficou retida no EC, enquanto aproximadamente apenas 0,5% da dose de CIAIFc penetrou para as camadas mais profundas da pele.

De fato, não era esperado que o complexo favorecesse a permeação passiva da CIAIFc uma vez que se trata de uma espécie com alto peso molecular e com baixo coeficiente de partição octanol/água ( $\log P_{o/w}$  entre -3 e zero) e, portanto, uma alta dificuldade de se difundir para o interior da pele (LOFTSSON et al., 2005;

MICHALUN e MICHALUN, 2011). Por outro lado, a alta lipofilicidade da CIAIFc parece favorecer seu acúmulo no EC (QUINTÃO et al., 2015), de modo que após um tempo longo de experimento (12 h), somente 0,5% da dose conseguiu se difundir mais internamente na pele após transpassar essa primeira barreira.

Na tentativa de aumentar a penetração da CIAIFc a partir da formulação do complexo CIAIFc-HP- $\beta$ CD, a permeação do agente fotossensibilizante foi verificada após o pré-tratamento da pele com três diferentes tipos de microagulhas sólidas. As microagulhas tinham tamanhos distintos (0,5; 1,0 e 2,0 mm) e foram passadas sobre a pele antes de cada tratamento passivo com a formulação realizado por 12 h. Um controle em que se retirou todo o EC da pele antes da aplicação da CIAIFc-HP- $\beta$ CD também foi realizado para fins de comparação. Os resultados das permeações *in vitro* com utilização das microagulhas estão apresentados na Figura 31.



**Figura 31** – CIAIFc recuperada da pele inteira após 12 h de permeação *in vitro* com utilização de microagulhas de 0,5, 1,0 e 2,0 mm a partir do complexo CIAIFc-HP- $\beta$ CD, pH 7,4 (n=5). O controle da permeação com microagulhas foi uma permeação em pele sem EC. # abaixo do LQ; \*p < 0,05.

O experimento controle (aplicação na pele sem o EC) resultou em uma penetração do fármaco em quantidade detectada, mas abaixo do LQ do método. Já as aplicações das microagulhas promoveram a penetração de concentrações quantificáveis do agente fotossensibilizante, porém não diferente significativamente

ao quantificado na pele total sem a utilização das microagulhas. Além disso, não houve diferença significativa entre as permeações de CIAIFc na pele microporada, independente do tamanho das microagulhas utilizadas.

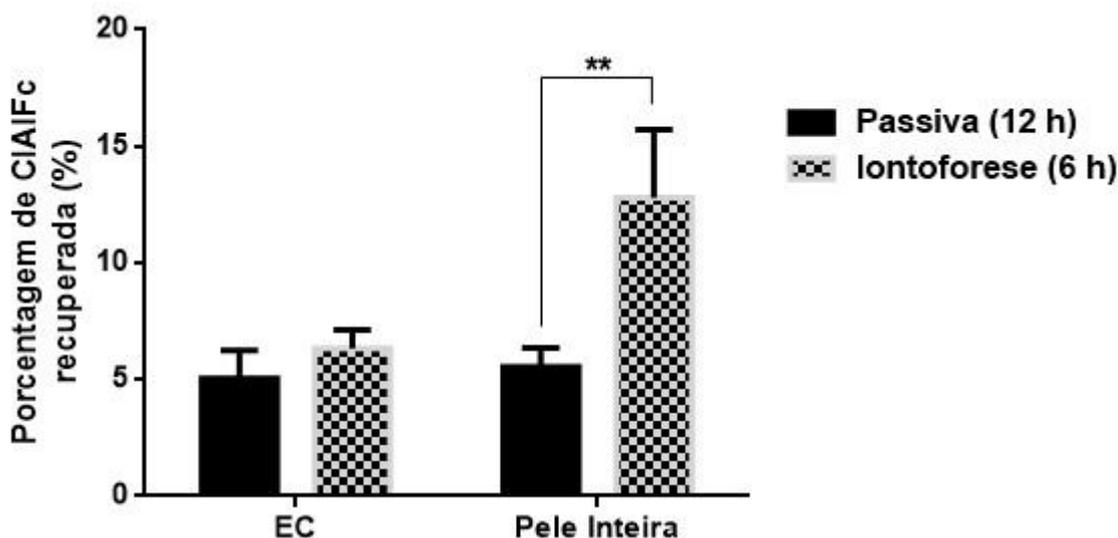
Os resultados apresentados na Figura 31 apontam para a importância do EC intacto para promover a penetração do fármaco, uma vez que a retirada prévia desta camada ou mesmo a sua ruptura por meio de pré-tratamento com microagulhas gerou uma redução na quantidade total de CIAIFc retida na pele inteira, muito provavelmente pela redução da quantidade dessa camada para que a CIAIFc pudesse interagir.

Sendo assim, buscou-se um segundo método para tentar aumentar a penetração da CIAIFc a partir do complexo CIAIFc-HP- $\beta$ CD.

A utilização da iontoforese tem promovido uma maior permeação de fármacos hidrofílicos através da pele, devido a uma facilitação dessas espécies para atravessar o EC e atingir o tecido alvo, de forma não-invasiva e indolor. A quantidade de fármaco transportada para o tecido pode ser controlada pela intensidade da corrente e duração da aplicação, assim como pela área de exposição na pele da formulação em contato com o eletrodo (KALIA et al., 2004; GRATIERI et al., 2008; DUBEY e KALIA, 2011; GELFUSO et al., 2011; GRATIERI et al., 2008). Souza et al (SOUZA et al., 2011) conseguiram aumentar significativamente a penetração de uma ftalocianina de zinco hidrofílica (negativamente carregada) *in vitro* e *in vivo* utilizando iontoforese. Após 6 h, a iontoforese catódica *in vitro* foi capaz de aumentar em mais de oito e seis vezes a quantidade de ftalocianina no EC e na epiderme viável, respectivamente. *In vivo*, apenas 15 min foram suficientes para aumentar em, aproximadamente, 11 vezes a absorção nas camadas mais profundas da pele.

No entanto, a ftalocianina citada possui características hidrofílicas e carga negativa. Portanto, a CIAIFc – extremamente lipofílica – foi complexada com HP- $\beta$ CD para estar inserida em meio hidrofílico e, somente assim, a formulação poder receber a aplicação da iontoforese.

Os resultados das permeações passiva e iontoforética do complexo CIAIFc-HP- $\beta$ CD, tanto no EC quanto na pele inteira, estão apresentados na Figura 32.



**Figura 32** – CIAIFc recuperada do EC ou pele inteira após 12 h de permeação passiva ou 6 h de permeação iontoforética *in vitro* a partir do complexo CIAIFc-HP- $\beta$ CD, em pH 7,4 (n = 4-5). \*\*p < 0,01.

A comparação foi realizada entre permeação passiva e transporte iontoforético em tempos distintos porque para experimento passivo realizado por 6 h não se detectou quantidades significativas do fármaco em nenhuma das camadas analisadas. Assim, pelas análises da Figura 32, tem-se que apenas 6 h de iontoforese foi capaz de promover a permeação de 2,3 vezes mais CIAIFc do que em 12 h de tratamento passivo da pele com a mesma formulação. Se considerada a penetração na pele descontando-se a quantidade retida no EC para se estimar a quantidade de fármaco retida na pele viável, ou seja, nas camadas da pele abaixo do EC, tem-se que a penetração de CIAIFc aumentou em aproximadamente 12 vezes com a aplicação de iontoforese em relação à permeação passiva (de 0,5% para 6% da dose). A iontoforese, portanto foi eficiente não somente em aumentar a penetração do fármaco na pele total, mas também em estimular a penetração cutânea mais profunda do fármaco, mesmo considerando-se um tempo 2 vezes menor de aplicação da formulação do complexo.

Quanto à penetração da CIAIFc no EC, a iontoforese não alterou de maneira significativa se comparado à permeação passiva. Propõe-se, desta forma, que o EC tem papel importante na penetração passiva do fármaco ao passo que a penetração iontoforética do fármaco deve estar relacionado com a entrada do complexo através do infundíbulo folicular, com posterior difusão do fármaco livre

para a epiderme viável e derme. De fato, vários estudos já mostram que a principal rota de movimentação de íons e moléculas sobre a influência da iontoforese se dá por meio da via transfolicular, devido à baixa resistência oferecida pelos apêndices da pele (TURNER e GUY, 1997; BARRY, 2001; KALIA et al., 2004; SOUZA et al., 2011; GELFUSO et al., 2013).

Outros trabalhos na literatura também utilizaram a CD para aumentar a solubilidade aquosa de um fármaco lipofílico, possibilitando assim a aplicação da iontoforese para a permeação para camadas mais internas da pele. A SBE- $\beta$ CD foi utilizada para aumentar a solubilidade aquosa do anestésico lipofílico propofol. Com a aplicação da iontoforese, o fármaco permeou quatro vezes mais do que quando comparado com a permeação passiva (JULURI e MURTHY, 2014). Já a HP- $\beta$ CD – mesma CD utilizada neste trabalho – foi utilizada para aumentar a solubilidade aquosa das moléculas anti-inflamatórias de hidrocortisona (CHANG e BANGA, 1998) e de piroxicam (DOLIWA et al., 2001). Após aplicação da iontoforese, houve um aumento na permeação de 16 e 3,4 vezes, respectivamente, para esses fármacos.

Assim, a iontoforese mostrou-se uma técnica eficiente para promover a permeação da CIAIFc a partir do complexo CIAIFc-HP- $\beta$ CD em camadas mais profundas da pele. Tanto a aplicação da iontoforese quanto a complexação do fármaco em CD pareceram cruciais para promover o acúmulo do agente fotossensibilizante no tecido alvo neoplásico, ainda que *in vitro*, possibilitando uma posterior aplicação da TFD para o tratamento de câncer de pele, especialmente os do tipo melanoma.

## 6. Síntese dos resultados

O método analítico para doseamento da CIAIFc foi validado por HPLC e apresentou seletividade, robustez, linearidade, precisão, exatidão/recuperação e limite de detecção e quantificação que permitiram a análise do agente fotossensibilizante nas formulações e, especialmente, nos estudos envolvendo permeação cutânea.

A solubilidade da CIAIFc foi analisada em metanol, etanol e solução aquosa de Tween® 20 a 5%, pH 7,4, e as concentrações foram de  $9,9 \pm 2,8$ ,  $5,7 \pm 0,3$  e  $0,7 \pm 0,4$  mg/mL, respectivamente. E, a compatibilidade entre os sólidos com as análises térmicas de DSC e DTG, confirmaram a estabilidade térmica da CIAIFc na presença da HP- $\beta$ CD.

Através do diagrama de solubilidade, escolheu-se a proporção de 20% de HP- $\beta$ CD para o preparo do complexo com CIAIFc. O complexo CIAIFc-HP- $\beta$ CD foi caracterizado avaliando-se seu espectro de absorção e emissão e por meio de técnicas de análise térmica. As análises confirmaram que o agente fotossensibilizante não perde sua atividade fotodinâmica mesmo estando no complexo.

Os ensaios de citotoxicidade foram realizados com células de câncer de pele melanoma da linhagem B16F10. Na ausência de luz, a CIAIFc e o complexo CIAIFc-HP- $\beta$ CD apresentaram toxicidade em concentrações iniciais de 39,06 e 625 ng/mL, respectivamente. Com a aplicação da TFD, a HP- $\beta$ CD, reduziu discretamente a viabilidade celular em baixas concentrações (1,56 e 6,25 mg/mL), mas reduziu para 37% quando utilizada a concentração de 25 mg/mL. A CIAIFc livre reduziu em 67% a viabilidade celular em quaisquer concentrações analisadas (0,08; 0,31 e 1,25 mg/mL). No entanto, o complexo CIAIFc-HP- $\beta$ CD reduziu significativamente ( $p < 0,05$ ) a viabilidade celular em 62% somente na concentração de 1,25 mg/mL.

A permeação passiva confirmou que a CIAIFc não penetra bem a pele devido suas características lipofílicas e ao tamanho do complexo formado. A utilização de microagulhas sólidas, antes da permeação, foi ineficiente para promover a permeação da CIAIFc. No entanto, a permeação iontoforética promoveu um aumento de 2,3 vezes mais CIAIFc doseado na pele inteira, em um tempo menor e promoveu uma maior penetração do fármaco nas camadas mais profundas da pele.

## **7. Conclusão**

O complexo CIAIFc-HP- $\beta$ CD proporcionou a inserção do agente fotossensibilizante em meio aquoso, o que possibilitou a sua formulação tópica, melhorando sua estabilidade fotodinâmica. A permeação iontoforética da CIAIFc complexada seguida da aplicação da TFD, portanto, parece ser uma alternativa efetiva e não invasiva para o tratamento de tumores cutâneos, especialmente os do tipo melanoma.

## 8. Referências Bibliográficas

ACHAR, B. N.; FOHLEN, G. M.; PARKER, J. A. Phthalocyanine Polymers - Synthesis and characterization of some metal phthalocyanine sheet oligomers. *J Polym Sci A Polym Chem*, v. 20, p. 1785-1790, 1982.

AGABIO, R.; SANNA, F.; LOBINA, C.; MONDUZZI, M.; NAIRI, V.; CUGIA, F.; MAMELI, S.; PISANU, G. M.; GESSA, G. L.; MELIS, M. R. Is 2-Hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin a suitable carrier for central administration of D9 - tetrahydrocannabinol? Preclinical Evidence. *Drug Develop Res*, v. 78, n. 8, p. 411-419, 2017.

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

AMERICAN CANCER SOCIETY. Disponível em: [https://cancerstatisticscenter.cancer.org/?\\_ga=2.234252254.1766675534.1515609469-755700578.1515460546#!/](https://cancerstatisticscenter.cancer.org/?_ga=2.234252254.1766675534.1515609469-755700578.1515460546#!/). Acessado em jan. 2018.

ANGELO, T.; CUNHA-FILHO, M. S. S.; GELFUSO, G. M.; GRATIERI, T. Chromatographic method for clobetasol propionate determination in hair follicles and in different skin layers. *Biomed Chromatogr*, vol. 31, p. 1-7, 2017.

ANGELO, T.; PIRES, F. Q.; GELFUSO, G. M.; SILVA, J. K. R.; GRATIERI, T.; CUNHA-FILHO, M. S. S. Development and validation of a selective HPLC-UV method for thymol determination in skin permeation experiments. *J Chromatogr B*, vol. 1022, p. 81–86, 2016.

ARMSTRONG, B. K.; KRICKER, A. The epidemiology of UV induced skin cancer. *J Photochem Photobiol B*, v. 63, n. 1–3, p. 8–18, 2001.

BALDEA, I.; ION, R. M.; OLTEANU, D. E.; NENU, I.; TUDOR, D.; FILIP, A. G. Photodynamic therapy of melanoma using new, synthetic porphyrins and phthalocyanines as photosensitisers – a comparative study. *Clujul Med*, v. 88, n. 2, p. 175–180, 2015.

BARLOW, J. O.; ZALLA, M. J.; KYLE, A. et al. Treatment of basal cell carcinoma with curettage alone. *J Am Acad Dermatol*, v. 54, p. 1039–1045, 2006.

BARRY, B. W. Novel mechanisms and devices to enable successful transdermal drug delivery. *Eur J Pharm Sci*, v. 14, p. 101–114, 2001.

BEACK, S.; KONG, W. H.; JUNG, H. S.; DO, I. H.; HAN, S.; KIM, H.; KIM, K. S.; YUN, S. H.; HAHN, S. W. Photodynamic therapy of melanoma skin cancer using carbon dot – chlorin e6 – hyaluronate conjugate. *Acta Biomater*, v. 26, p. 295–305, 2015.

BEEBY, A.; FITZGERALD, S.; STANLEY, C. F. Protonation of tetrasulfonated zinc phthalocyanine in aqueous acetonitrile solution. *Photochem Photobiol*, v. 74, p. 566-569, 2001.

BICALHO, L. S.; LONGO, J. P.; CAVALCANTI, C. E.; SIMIONI, A. R.; BOCCA, A. L.; SANTOS, M. D. E. F.; TEDESCO, A. C.; AZEVEDO, R. B. Photodynamic therapy leads to complete remission of tongue tumors and inhibits metastases to regional lymph nodes. *J Biomed Nanotechnol*, v.9, p.811-8, 2013.

BICHAKJIAN, C. K.; OLENCKI, T.; AASI, S. Z. Basal cell skin cancer, version 1.2016, nccn clinical practice guidelines in oncology. *J Natl Compr Canc Netw*, v. 14, p. 574-597, 2016.

BONNETT, R. Photosensitizers of the porphyrin and phthalocyanine series for -- photodynamic therapy. *Chem Soc Rev*, v. 1, p. 19-33, 1995.

BOTELHO, G.; VALIAU, C.; SILVA, A. M. Effects of cyclodextrins on off-odours removal of red wine: An innovative approach. *Cienc Téc Vitiv*, v. 26, n. 2, p. 63-68, 2011.

BRAATHEN, L. R.; SZEIMIES, R. M.; BASSET-SEGUIN, N.; BISSONNETTE, R.; FOLEY, P.; PARISER, D.; ROELANDTS, R.; WENBERG, A. M.; MORTON, C. A. Guidelines on the use of photodynamic therapy for nonmelanoma skin cancer: An international consensus. *J Am Acad Dermatol*, v. 56, p. 125-43, 2007.

BRANTSCH, K. D.; MEISNER, C.; SCHONFISCH, B. et al. Analysis of risk factors determining prognosis of cutaneous squamous cell carcinoma: a prospective study. *Lancet Oncol*, v. 9, n. 8, p. 713–720, 2008.

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

CALZAVARA-PINTON, P. G.; VENTURINI, M.; SALA, R. Photodynamic therapy: update 2006. Part 1: Photochemistry and photobiology. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, v. 21, p. 293-302, 2007.

CAMPOS, P. M.; PRAÇA, F. S. G.; BENTLEY, M. V. L. B. Quantification of lipoic acid from skin samples by HPLC using ultraviolet, electrochemical and evaporative light scattering detectors. *J Chromatogr B*, vol. 1019, pp. 66-71, 2016.

CASTANO, A. P.; DEMIDOVA, T. N.; HAMBLIN, M. R. Mechanisms in photodynamic therapy: part one—photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiagnosis Photodyn Ther*, v. 1, p. 279—293, 2004.

CHALLA, R.; Ahuja, A.; ALI, J.; KHAR, R. K. Cyclodextrins in drug delivery: an updated review. *AAPS PharmSciTech*, v. 6, n. 2, p. 329-357, 2005.

CHANG, S. L.; BANGA, A. K. Transdermal iontophoretic delivery of hydrocortisone from cyclodextrin solutions. *J Pharm Pharmacol*, v. 50, p. 635-640, 1998.

CHANG, N. B.; FENG, R.; GAO, Z. et al. Skin cancer incidence is highly associated with ultraviolet-B radiation history. *Int J Hyg Environ Health*, v. 213, p. 359-368, 2010.

CHEN, T. C.; YU, S. C.; HSU, C. M.; TSAI, F. J.; TSAI, Y. Minoxidil–2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin inclusion complexes: characterization and in vivo evaluation of an aqueous solution for hair growth in rats. *J Incl Phenom Macrocycl Chem*, v. 88, n. (1-2), p. 27-34, 2017.

CHEN, Y.; FU, R.; XU, J.; DU, W.; WANG, X.; FANG, W. Thermodynamic (volume and viscosity) of amino acids in aqueous hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin solutions at different temperatures. *J Chem Thermodyn*, v.113, p.388-393.

CHOI, S. H.; KIM, K. H. SONG, K. H. Effect of methyl aminolevulinate photodynamic therapy with and without ablative fractional laser treatment in patients with microinvasive squamous cell carcinoma a randomized clinical trial. *JAMA Dermatol*, v. 153, p. 289–295, 2017.

CRINI, G. Review: A history of cyclodextrins. *Chem Rev*, v. 114, p. 10940–10975, 2014.

CUNHA-FILHO, M. S. S.; SÁ-BARRETO, L. C. L. Use of cyclodextrins to form inclusion complexes of pharmaceutical interest. *J Basic Appl Pharm Sci*, v. 28, p. 1-9, 2007.

DELMAN, A. D.; KELLY, J. J.; SIMMS, B. B. Thermal stability of structurally related polymers containing carborane and phthalocyanine groups. *J Polym Sci A*, v. 8, p. 111-123, 1970.

DENARI, G. B.; CAVALHEIRO, E. T. D. Princípios e aplicações de análise térmica. Universidade de São Paulo – Instituto de Química de São Carlos (IQSC), p.1-9, 2012.

DERMAPEN ROLLER SYSTEM. Disponível em: <http://www.dermapenworld.com/>. Acessado em jan. 2018.

DODDABALLAPUR, S. Microneedling with dermaroller. *J Cutan Aesthet Surg*, v. 2, n. 2, p. 110–111, 2009.

DOLIWA, A.; SANTOYO, S.; YGARTUA, P. Transdermal iontophoresis and skin retention of piroxicam from gels containing piroxicam: Hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin Complexes. *Drug Dev Ind Pharm*, v. 27, n. 8, p. 751–758, 2001.

DOLMANS, D. E. J. G. J.; FUKUMURA, D.; JAIN, R. K. Photodynamic therapy for cancer. *Nat Rev Cancer*, v. 3, p. 380-387, 2003.

DONNELLY, R. F.; MAJITHIYA, R.; SINGH, T. R., et al. Design, optimization and characterisation of polymeric microneedle arrays prepared by a novel laser-based micromoulding technique. *Pharm Res*, v. 28, n. 1, p. 41-57, 2011.

DUBEY, S.; KALIA, Y.N. Electrically-assisted delivery of an anionic protein across intact skin: cathodal iontophoresis of biologically active ribonuclease T1. *J Control Release*, v. 152, p. 356–362, 2011.

GELFUSO, G.M.; FIGUEIREDO, F.V.; GRATIERI, T.; LOPEZ, R.F. The effects of pH and ionic strength on topical delivery of a negatively charged porphyrin (TPPS4). *J Pharm Sci*, v.97, p.4249-57, 2008.

GELFUSO, G. M.; GRATIERI, T.; SOUZA, J.G.; THOMAZINE, J. A.; LOPEZ, R. F.V. The influence of positive or negative charges in the passive and iontophoretic skin penetration of porphyrins used in photodynamic therapy. *Eur J Pharm Biopharm*, v. 77, p. 249–256, 2011.

GELFUSO, G. M.; GRATIERI, T.; DELGADO-CHARRO, M. B.; GUY, R. H. VIANNA-LOPEZ, R. F. Iontophoresis-targeted, follicular delivery of minoxidil sulfate for the treatment of alopecia. *J Pharm Sci*, v.102, p.1488-1494, 2013.

GELLER, A. C.; COLDITZ, G.; OLIVERIA, S. et al. Use of sunscreen, sunburning rates, and tanning bed use among more than 10,000 US children and adolescents. *Pediatr*, v. 109, p. 1009-1014, 2002.

GRINBLAT, B. M.; NETO, C. F.; SACNCHES, J. A.; SZEIMIES, R. M.; OLIVEIRA, A. P.; TOREZAN, L. A. R. Daylight photodynamic therapy for actinic keratoses in São Paulo, Brazil. *Photodermatol, Photoimmunol Photomed*, v. 31, p. 54–56, 2015.

GORDON, R. Skin cancer: an overview of epidemiology and risk factors. *Semin Oncol Nurs*, v. 29, n. 3, p. 160-169, 2003.

GOULD, S.; SCOTT, R. C. 2-Hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin (HP- $\beta$ -CD): A toxicology review. *Food Chem Toxicol*, v. 43, p. 1451–1459, 2005.

GRATIERI, T.; GELFUSO, G.M.; LOPEZ, R.F.V. Princípios básicos e aplicação da iontoforese na penetração cutânea de fármacos. *Quim Nova*, v. 31, n. 6, p. 1490-1498, 2008.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. *Cell*, v.100, issue 1, p. 57-70, 2000.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, v.144, issue 5, p. 646-674, 2011.

HENDERSON, B. W.; DOUGHERT, T. J. How does photodynamic therapy work? *Photochem Photobiol*, v. 55, n. 1, p. 145-157, 1992.

HIGUCHI, T.; CONNORS, K. A. Phase solubility techniques. *Adv Anal Chem Instrum*, v. 4, p. 117-212, 1965.

HODYNA, D.; BARDEAU, J. F.; METELYTSIA, L.; RIABOV, S.; KOBRINA, L.; LAPTIY, S.; KALASHNIKOVA, L.; PARKHOMENKO, V.; TARASYUK, O.; ROGALSKY, S. Efficient antimicrobial activity and reduced toxicity of 1-dodecyl-3-

methylimidazolium tetrafluoroborate ionic liquid/ $\beta$ -cyclodextrin complex. *Chem Eng J*, p. 1-26, 2015.

HUO, Y.; LIU, Y.; BAI, Z.; CAI, Q. Determination of (4E,6E,12E)-tetradecatriene-8,10-diyne-1,3-diyl diacetate in rat plasma and tissues by HPLC-UV method and their application to a pharmacokinetic and tissue distribution study. *J Anal Methods Chem*, v. 2014, 7 pages, 2014.

HUTCHIN, M. E.; KARIAPPER, M. S.; GRACHTCHOUK, M. et al. Sustained Hedgehog signaling is required for basal cell carcinoma proliferation and survival: conditional skin tumorigenesis recapitulates the hair growth cycle. *Genes Dev*, v. 19, n. 2, p. 214–23, 2005.

ICH, “Q2(R1), Validation of analytical procedures: text and methodology,” in *Proceedings of the International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*, Geneva, Switzerland, 2005.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA). Disponível em <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/inca/portal/home>. Acessado em fev. 2018.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA). *Rev Rede Cancer*, n. 18, p. 21, 2012.

IRIE, T.; UEKAMA, K. Pharmaceutical applications of Cyclodextrins. III. Toxicological issues and safety evaluation. *J Pharm Sci*, v. 86, p. 147–162, 1997.

ISSA, M. C. A., MANELA-AZULAY, M. Terapia fotodinâmica: revisão da literatura e documentação iconográfica. *An Bras Dermatol*, v. 85, n. 4, p. 501-511, 2010.

JADOUL, A.; BOUWSTRA, J. A.; PREAT, V. Effects of iontophoresis and electroporation on the stratum corneum: review on the biophysical studies. *Adv Drug Deliv Rev*, v.35, p.89-105, 1999.

JARHO, P.; URTTI, A.; PATE, D. W.; SUHONEN, P.; JÄRVINEN, T. Increase in aqueous solubility, stability and in vitro corneal permeability of anandamide by hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin. *Int J Pharm*, v. 137, p. 209-216, 1996.

JULIAN, C.; BOWERS, P. W.; PRITCHARD, C. A comparative study of the effects of disposable and Volkmann spoon currettes in the treatment of basal cell carcinoma. *Br J Dermatol*, v. 161, p. 1407–1409, 2009.

JULURI, A; MURTHY, S. N. Transdermal iontophoretic delivery of a liquid lipophilic drug by complexation with an anionic cyclodextrin. *J Control Release*, v.189, p.11-18, 2014.

KALIA, Y. N.; NAIK, A.; GARRISON, J.; GUY, R. H. Iontophoretic drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev*, v. 56, n. 5, p. 619-58, 2004.

KANIKKANNAN, N.; SINGH, J.; RAMARAO, P. Transdermal iontophoretic delivery of bovine insulin and monomeric human insulin analogue. *J Control Rel*, v.59, p.99-105, 1999.

KARAGAS, M. R.; ZENS, M. S.; NELSON, H. H. et al. Measures of cumulative exposure from a standardized sun exposure history questionnaire: a comparison with histologic assessment of solar skin damage. *Am J Epidemiol*, v. 165, p. 719-726, 2007.

KONDA, R. K.; CHALLA, B. R.; CHANDU, B. R.; CHANDRASEKHAR, K. B. Bioanalytical method development and validation of memantine in human plasma by high performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry: application to bioequivalence study. *J Anal Methods Chem*, v. 2012, 8 pages, 2012.

KWASNIAK, L. A.; GARCIA-ZUAZAGA, J. Basal cell carcinoma: evidence-based medicine and review of treatment modalities. *Int J Dermatol*, v. 50, p. 645-658, 2011.

LAWTON, E. A. The thermal stability of cooper phthalocyanine. *Battelle Memorial Inst*, v. 62, p. 384.

LEANDRO, F. Z.; MARTINS, J.; FONTES, A. M.; TEDESCO, A. C. Evaluation of theranostic nanocarriers for near-infrared imaging and photodynamic therapy on human prostate cancer cells. *Colloids Surf B Biointerfaces*, v. 154, n. 1, p. 341-349, 2017.

LEE, D. A.; MILLER, S. J. Nonmelanoma skin cancer. *Facil Plast Surg Clin N Am*, 17, p. 309-324, 2009

LEE, P. K.; KLOSER, A. Current methods for photodynamic therapy in the US: comparison of MAL/PDT and ALA/PDT. *J Drugs Dermatol*, v.12, p.925-30, 2013.

LEE, S. S.; SUL, B. J.; HAN, M. H. Microneedle roller and stamp with replaceable microneedles. WO Patent 2010016645; 2010.

LIEBL, H.; LUTHER, C. K. P. T. Skin cell proliferation stimulated by microneedles. *J Am Coll Clin Wound Spec*, v. 4, n. 1, p. 2-6, 2012.

LOFTSSON, T.; JARHO, P.; MÁSSON, M.; JÄRVINEN, T. Cyclodextrins in drug delivery. *Expert Opin Drug Deliv*, v. 2, n. 2, 2005.

LOFTSSON, T.; MÁSSON, D. H. M. Evaluation of cyclodextrin solubilization of drugs. *Int J Pharm*, v. 302, p. 18-28, 2005.

LONGO, J. P.; LOZZI, S. P.; SIMIONI, A. R.; MORAIS, P. C.; TEDESCO, A. C.; AZEVEDO, R. B. Photodynamic therapy with aluminum-chloro-phthalocyanine induces necrosis and vascular damage in mice tongue tumors. *J Photochem Photobiol B*, v.94, p.143-6, 2009.

LOPEZ, R. F. V.; BENTLEY, M. V. L. B.; DELGADO-CHARRO, M. B.; GUY, R. H. Iontophoretic delivery of 5-aminolevulinic acid (ALA): effect of pH. *Pharm Res*, v. 18, n. 3, p. 311-315, 2001.

LOPEZ, R. F. V.; BENTLEY, M. V. L. B.; DELGADO-CHARRO, M. B.; GUY, R. H. J. Optimization of aminolevulinic acid delivery by iontophoresis. *Control Release*, v. 88, n. 1, p. 65-70, 2003.

LOPEZ, R.F.; LANGE, N.; GUY, R.; BENTLEY, M.V. Photodynamic therapy of skin cancer: controlled drug delivery of 5-ALA and its esters. *Adv Drug Deliv Rev*, v. 56, p.77-94, 2004.

LUCENA, S. R., SALAZAR, N., GRACIA-CAZAÑA, T., ZAMARRÓN, A., GONZÁLEZ, S., JUARRANZ, A., GILABERTE, Y. Combined treatments with photodynamic therapy for non-melanoma skin cancer. *Int J Mol Sci*, v. 16, n. 10, p. 25912-25933, 2015.

MACHADO, A. E. H. Terapia fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e perspectivas. *Quim Nova*, v. 23, n. 2, 2000.

MACKENZIE, R. C. Differential thermal analysis. *New York: Academic Press Fundamental aspects*, v. 1, p. 775, 1970.

MASSAMS, J.; PARKIN, D.M.; DARBY, S. C. The cancer burden in the United Kingdom in 2007 due to radiotherapy. *Int J Cancer*, v.129, p. 2885- 2893, 2011.

MICHALUN, M. V.; MICHALUN, N. Dicionário de ingredientes para cosmética e cuidados da pele. 3ªed, 2011.

MOAN, J.; BERG, K. The photodegradation of porphyrins in cells can be used to estimate the lifetime of singlet oxygen. *Photochem Photobiol*, v. 53, p. 549–553, 1991.

MORTON, C. A. Photodynamic therapy for nonmelanoma skin cancer--and more? *Arch Dermatol*, v. 140, p. 116-120, 2004.

MORTON, C.; SZEIMIES, R. M.; SIDOROFF, A.; WENNBERG, A. M.; BASSET-SEGUIN, N.; CALZAVARA-PINTON, P.; GILABERTE, Y.; HOFBAUER, G.; HUNGER, R.; KARRER, S.; LEHMANN, P.; PIASERICO, S.; ULRICH, C.; BRAATHEN, L. European dermatology forum guidelines on topical photodynamic therapy. *Eur J Dermatol*, v. 25, n. 4, p. 296-311, 2015.

MUEHLMANN, L. A.; MA B. C.; LONGO, J. P.; ALMEIDA SANTOS, M. F.; AZEVEDO, R. B. Aluminum-phthalocyanine chloride associated to poly(methyl vinyl ether-co-maleic anhydride) nanoparticles as a new third-generation photosensitizer for anticancer photodynamic therapy. *Int J Nanomedicine*, v. 9, p. 1199-213, 2014.

MUEHLMANN, L. A.; RODRIGUES, M. C.; LONGO, J. P. F.; GARCIA, M. P.; PY-DANIEL, K. R.; VELOSO, A. B.; SOUZA, P. E. N.; SILVA, S. W.; AZEVEDO, R. B. Aluminium-phthalocyanine chloride nanoemulsions for anticancer photodynamic

therapy: Development and in vitro activity against monolayers and spheroids of human mammary adenocarcinoma MCF-7 cells. *J Nanobiotechnol*, v. 13, p. 36, 2015.

NUNES-FERREIRA, R.; ANGELO, T.; SILVA, S. M. M.; MAGALHAES, P. O.; GRATIERI, T.; CUNHA-FILHO, M. S. S.; GELFUSO, G. M. Versatile chromatographic method for catechin determination in development of topical formulations containing natural extracts. *Biomed Chromatogr*, p. e4062, 2017.

OBAGI, P.E. Anatomia e fisiologia da pele: uma visão pessoal. Rio de Janeiro, *Revinter*, 2004.

OLIVEIRA, K. T.; SOUZA, J. M.; SILVA GOBO, N. R.; ASSIS, F. F.; BROCKSON, T. J. Conceitos fundamentais e aplicações de fotossensibilizadores do tipo porfirinas, clorinas e ftalocianinas em terapias fotônicas. *Rev Virtual Quim*, v. 7, n. 1, p. 310–335, 2015.

OHMAN, H.; VAHLQUIST, A.; The pH gradient over the stratum corneum differs in Xlinked recessive and autosomal dominant ichthyosis: a clue to the molecular origin of the acid skin mantle? *J Investig Dermatol*, v. 7, p. 111-647, 1998.

OZOG, D. M.; RKEIN, A. M.; FABI, S. G.; GOLD, M. H.; GOLDMAN, M. P.; LOWE, N. J.; MARTIN, G. M.; MUNAVALLI, G. S. Photodynamic therapy: a clinical consensus guide. *Dermatol Surg*, v.42, p. 804-827, 2016.

PATEL, R.V.; FRANKEL, A.; GOLDENBERG, G. An update on nonmelanoma skin cancer. *J Clin Aesthet Dermatol*, v. 4, p. 20–27, 2011.

PEREIRA, M. M. F. I. Estudo *in vitro* do impacto biológico de diferentes materiais de penso sobre a integridade cutânea. III Curso de Mestrado em Farmácia Hospitalar. Universidade de Lisboa, 2009.

PEREIRA, M. N.; SCHULTE, H. L.; DUARTE, N.; LIMA, E. M.; SÁ-BARRETO, L. L.; GRATIERI, T.; GELFUSO, G. M.; CUNHA-FILHO, M. S. S. Solid effervescent formulations as new approach for topical minoxidil delivery. *Eur J Pharm Sci*, v. 96, p. 411-419, 2017.

PERETTI, S. C.; MOREIRA, M. A. L.; BARRETO, G. R.; PEDRIALI, C. Resveratrol para cosméticos no clareamento da pele. *InterfacEHS – Saúde, Meio Ambiente e Sustentabilidade*, v. 10, n. 1, 2015.

PINHO, L. A. G.; SÁ-BARRETO, L. C. L.; INFANTE, C. M. C.; CUNHA-FILHO, M. S. S. Simultaneous determination of benzimidazole and itraconazole using spectrophotometry applied to the analysis of mixture: a tool for quality control in the development of formulations. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, v. 159, p. 48–52, 2016.

PITHA, J.; MILECKI, J.; FALES, H.; PANNELL, L.; UEKAMA, K. Hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin: preparation and characterization; effects on solubility of drugs. *Int J Pharm*, v. 29, p. 73-82, 1986.

PLAETZER, K.; KRAMMER, B.; BERLANDA, J.; BERR, F.; KIESSLICH, T. Photophysics and photochemistry of photodynamic therapy: fundamental aspects. *Lasers Med Sci*, v. 24, p. 259–268, 2009.

PONTEN, J. Precancer: biology, importance and possible prevention. *Cancer Surv*, v. 32, p. 1-3, 1998.

POULIQUEN, G.; AMIEL, C.; TRIBET, C. Photoresponsive viscosity and host-guest association in aqueous mixtures of poly-cyclodextrin with azobenzene-modified poly(acrylic)acid. *J Phys Chem B*, v. 111, p. 5587-5595, 2007.

PY-DANIEL, K. R.; NAMBAN, J. S.; ANDRADE, L. R.; SOUZA, P. E. N.; PATERNO, L. G.; AZEVEDO, R. B.; SOLER, M. A. G. Highly efficient photodynamic therapy colloidal system based on chloroaluminum phthalocyanine/pluronic Micelles. *Eur J Pharm Biopharm*, v. 103, p. 23-31, 2016.

QUINTÃO, W. S. C.; MATOS, B. N.; REIS, T. A.; SÁ-BARRETO, L. C.; GRATIERI, T.; GELFUSO, G. M. Influence of monoolein on progesterone transdermal delivery. *Braz J Pharm Sci*, v. 51, n. 4, 2015.

RAMIREZ, D. P.; KURACHI, C.; INADA, N. M.; MORIYAMA, L. T.; SALVIO, A. G.; FILHO, J. D. V.; PIRES, L.; BUZZÁ, H. H.; ANDRADE, C. T.; GRECO, C.; BAGNATO, V. S. Experience and BCC subtypes as determinants of MAL-PDT response: Preliminary results of a national Brazilian Project. *Photodiagnosis Photodyn Ther*, v. 11, p. 22–26, 2014.

REIS, T. A.; BARRETO, L. C. L. S.; CUNHA-FILHO, M. S. S.; GRATIERI, T.; GELFUSO, G. M. Microagulhas: estado da arte e aplicações médicas. *Brasília Med*, v. 51, n. 2, p. 159-168, 2014.

RIBEIRO, A. P. D.; ANDRADE, M. C.; BAGNATO, V. S.; VERGANI, C. E.; PRIMO, F. L.; TEDESCO, A. C.; PAVARINA, A. C. Antimicrobial photodynamic therapy against pathogenic bacterial suspensions and biofilms using chloro-aluminum phthalocyanine encapsulated in nanoemulsions. *Lasers Med Sci*, v. 30, n. 2, p. 549-559, 2013.

ROBERTS, D. J. H.; CAIRNDUFF, F. Photodynamic therapy of primary skin cancer: a review. *Br J Plast Surg*, v.48, p.360-370, 1995.

ROCHA, M. S.; LUCCI, C. M.; LONGO, J. P.; GALERA, P. D.; SIMIONI, A. R.; LACAVA, Z. G.; TEDESCO, A. C.; AZEVEDO, R. B. Aluminum-chloride-phthalocyanine encapsulated in liposomes: activity against naturally occurring dog breast cancer cells. *J Biomed Nanotechnol*, v.8, p.251-7, 2012.

RODRIGUES, L. B.; MARTINS, A. O. B. P. B.; RIBEIRO-FILHO, J.; CESÁRIO, F. R. A. S.; CASTRO, F. F.; ALBUQUERQUE, T. R.; FERNANDES, M. N. M.; SILVA, B. A. F.; JÚNIOR, L. J. Q.; ARAÚJO, A. A. S.; MENEZES, P. P.; NUNES, P. S.; MATOS, I. G.; COUTINHO, H. D. M.; WANDERLEY, A. G.; MENEZES, I. R. A. Anti-inflammatory activity of the essential oil obtained from *Ocimum basilicum* complexed with  $\beta$ -cyclodextrin ( $\beta$ -CD) in mice. *Food Chem Toxicol*, 2017.

ROWE, D. E.; CARROLL, R. J.; DAY, C. L. Jr. Long-term recurrence rates in previously untreated (primary) basal cell carcinoma: implications for patient follow-up. *J Dermatol Surg Oncol*, v. 15, p. 315–328, 1989.

RUBIN, A. I.; CHEN, E. H.; RATNER, D. Basal cell carcinoma. *N Engl J Med*, v. 353, p. 2262–2269, 2005.

SEKIYA, S.; KUBOTA, K.; KASAI, T.; IWASAKI, H.; YAMAUCHI, K.; TAKAMISAWA, H.; TENJIN, Y. Cytocidal effects of hematoporphyrin derivate and argon dye laser on human gynecologic tumor cell in vitro. *Int J Gynecol Obstet*, v.26, p.151-158, 1988.

SINHA, V. R.; ANITHA, R.; GHOSH, S.; NANDA, A.; KUMRIA, R. Complexation of celecoxib with b-cyclodextrin: characterization of the interaction in solution and in solid state. *J Pharm Sci*, v. 94, n. 3, p. 676-686, 2005.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DERMATOLOGIA – SBD. Disponível em <http://www.sbd.org.br/>. Acessado em fev. 2018.

SOUZA, J. G.; GELFUSO, G. M.; SIMÃO, P. S.; BORGES, A. C.; LOPEZ, R. F. Iontophoretic transport of zinc phthalocyanine tetrasulfonic acid as a tool to improve drug topical delivery. *Anticancer Drugs*, v. 22, p. 783-93, 2011.

SILVA, A. R.; SIMIONI, A. R.; TEDESCO, A. C. Photophysical and complexation studies of chloro-aluminum phthalocyanine with beta-cyclodextrin and hydroxypropyl-beta-cyclodextrin. *J Nanosci Nanotechnol*, v. 11, p. 4046-55, 2011.

SZEJTLI J. Cyclodextrin in drug formulations: Part I. *Pharm Technol Int*, v. 3, p. 15-23, 1991.

TAPAJÓS, E. C.; LONGO, J. P.; SIMIONI, A. R.; LACAVA, Z. G.; SANTOS, M. F.; MORAIS, P. C.; TEDESCO, A. C.; AZEVEDO, R. B. In vitro photodynamic therapy on human oral keratinocytes using chloroaluminum-phthalocyanine. *Oral Oncol*, v.44, p.1073-1079, 2008

THISSEN, M. R.; NEUMANN, M. H.; SCHOUTEN, L. J. A systematic review of treatment modalities for primary basal cell carcinomas. *Arch Dermatol*, v. 135, p. 1177–1183, 1999.

TOLBIN, A. Y.; PUSHKAREV, V. E.; BALASHOVA, I. O.; DZUBAN, A. V.; TARAKANOV, P. A.; TRASHIN, S. A.; TOMILOVA, L. G.; ZEFIROVA, N. S. A highly stable double-coordinated 2-hydroxy-tri(tert-butyl)-substituted zinc phthalocyanine dimer: synthesis, spectral study, thermal stability and electrochemical properties. *New J Chem*, v. 38, p. 5825-5831, 2014.

TURNER, N. G.; GUY, R. H. Iontophoretic Transport pathways: dependence on penetrant physicochemical properties. *J Pharm Sci*, v.86, n.12, 1997.

US Food and Drug Administration, Guidance for industry – Bioanalytical method validation, US Department of Health and Human Services, Centre for Drug

Evaluation and Research, 2001.

VILSINSKI, B. H.; GEROLA, A. P.; JUNIOR, A. E.; CAMPANHOLI, K. S.; PEREIRA, P. C. S.; BRAGA, G.; HIOKA, N.; KIMURA, E.; TESSARO, A. L.; CAETANO, W. Formulation of aluminum chloride phthalocyanine in pluronic<sup>tm</sup> p123 and f-127 block copolymer micelles: photophysical properties and photodynamic inactivation of microorganisms. *Photochem Photobiol*, v. 91, n. 3, p. 518–525, 2015.

WESTERS-ATTEMA, A.; LOHMAN, B. G.; VAN DEN HEIJKANT, F.; NELEMANS, P. J.; WINNENPENNINCKX, V. J.; KELLENNERS-SMEETS, N. W.; MOSTERD, K. Photodynamic therapy in Bowen's disease: influence of histological features and clinical characteristics on its success. *Dermatol*, v. 230, p. 55-61, 2015.

WIEGELL, S. R.; WULF, H. C.; SZEIMIES, R. M.; BASSET-SEGUIN, N.; BISSONNETTE, R.; GERRITSEN, M. J. P.; GILABERTE, Y.; CALZAVARA-PINTON, P.; MORTON, C. A.; SIDOROFF, A.; BRAATHEN, L. R. Daylight photodynamic therapy for actinic keratosis: an international consensus. International Society for Photodynamic Therapy in Dermatology. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, v. 26, p. 673–679, 2012.

YOSHIDA, N. H.; ROBERTS, M. S. Structure-transport relationships in transdermal iontophoresis. *Adv Drug Del Rev*, v. 9, p. 239–264, 1992.

ZHANG, J.; MA, P. X. Cyclodextrin-based supramolecular systems for drug delivery: Recent progress and future perspective. *Adv Drug Del Rev*, v. 65, p. 1215-33, 2013.

## 9. Anexos

### 9.1. Comitê de ética

O projeto intitulado “Iontoforese de complexos de inclusão de cloreto de alumínio ftalocianina (CIAIFc) para a terapia fotodinâmica tópica de tumores cutâneos”, sob Protocolo n.º 66735/2016, foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA), com validade até 01/03/2020.

O projeto *in vivo* dá continuidade ao trabalho apresentado e tem como objetivo avaliar os benefícios da iontoforese combinada com TFD tópica para promover a permeação de CIAIFc permitindo acúmulo de mais agente fotossensibilizante no tecido tumoral e, conseqüentemente, melhora da terapia quando comparada à permeação passiva.

### 9.2. Artigos publicados

#### 9.2.1 CIAIFc

O trabalho apresentado já possui publicação científica com o artigo:

**REIS, T. A.;** JACULI, A. E. L.; ALVES, R. C.; GRATIERI, T.; AZEVEDO, R. B.; JOANITTI, G. A.; GELFUSO, G. M.; CUNHA-FILHO, M. S. S. Simple and selective HPLC-UV/Vis bioanalytical method to determine aluminum phthalocyanine chloride in skin permeation studies. *J Anal Methods Chem*, v. 2018, p. 1-7 2018.

No ano de 2014, foi publicada uma revisão sobre microagulhas também norteadora para esta tese:

**REIS, T. A.;** BARRETO, L. C. L. S.; CUNHA-FILHO, M. S. S.; GRATIERI, T.; GELFUSO, G. M. Microagulhas: estado da arte e aplicações médicas. *Brasília Med*, v. 51, n. 2, p. 159-168, 2014.

### 9.2.2 Oxaliplatina

No início do período de Doutorado (1/2014 a 1/2016) foram realizados experimentos relacionados ao projeto intitulado “*Desenvolvimento de formulação para aplicação da iontoforese na liberação de oxaliplatina para a quimioterapia tópica de tumores da cavidade oral*”, que originaram duas publicações científicas:

MATOS, B. N.; OLIVEIRA, P. M.; **REIS, T. A.**; GRATIERI, T.; CUNHA-FILHO, M. S. S.; GELFUSO, G. M. Development and validation of a simple and selective analytical hplc method for the quantification of oxaliplatin. *J Chem*, v. 2015, p. 1-6, 2015.

**REIS, T. A.**; MATOS, B. N.; LIMA, E. M.; CHAKER, J. A.; GRATIERI, T.; CUNHA-FILHO, M. S. S.; GELFUSO, G. M. Oxaliplatin preformulation studies for the development of innovative topical drug delivery systems. *J Therm Anal Calorim*, v. 130, p. 1671-1681, 2017.