



UEPB

UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

KAREN LORAINÉ MACENA SANTOS

**CARREADORES LIPÍDICOS NANOESTRUTURADOS PARA INCORPORAÇÃO
DE FTALOCIANINA E UTILIZAÇÃO NA TERAPIA FOTODINÂMICA**

CAMPINA GRANDE

2020

KAREN LORAINÉ MACENA SANTOS

**CARREADORES LIPÍDICOS NANOESTRUTURADOS PARA INCORPORAÇÃO
DE FTALOCIANINA E UTILIZAÇÃO NA TERAPIA FOTODINÂMICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual da Paraíba, como requisito para obtenção do título de mestre

Orientador:
Prof. Dr. João Augusto Oshiro Junior

**CAMPINA GRANDE
2020**

É expressamente proibido a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano do trabalho.

S237c Santos, Karen Loraine Macena.
Carreadores lipídicos nanoestruturados para incorporação de ftalocianina e utilização na terapia fotodinâmica [manuscrito] / Karen Loraine Macena Santos. - 2020.
68 p. : il. colorido.
Digitado.
Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde , 2020.
"Orientação : Prof. Dr. João Augusto Oshiro Junior , Departamento de Farmácia - CCBS."
1. Nanopartículas lipídicas. 2. Nanotecnologia farmacêutica. 3. Terapia fotodinâmica. 4. Fotossensibilizadores. I. Título

21. ed. CDD 615.1

KAREN LORAINÉ MACENA SANTOS

**CARREADORES LIPÍDICOS NANOESTRUTURADOS PARA INCORPORAÇÃO
DE FTALOCIANINA E UTILIZAÇÃO NA TERAPIA FOTODINÂMICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual da Paraíba, como requisito para obtenção do título de mestre

Aprovada em: 28/09/2020.

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. João Augusto Oshiro Junior (Orientador)
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)



Prof. Dra. Mariana Rillo Sato
Universidade Estadual Paulista (UNESP)



Profa. Dra. Ana Cláudia Dantas de Medeiros
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelas oportunidades de aprender e compartilhar tantas experiências boas nessa vida. A Nossa Senhora e a Santo Expedito pela proteção e força, ajudando-me a erguer a cabeça e seguir em frente mesmo nos momentos mais difíceis

Aos meus amados pais Rosildo e Mônica, minha inspiração, meus exemplos de companheirismo, união e amor, que ensinaram a mim e a minha irmã os significados das palavras valor, educação, respeito e fé.

A minha irmã Emily, pelas várias brigas durante a infância, mas a admiração de você pelas minhas conquistas me faz lembrar o quanto é importante comemorar cada vitória, mesmo as menores e mais simples.

A minha querida avó Augusta (*in memoriam*) por sempre despertar em mim uma grande felicidade, e por todo o apoio e ensinamentos durante minha vida.

Ao meu tio Rosalvo, que sempre me apoiou e torceu pela minha felicidade, e pela a colaboração durante esses anos.

Ao meu orientador Prof. João Augusto Oshiro Junior, pela orientação dedicada, que muito contribuiu para realização e conclusão desse estudo e para o meu crescimento pessoal e profissional, fazendo-me compreender cada etapa com mais maturidade.

Aos meus colegas de laboratório: Rafaela Moreno, Demis Mello e Diego Paulo, pela amizade e contribuição no decorrer do último ano. As lembranças dessa etapa serão inesquecíveis.

Ao laboratório de desenvolvimento e caracterização de produtos farmacêuticos (LDCPF) da UEPB, pela infraestrutura disponibilizada em todos esses anos e pela minha formação. Sinto-me orgulhosa por fazer parte deste laboratório.

Ao laboratório de farmácia da University of Ulster, ao departamento de Farmacotécnica e Físico-química do Instituto de Química da UNESP, pelo suporte, disponibilidade e acessibilidade na realização da análise.

A UEPB, pela incrível oportunidade proporcionada e por todo conhecimento que pude adquirir neste período

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências farmacêuticas que contribuíram para a minha formação.

A Capes e CNPq pelo fomento e respaldo técnico-financeiro dessa pesquisa.

A todos, o meu muito obrigada!

RESUMO

A terapia fotodinâmica (TFD) é uma modalidade terapêutica promissora, minimamente invasiva que apresenta baixa toxicidade em sistema biológico. A TFD, baseia-se na aplicação local ou sistêmica de um fotossensibilizador (FS), que se acumula nos tecidos patológicos. As moléculas do FS absorvem luz a partir de um comprimento de onda apropriado, iniciando processos de reações fotoquímicas que resultam na formação de oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) e espécies reativas de oxigênio (EROs). Atualmente, existem diversos FSs, entre eles, temos a Ftalocianina (FC), um FS de segunda geração. Porém, uma das suas limitações está relacionada a sua natureza hidrofóbica, podendo induzir agregação em sistemas biológicos com redução da sua atividade fotodinâmica. A incorporação da FC em carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) pode ser uma alternativa promissora para superar este problema. Assim, o objetivo deste trabalho foi desenvolver e caracterizar CLN carregados com FC para posterior aplicação em terapia fotodinâmica. Para o desenvolvimento das formulações a técnica de fusão-emulsificação seguida de sonicação, foi aplicada. Os CLN e CLN-FC foram caracterizados quanto ao diâmetro médio (D.mn), índice de polidispersão (PdI), potencial zeta (Pz), eficiência de encapsulação (%EE), microscopia eletrônica de transmissão (MET), calorimetria exploratória diferencial (DSC), photobleaching e geração de oxigênio singlete em sistemas de célula (SOSG). Além disso, foi realizado ensaios de liberação *in vitro* pelo método do béquer, utilizando membranas de diálise. O tamanho médio das formulações de CLN e CLN-FC foram inferiores a 200 nm, PdI < 0,3 e Pz entre $-15,3 \pm 0,18$ a $-12,2 \pm 0,7$ e $-17,8 \pm 0,54$ a $-19,9 \pm 0,5$, e estáveis durante o tempo de armazenamento (90 dias). A microscopia eletrônica de transmissão mostrou partículas esféricas, sem aglomerados coerentes aos resultados de diâmetro médio e PdI, o CLN-FC promoveu o encapsulamento de $75,57 \% \pm 0,58$. A análise mediante DSC confirmaram que não havia incompatibilidade entre FC e CLN. A análise do perfil de *photobleaching* demonstrou ser foto-estável após o encapsulamento de CLN-FC. O estudo de intensidade de fluorescência de SOSG demonstrou produção de $^1\text{O}_2$ das formulações após irradiação e isso corroborou com os dados obtidos por *photobleaching*. O estudo de liberação *in vitro* apresentou-se uma liberação prolongada durante 160 h. As formulações apresentaram um perfil de liberação com cinética que segue o modelo matemático de Weibull e ordem zero. Os resultados deste trabalho confirmaram que os sistemas nanoestruturados produzidos são estáveis e promissores, podendo ser uma alternativa nanotecnológica para o desenvolvimento de novas formas farmacêuticas destinadas a terapia fotodinâmica.

Palavras-chave: Sistemas de liberação nanoestruturados. Nanotecnologia Farmacêutica. Terapias alternativas. Fotossensibilizadores.

ABSTRACT

Photodynamic therapy (PDT) is a promising, minimally invasive therapeutic modality that has low toxicity in the biological system. PDT is based on the local or systemic application of a photosensitizer (PS), which accumulates in pathological tissues. The FS molecules absorb light from an appropriate wavelength, initiating photochemical reaction processes that result in the formation of singlet oxygen ($^1\text{O}_2$) and reactive oxygen species (ROS). Currently, there are several PSs, among them, we have Phthalocyanine (PC), a second generation FS. However, one of its limitations is related to its hydrophobic nature, which can induce aggregation in biological systems with reduced photodynamic activity. The incorporation of PC in nanostructured lipid carriers (NLC) can be a promising alternative to overcome this problem. Thus, the objective of this work was to develop and characterize PC-loaded NLCs for later application in photodynamic therapy. For the development of the formulations, the fusion-emulsification technique followed by sonication was applied. The NLC and NLC-PC were characterized in terms of mean diameter (D.mn), polydispersion index (PdI), zeta potential (Pz), encapsulation efficiency (% EE), transmission electron microscopy (TEM), differential scanning calorimetry (DSC), photobleaching and singlet oxygen generation in cell systems (SOSG). In addition, *in vitro* release tests were performed using the beaker method, using dialysis membranes. The average size of the NLC and NLC-PC formulations were less than 200 nm, PdI <0.3 and Pz between -15.3 ± 0.18 to -12.2 ± 0.7 and -17.8 ± 0.54 to -19.9 ± 0.5 , and stable during the storage period (90 days). Transmission electron microscopy showed spherical particles, without clusters consistent with the results of mean diameter and PdI, the NLC-PC promoted the encapsulation of $75.57\% \pm 0.58$. DSC analysis confirmed that there was no incompatibility between PC and NLC. The analysis of the photobleaching profile proved to be photo-stable after encapsulation of NLC-PC. The study of SOSG fluorescence intensity showed production of $^1\text{O}_2$ of the formulations after irradiation and this corroborated with the data obtained by photobleaching. The *in vitro* release study showed an extended release for 160 h. The formulations presented a release profile with kinetics that follows Weibull's mathematical model and zero order. The results of this work confirmed that the produced nanostructured systems are stable and promising, and could be a nanotechnological alternative for the development of new pharmaceutical forms for photodynamic therapy.

Keywords: Nanostructured release systems. Pharmaceutical nanotechnology. Alternative therapies. Photosensitize.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Φ_{Δ}	Rendimento quântico de oxigênio singlete
λ	Comprimento de onda
CLN	Carreador Lipídico Nanoestruturado
CLN-FC	Carreador Lipídico Nanoestruturado com Ftalocianina
DLS	<i>Dynamic Light Scattering</i>
DSC	Calorimetria exploratória diferencial
%EE	Eficiência de encapsulação
EP (40)	Estearato de polioxietileno 40
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FC	Ftalocianina
FS	Fotossensibilizador
H ₂ O ₂	Peroxido de hidrogênio
LED	Diodo emissor de luz
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
mW	Miliwatt
mL	Militros
nm	Nanômetro
NLs	Nanopartículas lipídicas
NLS	Nanopartículas Lipídicas Sólida
$\cdot\text{OH}$	Hidroxila
$\cdot\text{O}_2^-$	Superóxido
O ₂	Oxigênio
³ O ₂	Oxigênio molecular triplete
OR	Óleo de rícino
PF-127	Pluronic F-127
PdI	Índice de Polidispersão
Pz	Potencial Zeta
RDC	Resolução Diretoria Colegiada
S ₀	Estado singete fundamental
S ₁	Estado singlete excitado
SOSG	Geração de oxigênio singlete em sistema livres de células
T ₁	Estado Tripleto excitado
TFD	Terapia fotodinâmica
TGACC	Triglicérides de ácido cáprico/caprilico
μL	Microlitros
μM	Micromolar
Zn PcF ₁₆	Hexadecaflúor zinco ftalocianina

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1- Representação do diagrama de Jablonski- Ilustra os processos eletrônicos que uma molécula pode sofrer ao absorver energia. S_0 : estado singlete excitado; S_n : estado singlete excitado; T_1 : estado triplete excitado; Esquema de transferência de elétrons pelos mecanismos tipo I e tipo II com produção de oxigênio singlete, ânions superóxidos e hidroxilas.	15
Figura 2- Estrutura química da Ftalocianina.	19
Figura 3- Estrutura química acomodando o íon metálico de hexadecaflúor zinco ftalocianina ($ZnPcF16$).	20
Figura 4- Principais sistemas nanoestruturados.	21
Figura 5- Matriz lipídica da NLS (esquerda) e CLN (Direita).	22
Figura 6- Esquematização estrutural dos carreadores lipídicos nanoestruturados: A) CLN imperfeito, B) CLN amorfo, C) CLN múltiplo.	25
Figura 7- Representação gráfica do processo de sonicação.	26
Figura 8- Prováveis mecanismos de interação dos sistemas nanoestruturados com a pele: (A) interação dos sistemas nanoestruturados com o EC; (B) acúmulo dos sistemas nanoestruturados nas glândulas/ imperfeições da pele e (C) acúmulo dos sistemas nanoestruturados em folículos pilosos.	27
Figura 9- Representação esquemática da produção dos CLNs pelo método de fusão-emulsificação seguido por sonicação.	31
Figura 10- Representação esquemática do experimento do perfil de liberação in vitro da FC a partir de CLN.	35
Figura 11- Características macroscópicas dos CLN (a) e CLN-FC (b).	38
Figura 12- Média e desvio padrão do diâmetro médio (nm), índice de polidispersidade e potencial zeta dos CLNs puros e carregados com FC no período de 90 dias.	38
Figura 13- Fotomicroscopia dos sistemas nanoestruturados, (a) CLN) e (b) CLN-FC, aumento 50.000x, 370.000x, respectivamente. A seta indica um contraste escuro do CLN provavelmente referente a FC nanoencapsulado.	43
Figura 14- Curva calorimétricas das amostras.	45
Figura 15- Porcentagem de FC e CLN-FC por vários intervalos de tempo de irradiação (0,1,2,3,4,5,6,7,8,9 e 10 minutos).	46
Figura 16- Aumento da porcentagem de intensidade de fluorescência de SOSG para as amostras dos seguintes grupos: (I) FC livre, (II) FC livre + luz, (III) CLN-FC e (IV) CLN-FC +luz.	48

Figura 17- Representação gráfica da curva analítica da FC na faixa de concentração de 0,25 a 2,0 µg/mL; n= 3.....	49
Figura 18- Perfil de liberação in vitro de FC e CLN-FC.....	50

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1- Fotossensibilizadores disponíveis para uso clínico.	18
Tabela 2- Exemplos de lipídeos líquidos, sólidos e tensoativos utilizados no desenvolvimento de carreadores lipídicos nanoestruturados.	24
Tabela 3- Resultado da eficiência de encapsulação (%EE) do CLN.	41
Tabela 4- Temperatura de pico (T_{pico}) e variação de entalpia (ΔH) dos eventos de fusão das amostras.	44
Tabela 5- Análise de cinética de liberação de FC incorporados em CLN por diferentes modelos de liberação in vitro, em termos de coeficiente de regressão linear (R^2).	51

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	14
2.1	Terapia fotodinâmica (TFD)	14
2.2	Fotossensibilizadores (FS)	17
2.3	Ftalocianinas (FC)	19
2.4	Nanotecnologia farmacêutica	20
2.5	Nanopartículas Lipídicas (NLs)	22
3	OBJETIVO GERAL	29
4	MATERIAL E MÉTODOS	30
4.1	Material	30
4.1.1	Matérias Primas	30
4.1.2	Equipamentos	30
4.2	Métodos	30
4.2.1	Preparação dos carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN)	30
<i>4.2.1.1</i>	<i>Incorporação da FC no CLN</i>	31
<i>4.2.1.2</i>	<i>Eficiência de encapsulação (%EE)</i>	32
4.2.2	Caracterização físico-química dos CLN com e sem FC	32
<i>4.2.2.1</i>	<i>Determinação do tamanho médio (D.mn), índice de polidispersidade (PDI) e do potencial zeta (Pz)</i>	32
<i>4.2.2.2</i>	<i>Microscopia eletrônica de transmissão (MET)</i>	33
<i>4.2.2.3</i>	<i>Calorimetria exploratória diferencial (DSC)</i>	33
<i>4.2.2.4</i>	<i>Estudo de fotodegradação (photobleaching) por tempo de irradiação</i>	33
<i>4.2.2.5</i>	<i>Geração de oxigênio singlete em sistemas de célula (SOSG)</i>	34
<i>4.2.2.6</i>	<i>Linearidade</i>	34
<i>4.2.2.7</i>	<i>Ensaios de liberação da formulação in vitro</i>	34
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	37
5.1	Preparação dos carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) e incorporação de ftalocianina (FC)	37
5.2	Determinação do diâmetro hidrodinâmico médio das partículas (D.mn), índice de polidispersidade (PDI) e do potencial zeta (Pz)	38
5.3	Eficiência de Encapsulação %EE	41
5.4	Microscopia eletrônica de transmissão (MET)	42

5.5	Calorimetria exploratória diferencial	43
5.6	Estudo de fotodegradação (<i>Photobleaching</i>)	45
5.7	Geração de oxigênio singlete em sistemas livres de célula (SOSG).....	47
5.8	Linearidade.....	49
5.9	Liberação <i>in vitro</i>	49
6	CONCLUSÕES	53
7	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	54
	REFERÊNCIAS	55

1 INTRODUÇÃO

A Terapia fotodinâmica (TFD) é uma estratégia de tratamento médico alternativo, promissora e minimamente invasiva, que apresenta baixa toxicidade em sistema biológico. Esta terapia vem sendo amplamente explorada na área clínica para tratamento de câncer (CALORI; TEDESCO, 2019; DUCHI et al., 2016; VOLOBOUEVA et al., 2013), como lesões cutâneas pré-cancerosas (COHEN; LEE, 2016; ZHANG et al., 2019), degeneração muscular de retina relacionada a idade (KIM; MOON; YU, 2018; PARMEGGIANI et al., 2019; YU et al., 2018), doenças parasitárias (NESI-REIS et al., 2018; PINTO; SOARES; MITTMANN, 2011), infecções por microrganismos (HU et al., 2018; MANTAREVA et al., 2016; OSIFEKO; NYOKONG, 2014; RIBEIRO et al., 2015), e acne vulgar (HONGCHARU et al., 2000; WIEGELL; WULF, 2006).

A TFD envolve a utilização de substâncias fotossensíveis (fotossensibilizadores-FS) não tóxicas, que são submetidas a irradiação de luz visível e na presença de oxigênio, produzem espécies reativas de oxigênio (EROs) que levam a danos celulares (DE PAULA et al., 2013).

Para uso clínico, após a administração tópica ou sistêmica de um FS, o paciente é irradiado com luz a partir de um comprimento de onda específico na área a ser tratada, posteriormente, o paciente é mantido em um local escuro para minimizar a probabilidade de ativação do FS em outras regiões do corpo. Após, o tratamento com a liberação do FS no organismo, o paciente poderá retomar as suas atividades usuais com exposição à luz solar e artificial (LI et al., 2018; ROGUIN et al., 2019).

Diversos tipos de FS têm sido propostos em estudos laboratoriais, dentre eles podemos destacar a classe das ftalocianinas (FC), chamados de compostos de segunda geração. As FC apresentam pigmentos tetraazoindólicos análogos às porfirinas, cuja estrutura molecular pode ser modificada inserindo-se ligantes periféricos e/ou axiais, bem como metais entre nitrogênio centrais. Atualmente são os mais utilizados devido à forte absorção na região do vermelho do espectro eletromagnético (670-780 nm) (GOTO; SIQUEIRA-MOURA; TEDESCO, 2017; WILLIAMS et al., 2011).

No entanto, as FC possuem baixa solubilidade em meio fisiológico tornando sua administração direta inviável, pois, em meio aquoso, as moléculas hidrofóbicas tendem a formar agregados por associação intermolecular (RICCI-JÚNIOR et al., 2011). A agregação das moléculas de FC implica diretamente nas suas propriedades fotoquímicas, diminuindo seu rendimento quântico de fluorescência, e afetando, conseqüentemente sua eficácia

fotossensibilizante (GOTO; SIQUEIRA-MOURA; TEDESCO, 2017; SORIA-LOZANO et al., 2015).

Deste modo, a entrega da FC hidrofóbico é consideravelmente bastante desafiadora (TRIGO-GUTIERREZ et al., 2018). Contudo, uma estratégia promissora para contornar essa desvantagem é a incorporação da FC em sistemas de liberação de insumo farmacêutico ativo. Desse modo, os avanços da nanotecnologia farmacêutica resultam na evolução de desenvolvimento de novos sistemas nanoestruturados, como por exemplo as nanopartículas lipídicas (NLs) (WU et al., 2015).

As NLs tem sido amplamente estudadas como sistemas de liberação de insumo farmacêutico ativo, pois, demonstram algumas vantagens, dentre elas, alta solubilidade no plasma, facilita a administração do medicamento, diminui possíveis efeitos tóxicos (redução da toxicidade local e sistêmica) e aumenta a atividade terapêutica (BAHARI; HAMISHEHKAR, 2016) Atualmente, esses sistemas são divididos em dois grupos: nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) e carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) (YOON; PARK; YOON, 2013).

Em particular, os CLN foram desenvolvidos recentemente como segunda geração de NLs, a fim de superar algumas desvantagens relacionadas às NLS (FANG; A. AL-SUWAYEH; FANG, 2012). Diferentemente da NLS, que são produzidos apenas por lipídios sólidos, os CLN são obtidos através da mistura de lipídios sólidos e lipídios líquidos (óleos) em temperatura ambiente, utilizando diferentes proporções de porcentagem variáveis de lipídios líquidos em sua composição, na qual, forma estrutura matricial imperfeita, o que resulta no aumento dos espaços para acomodar o insumo farmacêutico ativo, possibilitando a eficiência de encapsulação do insumo farmacêutico ativo, como o caso da FC (BELOQUI et al., 2017; HAIDER et al., 2020; POONIA et al., 2016; SHARMA; BALDI, 2018). Esse sistema se destaca por possuir vantagens em relação as NLS, no que se refere a capacidade de carreamento de substâncias ativas, maior estabilidade física e longa termoestabilidade (ALMEIDA et al., 2012, 2018).

Desta maneira, em nosso estudo, mostraremos que os carreadores lipídicos nanoestruturados incorporados em FC podem promover efeito fotodinâmico para administração de uso tópico. Além disso, o tratamento também é minimamente invasivo, com baixa toxicidade para o paciente. Portanto, essa pesquisa sugere fortemente que esta nanotecnologia pode potencialmente ser desenvolvida e usada no futuro como agente terapêutico para a prevenção e tratamento de diferentes patologias no âmbito clínico.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

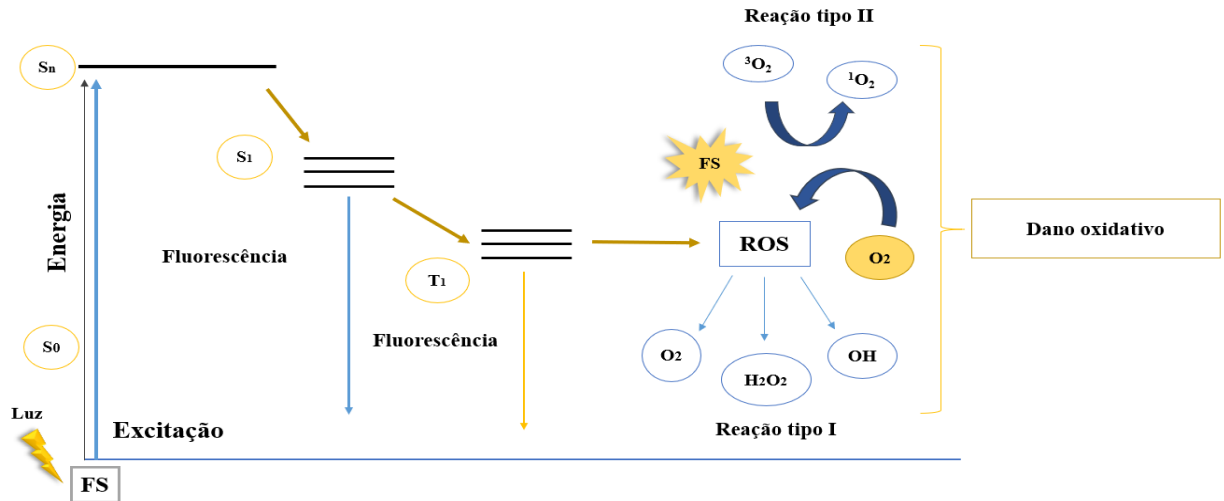
2.1 Terapia fotodinâmica (TFD)

A “Terapia Fotodinâmica” (TFD) foi relatada pela primeira vez no final do século XIX pelo o estudante de medicina Oscar Raab e seu orientador Herman von Tappeiner, Estes pesquisadores observaram a inativação de microrganismo do gênero *Paramecium* através do corante de acridina e luz visível. Em seguida, Von Tappeiner e Jodlbaue, deu continuidade aos estudos e observou a presença de oxigênio durante a reação ocorrida entre a luz e o corante, na qual nomeou este fenômeno como “ação fotodinâmica” (KESSEL, 2019).

Posteriormente em 1924, Policard estudou e mencionou a utilização de porfirinas combinadas com o auxílio de uma lâmpada de Wood na aplicação de tumores malignos. Logo após em 1942, Auler e Benzer, conduziram uma longa série de experimentos, e demonstram a redução tumoral após a associação de porfirina e luz. A partir da década de 70, os estudos se voltaram para a utilização da TFD para bactérias e fungos (CIEPLIK et al., 2018; KESSEL, 2019).

Diante disto, a TFD é uma forma de tratamento que envolve a administração de um fármaco fotossensibilizante ou fotossensibilizador (FS), além de uma fonte de luz específica (oriunda de LED ou Laser) e moléculas de oxigênio, conforme ilustrado na Figura 1. Na primeira fase, ocorre a transferência de fótons de luz para o FS, cuja as moléculas do FS passa de seu estado fundamental (S_0) para o primeiro estado singlete excitado (S_n) (ALLEN; SHARMAN; VAN LIER, 2001; VALLI et al., 2020). O estado singlete excitado do FS é bastante instável, com um tempo de vida curto, na ordem de nanosegundos, este processo pode retornar ao seu estado fundamental a partir da emissão de fóton por meio de energia luminosa, emissão de fluorescência, ou através da conversão interna com perda de calor. No entanto, o FS pode sofrer cruzamento intersistema, devido ao acoplamento do *spin* de um elétron, passando do estado singlete excitado (S_1^*) para o estado triplete excitado (T_1^*) (LI et al., 2019). O FS no estado triplete excitado (T_1^*) é mais estável, com tempo de vida mais longo (10^{-6} a 10^{-3}), além disso, pode retornar ao seu estado fundamental, mediante a reação do FS com oxigênio molecular do meio (3O_2). Existem dois tipos de reação descritos na literatura que justifica este efeito, descrito como reação Tipo I e Tipo II. (REZUSTA et al., 2012).

Figura 1- Representação do diagrama de Jablonski- Ilustra os processos eletrônicos que uma molécula pode sofrer ao absorver energia. S_0 : estado singlete excitado; S_n : estado singlete excitado; T_1 : estado triplete excitado; Esquema de transferência de elétrons pelos mecanismos tipo I e tipo II com produção de oxigênio singlete, ânions superóxidos e hidroxilas.



Fonte: própria autoria.

Reação Tipo I, considera-se que o FS no estado triplete excitado reage com moléculas vizinhas a partir de transferência de elétrons ou hidrogênio, gerando então radicais livres altamente reativos (ROS) ou íons-radicais que tendem a reagir com o oxigênio (O_2) no estado fundamental, levando assim à produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), hidroxila ($\cdot OH$) e superóxido ($\cdot O_2^-$), além de radicais derivados de lipídios (KURNIAWAN et al., 2017; SAKIMA et al., 2018).

Reação Tipo II, o FS ativado reage com moléculas vizinhas por transferência de energia ao oxigênio induzindo a produção do oxigênio singlete (1O_2), este (1O_2) pode modificar as estruturas das membranas plasmáticas ou até mesmo o DNA, bem como causar morte celular através de diversos mecanismos, incluindo: peroxidação lipídica, inibição do sistema enzimático aglutinação proteica e pela reação com outros sistemas biológicos (BROWN, 2008). Esta reação tem sido considerada o principal mecanismo foto-oxidativo para células (MORGADO et al., 2017).

A partir disso, o 1O_2 é o principal fator intermediário no processo fotodinâmico, sendo capaz de apresentar um papel importante na inativação celular. Em sistemas biológicos, o 1O_2 apresenta tempo de vida extremamente baixo, cerca de $0,3 \mu s$, em função disso seu raio de ação também é reduzido ($<0,02 \mu m$). Em contrapartida, o 1O_2 fornece efeitos citotóxicos em diversos

alvos celulares, tais como, proteínas, organelas, fosfolipídios da membrana celular, mitocôndrias e DNA, promovendo então a morte celular. Por causa da limitada difusão do $^1\text{O}_2$ em decorrência a sua meia vida curta, a reação permite levar a uma resposta localizada, na qual particularmente se torna ideal para aplicações de infecções localizadas, pois não tem capacidade de afetar outras células ou moléculas (MEISEL; KOCHER, 2005; RAJESH et al., 2011).

Mediante disto, o processo de fotossensibilização pode ocorrer por necrose (morte celular) ou apoptose (morte prolongada). A morte celular pode acontecer por inativação de proteínas, danos à membrana, liberação de enzimas lisossomais em consequência da lise da membrana lipossomal, além de danos às moléculas de DNA e inibição do metabolismo energético, também por lesões irreversíveis nas mitocôndrias (BIEL et al., 2011; ISSA; MANELA-AZULAY, 2010).

Alguns fatores estão diretamente relacionados ao processo de reação foto-oxidativo da TFD, como por exemplo: dose e intensidade da luz, além do tipo de FS usado, potência do LED, além do tempo de irradiação (FERNANDES; DIAS, 2013; FREIRE et al., 2016).

Resultados positivos com a TFD para uso tópico tem se demonstrado promissor em protocolos pré-clínicos e clínicos, além disso a utilização da terapia tem efeito de erradicação e/ou redução substancial para destruir células-alvos, tecidos tumorais e vasculatura circundante, quando utilizado em meio *in vitro* ou *in vivo*, são eficientes frente a tratamentos mediante a câncer, infecções microbianas e atualmente na medicina estética, contra degeneração relacionada a idade (DE ANNUNZIO et al., 2019; MILLER et al., 2007).

Resultados de investigação experimentais em estudos *in vitro* para avaliar modelos de linhagem celular da mama, uma não tumoral (MCF-10A) e outra tumoral (SKBR-3), foram realizados por Soriano et al., (2017), os pesquisadores demonstraram conclusivamente redução da viabilidade celular durante 10 minutos de irradiação com luz vermelha com o tratamento fotodinâmico para ambas as linhagens celular.

Pinto et al., (2016), investigaram, *in vitro*, a ação da TFD sobre *Leishmania major* e *Laishmania braziliensis*., utilizando como FS curcumina sob diluições seriadas de 500 $\mu\text{g} / \text{ml}$ a 7,8 $\mu\text{g} / \text{ml}$, com a associação de luz LED no comprimento de onda de 450 nm, em uma potência de 10 J/cm^2 . A avaliação da atividade mitocondrial foi realizada pelo ensaio de MTT, 18h após o tratamento com a luz. Este estudo foi conclusivo para determinar a viabilidade dos parasitas mostrando que a curcumina é um agente fotossensibilizante promissor diante o efeito fotodinâmico.

Wiench et al., (2019), em seus estudos, verificaram a seletividade da TFD na inativação em células de biofilmes de *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. krusei*, na qual utilizou como agente

fotossensível azul de toluidina, e luz laser diodo em 635 nm (potência de 400 mW durante 30s). Este estudo demonstrou que as concentrações do FS junto com a fluência de luz foram capazes de foto-inativar estas espécies de *Candida*.

Em um estudo realizado por Wang et al., (2017), mostrou que a associação da TFD utilizando luz halógena a 5.000Ix por 30 min e mediada por clorina e6, foi capaz de reduzir efeitos inflamatórias em células HACaT infectadas com acnes em modelos *in vivo*, sendo viável essa utilização para a área de cosmética, no que se refere a processo de rejuvenescimento da pele com redução de cicatrizes, mas também em doenças inflamatórias.

Assim, essa técnica oferece vantagens por ser altamente seletiva em diferentes áreas terapêuticas. Vale ressaltar que a eficiência da TFD está relacionada a um conjunto de fatores, tais como propriedades fotoquímicas e fotofísicas do FS, bem como a natureza da interação do FS com moléculas biológicas. Além do mais, essa terapia pode ser utilizada uma única vez ou em combinação com outras modalidades terapêuticas (BAPTISTA et al., 2012; MILLER et al., 2007).

2.2 Fotossensibilizadores (FS)

Os FS são componentes importantes na execução da TFD. Dentre as características idealmente presentes nos FS, encontram-se, ser quimicamente puro, ter baixa toxicidade no escuro, ser eliminado rapidamente no organismo, ter alta seletividade pelos tecidos doentes e não em tecidos saudáveis, não ser mutagênico ou carcinogênico, ter maior absorção de luz na região do vermelho (600 – 800 nm) conhecida como janela terapêutica, apresentam toxicidade local apenas após a ativação da luz, ser estável e fácil de se dissolver nos fluidos corporais ou em sistemas biocompatíveis, permanecer em estado excitado por tempo suficiente para permitir a sua interação com moléculas vizinhas e produzir espécies citotóxicas capazes de causar morte celular (AGOSTINIS P, BERG K, CENGEL K., 2017). Principais FS disponíveis para uso clínico estão descritos na Tabela 1.

Didaticamente, os FS são bioquimicamente classificados em três gerações- primeira geração, segunda geração e terceira geração. Os FS de primeira geração são representados pelos derivados da hematoporfirinas (HpD) e das porfirinas (photofrin) (VALLI et al., 2020). De acordo com Meisel & Kocher, (2005), os FS de primeira geração apresentam algumas desvantagens, tais como, baixa seletividade, fototoxicidade cutânea elevada e baixa absorção de luz na região do vermelho, sendo essas características indesejáveis para TFD.

Os FS de segunda geração, por sua vez, foram desenvolvidos com intuito de contornar os efeitos limitantes dos FS de primeira geração, sendo compostas por, ftalocianinas, naftalocianinas, benzoporfirinas, clorina, bacterioclorinas e as purpurinas (HÖNIGSMANN, 2013). Este FS apresentam algumas vantagens como, maior pureza química, forte banda de absorção no infravermelho, são minimamente tóxicos em ausência de luz, além de apresentar alto rendimento quântico na geração do $^1\text{O}_2$ (ABRAHAMSE; HAMBLIN, 2016).

Contudo, o desenvolvimento do FS de terceira geração consiste na conjugação da associação do FS com sistemas nanoestruturados, como, nanopartículas, micelas, lipossomas, ou a compostos biológicos ativos, como por exemplo, anticorpos conjugados, peptídeos e ácido fólico (ALLISON et al., 2004; PLAETZER et al., 2009; YANO et al., 2014).

Tabela 1- Fotossensibilizadores disponíveis para uso clínico.

Fotossensibilizadores	Estrutura	λ (nm)	Aprovação	Uso clínico
Porfirina Sódica	Porfirina	630	Mundial	Pulmão, esôfago, ducto biliar, cérebro,
Tetrakis (pentafluorofenil) porfirina	Porfirina	416	EUA	células cancerígenas HCT116
ALA	Percursor de Porfirina	635	Mundial	Pele, bexiga, cérebro, esôfago, <i>Staphylococcus aureus</i>
Ésteres de ALA	Percursor de Porfirina	635	Europa	Pele, bexiga
Verteporfina	Clorina	690	Mundial	Oftálmico, pele, pancreático
Ftalocianina siliconada (Pc4)	Ftalocianina	670	EUA	Linfoma cutânea de células T
Hexadecafluor Zinco-Ftalocianina (ZnPcF₁₆)	Ftalocianina	686	EUA	Mama
Padoporfina	Bacterioclorina	762	_____	Próstata

Fonte: adaptada de AGOSTINIS P, BERG K, CENGEL K., 2017; MALACARNE et al., 2019.

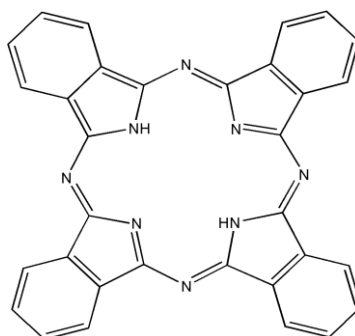
Estudos envolvendo novos FS tem apresentado resultados promissores para aplicação de TFD. Neste contexto, as ftalocianinas tem despertado grande interesse na comunidade científica, devido ao seu elevado coeficiente de absorvidade molar na faixa espectral conhecida como “Janela fototerapêutica”, o que confere maior poder de penetração, além de apresentar baixa toxicidade quando empregada a TFD (ALLEN; SHARMAN; VAN LIER, 2001; HÖNIGSMANN, 2013; SHAFIRSTEIN et al., 2017).

2.3 Ftalocianinas (FC)

As ftalocianinas (FC) são corantes sintéticos semelhantes as porfirinas e estruturalmente considerada azoporfirinas, quimicamente puros e considerados FS de segunda geração, atualmente o uso de FC vem atraindo bastante atenção na área de TFD devido suas propriedades fotoquímicas e fotofísicas (GARCIA et al., 2011).

As FC mimetizam as porfirinas em seu macrociclo central, que é constituído por uma unidade cíclica tetrapirrólica. Entretanto, são unidas por átomos de nitrogênio e possuem anéis benzênicos sobre as unidades pirrólicas. Devido a essas características, há uma forte absorção da FC na região do vermelho do espectro visível (670-680nm) (GOTO; SIQUEIRA-MOURA; TEDESCO, 2017). A Figura 2 ilustra a estrutura química da FC.

Figura 2- Estrutura química da Ftalocianina.



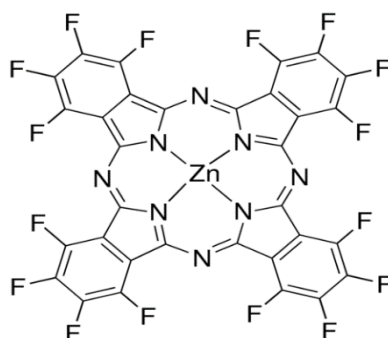
Fonte: *Sigma-Aldrich* (St.Lois, EUA).

As FC possuem muitas vantagens comparadas aos FSs de primeira geração, como alta absorção de luz ($2 \times 10^5 \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) nos comprimentos de onda de 650-700nm, na qual permite sua aplicação dentro da janela terapêutica, assim possibilitando maior poder de penetração tecidual e baixa toxicidade *in vitro* (GOMER, 1991; KAMKAEW et al., 2013). Outra vantagem das FC, é que elas podem ser eliminadas no organismo de forma rápida, com quase nenhuma

fluorescência observada no tecido-alvo após 24 h de sua administração tópica (ALMEIDA et al., 2012; LEME GOTO, 2016).

Suas propriedades fotofísicas são fortemente influenciadas pela presença de íons metálicos diamagnético, tais como, FC de cobre (Cu), índio (In), rutênio (Ru) e zinco (Zn), formando então complexos com alto rendimento quântico de estados singlete excitado e estado triplete excitado com tempo de vida relativamente longo (DURMUŞ; AHSEN, 2010; DURMUŞ; NYOKONG, 2007). A Figura 3 apresenta a estrutura química da hexadecaflúor zinco ftalocianina utilizada neste trabalho.

Figura 3- Estrutura química acomodando o íon metálico de hexadecaflúor zinco ftalocianina (ZnPcF₁₆).



Fonte: *Sigma-Aldrich* (St.Lois, EUA).

Entretanto, apesar de tantas características promissoras da FC uma das desvantagens é sua administração em sistemas biológico direta inviável, devido a sua hidrofobicidade, pois essa propriedade em meio aquoso leva a auto-agregação e em muitos casos a uma subsequente precipitação o que reduz drasticamente a capacidade do composto gerar ¹O₂ (MUEHLMANN et al., 2015; VOLTAN et al., 2016; YU et al., 2018).

2.4 Nanotecnologia farmacêutica

A nanotecnologia é uma ciência multidisciplinar, sendo empregada em diversas áreas de conhecimento, entre elas, no ramo farmacêutico, o seu emprego nesta área vem ganhando bastante atenção. Atualmente, existem trabalhos descritos na literatura utilizando modelos nanométricos em busca de benefícios para aplicações farmacêuticas (ELZOGHBY, 2019; ESCORBAR et al., 2018).

Neste caso, a nanotecnologia farmacêutica, tem como objetivo produzir sistemas de liberação de insumo farmacêutico ativo, descrita como “drug delivery systems”, a partir de

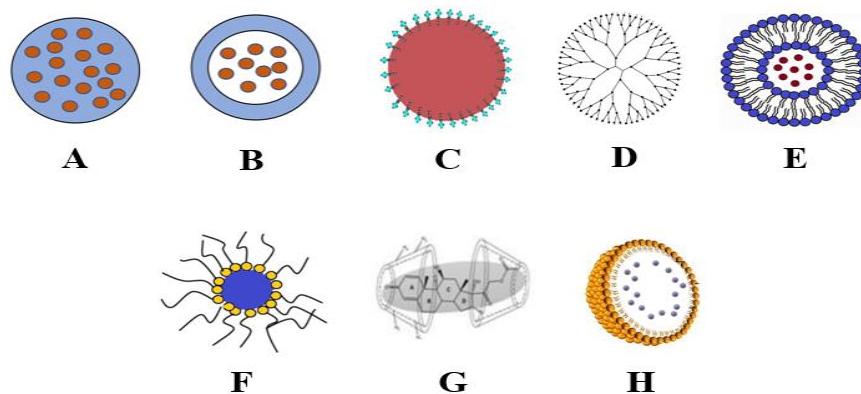
partículas de tamanho nanométrico (1 e 1000 nm). Além disso, esse sistema busca desenvolver ou melhorar o insumo farmacêutico ativo, visando manter a sua concentração em níveis terapêuticos (PRASAD et al., 2018; VOLTAN et al., 2016).

No entanto, não é de hoje que ocorre problemas relacionados a eficácia do insumo farmacêutico ativo, como baixa solubilidade aquosa, baixa capacidade de atravessar as barreiras biológicas e/ou baixa estabilidade nos fluidos biológicos, o que acaba se traduzindo por uma baixa biodisponibilidade e baixa eficácia terapêutica. Por esse motivo, sistemas nanoestruturados vem sendo utilizado para contornar tais problemas (SAFARI; ZARNEGAR, 2014).

Esses sistemas nanoestruturados, são considerados uma alternativa promissora para contornar as desvantagens dos insumo farmacêutico ativo mencionados anteriormente, pois consiste na alta seletividade, proporcionando o carregamento do medicamento para sítios específicos, permitindo direcionar o tratamento a células-alvo, diminuindo efeitos secundários, além de permitir a administração de insumo farmacêutico ativo hidrofóbicos em sistemas dispersos aquosos (CALIXTO et al., 2019; DE OLIVEIRA DE SIQUEIRA et al., 2017).

Os principais sistemas estudados para incorporação de substâncias são, nanopartículas poliméricas (nanocápsulas e nanoesferas), nanoemulsões, dendrímeros, lipossomas, micelas polimérica, ciclodextrinas e nanopartículas lipídicas, conforme demonstrado na Figura 4 (DING; LI, 2017; ESCOBAR et al., 2018; FONSECA-SANTOS et al., 2019; PROW et al., 2011; SAOKHAM; LOFTSSON, 2017; TRIGO-GUTIERREZ et al., 2018; VOLTAN et al., 2016).

Figura 4- Principais sistemas nanoestruturados.

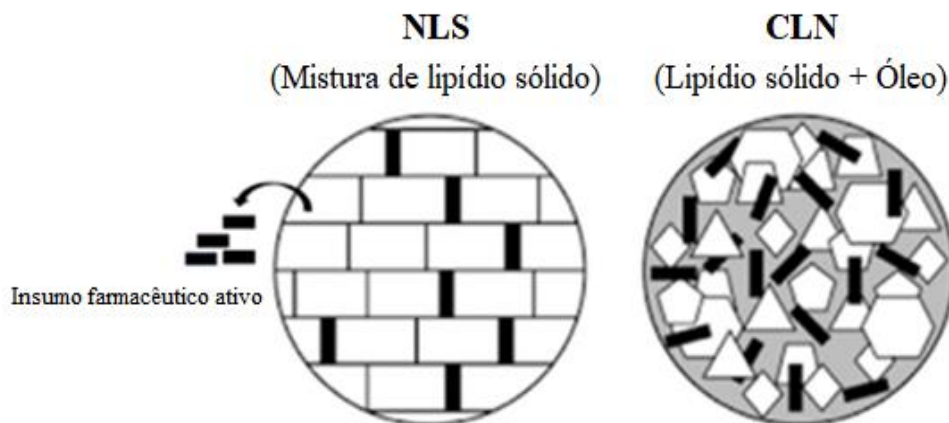


Legenda: **A** refere-se a nanoesfera; **B** nanocápsula; **C** nanoemulsão; **D** dendrímeros; **E** lipossomas; **F** micelas poliméricas; **G** Ciclodextrina e **H** nanopartículas lipídicas. Fonte: **A** e **B** autoria própria; **C** adaptado de PIRES; DE MOURA, 2017; **D** e **F** adaptado de DING; LI, 2017; **G** adaptada de SAOKHAM; LOFTSSON, 2017; e **H** adaptada de VOLTAN et al., 2016.

2.5 Nanopartículas Lipídicas (NLS)

As nanopartículas lipídicas (NLS) foram desenvolvidas no início dos anos 90, e são considerados um dos sistemas mais promissores pelos pesquisadores, principalmente, para carreamento de insumo farmacêutico ativo lipofílicos (DOS SANTOS RAMOS et al., 2018). Ademais, apresentam vantagens em relação a liberação controlada por ser biocompatíveis e biodegradáveis, fornecendo proteção para compostos lábeis incorporados contra a degradação química, tornando este sistema menos tóxico (MD et al., 2017; RICCI-JÚNIOR et al., 2011). Como apresentado na Figura 5, as NLS são divididas em dois grupos: Nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) desenvolvidas inicialmente, e os Carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN), configurando-se um sistema de segunda geração (DAS; NG; TAN, 2012; KUMAR; RANDHAWA, 2013a; VAGHASIYA; KUMAR; SAWANT, 2013).

Figura 5- Matriz lipídica da NLS (esquerda) e CLN (Direita).



Fonte: adaptada de YOON; PARK; YOON, 2013.

As NLS são formadas a partir de lipídios sólidos a temperatura ambiente e corporal, sendo estabilizadas por tensoativos (SANNA et al., 2007). Esses lipídios possuem um alto ponto de fusão acima de 40°C, formando então um núcleo sólido revestido por moléculas de tensoativos, promovendo uma estrutura cristalina altamente organizada. (KHURANA; BEDI; JAIN, 2013; PRIYANKA; ABDUL HASAN SATHALI, 2012).

De acordo com Müller e colaboradores, (2002b), as estruturas cristalinas formadas a partir das NLS se apresentam com tamanha perfeição que acaba limitando o seu espaço para a

incorporação de princípios ativos. Isso ocorre durante a produção das NLS, pois, os lipídios são recristalizados, parcialmente, em forma instáveis de maior energia (α ou β'), com isso, são formadas imperfeições na matriz lipídica que permitem a acomodação das moléculas do insumo farmacêutico ativo. No entanto, durante o período de armazenamento, esses lipídios podem ser convertidos em forma de energia (β), mais estáveis e altamente organizadas (MITRI et al., 2011; MÜLLER; RADTKE; WISSING, 2002b). Esta mudança estrutural (α para β - cristalina) pode ocasionar rápida liberação do ativo, o que consiste em uma desvantagem significativa para utilização clínica destes carreadores (DAS; NG; TAN, 2012; SOUTO; MÜLLER, 2005).

Para reduzir as limitações das NLS, os CLN foram desenvolvidos como intuito de melhorar a eficiência de encapsulamento e minimizar a expulsão do ativo das partículas, durante o armazenamento, o que em geral, ocorria com as NLS (FANG et al., 2008).

Além disso, os CLN apresentam uma matriz composta por uma mistura de lipídio sólidos e líquido (óleos) (MÜLLER et al., 2007). Os lipídios mais utilizados na obtenção de CLN são triglicerídeos, glicídeos parciais, ácidos graxos, esteróis e ceras, também são utilizados tensoativos, com objetivo de evitar a agregação das partículas e estabiliza-las (MITRI et al., 2011). Exemplos de componentes utilizados na preparação de CLN estão sumarizados na Tabela 2.

Tabela 2- Exemplos de lipídeos líquidos, sólidos e tensoativos utilizados no desenvolvimento de carreadores lipídicos nanoestruturados.

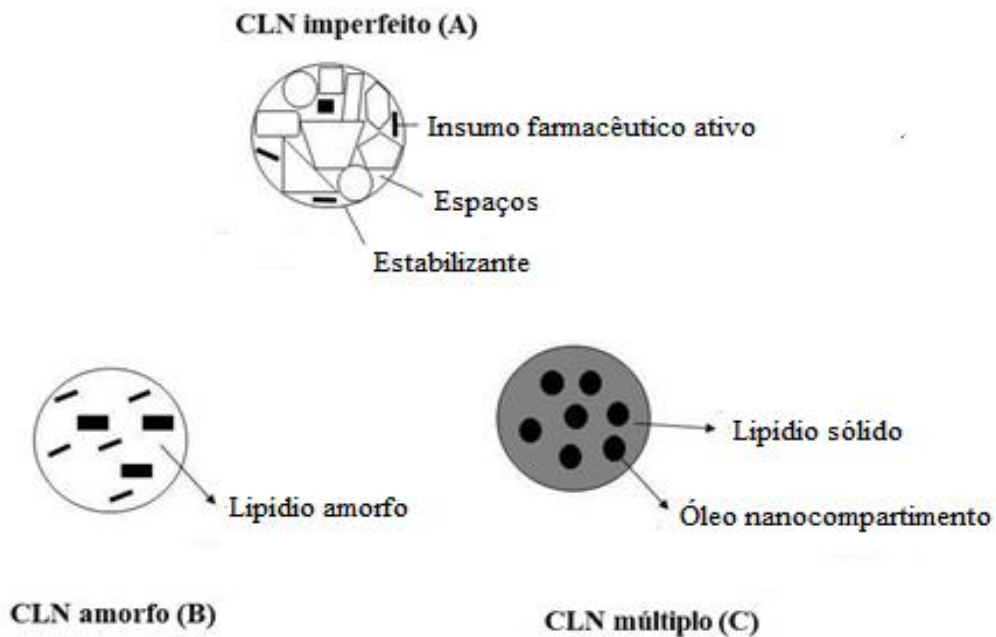
Componentes	Exemplos	Referências
Lipídeo sólido	Compritol 888	GONZÁLEZ-MIRA et al., 2011
	Estearato de polioxietileno (40 (EP)	SATO et al., 2017
	Ácido palmítico	GHATE et al., 2016
	Cera de carnaúba	MITRI et al., 2011
	Cera de abelha	GHATE et al., 2016
Lipídeo líquido	Óleo de rícino (OR)	LAKHANI et al., 2019
	Miglyol 812	GONZÁLEZ-MIRA et al., 2011
	Triglicérides do ácido cáprico/caprílico (TGACC)	SINGH HALLAN et al., 2020
	Óleo de rícino hidrogenado e etoxilado (OR 40 OE)	SATO et al., 2017
	Ácido oleico	ESSAGHRAOUI et al., 2019
Tensoativos	Polissorbato 80	ARSHAD et al., 2020
	Lectinas	ASFOUR; KASSEM; SALAMA, 2019
	Poloxamer 188	KHALIL, 2014
	Plutonic F-127	ESSAGHRAOUI et al., 2019
	Álcool Polivinílico (PVA)	KHALIL, 2014

A associação de lipídios líquidos e sólidos promove uma matriz lipídica menos organizada com mais imperfeições, podendo acomodar uma maior quantidade de insumo farmacêutico ativo e proporcionar mais flexibilidade para a modulação de liberação. Além disso, os CLN apresentam ausência de toxicidade, possuem proteção contra a degradação química de substâncias lábeis, aumento da estabilidade de fármacos, fácil esterilização e transposição para larga escala e boa biocompatibilidade, e também são capazes de aumentar a estabilidade química de compostos sensíveis a luz, a oxidação e hidrólise (BAHARI; HAMISHEHKAR, 2016).

Diferentes tipos de matrizes podem ser formados dependendo da natureza dos lipídios utilizados na preparação do CLN, o primeiro modelo conhecido como “CLN imperfeito”

(Figura 6 A), consiste em uma mistura de glicerídeos compostos por diferentes ácidos graxos. Essa mistura pode aumentar a distância entre as cadeias de ácidos graxos dos glicerídeos, ocasionando imperfeições no cristal (KUMAR; RANDHAWA, 2013a). Essas imperfeições permitem gerar mais espaço para acomodar o ativo, aumentando então a eficiência de encapsulação. O segundo modelo chamado “CLN amorfo” (Figura 6 B), ocorre devido a mistura de lipídios sólidos e líquidos (óleos), levando a uma solidificação da matriz lipídica sem cristalização, assim tornando-se uma estrutura amorfa. Essa estrutura evita a expulsão do ativo das partículas durante o armazenamento (BELOQUI et al., 2017; GANESAN; NARAYANASAMY, 2017). O terceiro modelo é chamado de “CLN múltiplo” (Figura 6 C), são formadas por diversas lacunas devido à grande quantidade de lipídio líquido, o que favorece a solubilidade do insumo farmacêutico ativo no interior das gotículas (MÜLLER; RADTKE; WISSING, 2002b; SHARMA; BALDI, 2018).

Figura 6- Esquemática estrutural dos carreadores lipídicos nanoestruturados: A) CLN imperfeito, B) CLN amorfo, C) CLN múltiplo.

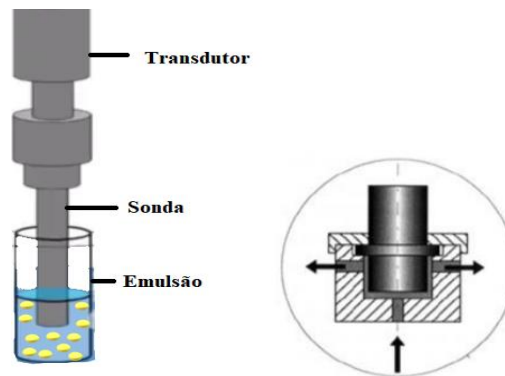


Fonte: adaptada de MÜLLER; RADTKE; WISSING, 2002a.

Existem diferentes métodos empregados na preparação dos CLN, como por exemplo, a técnica de sonicação. Nesse método, primeiramente, é preparada uma emulsão a partir de mistura de uma fase lipídica fundida, fase aquosa e tensoativos que são submetidas a forças de

ruptura, por meio de uma fonte de alta energia com o processador ultrassônico. Ondas de frequência maiores que 20 kHz são geradas por meio de um transdutor magnético-estrutivo ou piezelétrico, que produz gradientes de pressão na qual deformam as gotículas, por meio da cavitação produzida pela queda da pressão local abaixo da pressão de vapor solvente, gerando fluxo turbulento e cisalhamento (processo de sonicação- Figura 7). Vale destacar, que neste processo são otimizadas variáveis como, intensidade e frequência das ondas, além do tempo de sonicação, sendo fundamentais para garantir o tamanho reduzido das gotículas (BELOQUI et al., 2017; GESZKE-MORITZ; MORITZ, 2016).

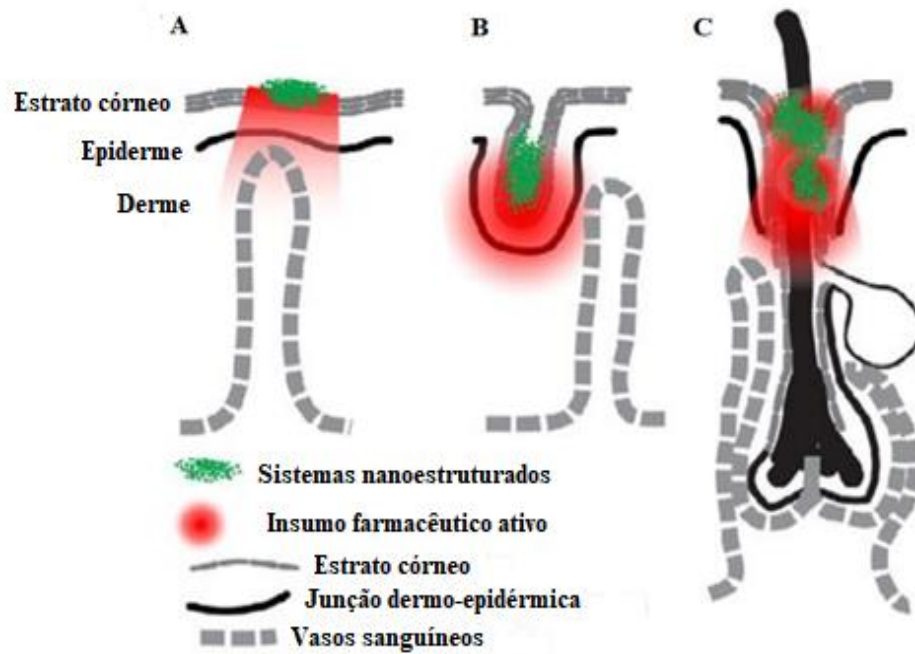
Figura 7- Representação gráfica do processo de sonicação.



Fonte: adaptada CORTÉS-ROJAS, 2015.

Durante a última década, o número de estudos utilizando formulações baseadas em CLN aumentaram consideravelmente. Podendo ser administrado por via endovenosa, pulmonar, oral, também, por via transdérmica e tópica (GARCÊS et al., 2018). O uso dos CLN em aplicações tópicas, na pele ou em mucosas, tem atraído bastante atenção devido ao tamanho reduzido das partículas e a sua forte aderência ao estrato córneo (EC), formando um filme lipídico flexível sobre a camada de células queratinizadas, além do mais, para uma partícula permear na pele, o ideal é que tenha um tamanho de até 700 nm (BELOQUI et al., 2016). Vale ressaltar, que os sistemas nanoestruturados tem possibilidade de favorecer o acúmulo do insumo farmacêutico ativo nos apêndices cutâneos, seguido de sua penetração até o seu sítio de ação, diante diferentes mecanismos, conforme ilustrado na Figura 8 (PROW et al., 2011).

Figura 8- Prováveis mecanismos de interação dos sistemas nanoestruturados com a pele: (A) interação dos sistemas nanoestruturados com o EC; (B) acúmulo dos sistemas nanoestruturados nas glândulas/ imperfeições da pele e (C) acúmulo dos sistemas nanoestruturados em folículos pilosos.



Fonte: Adaptado de PROW et al., 2011.

Pesquisadores têm demonstrado um enorme potencial do CLN quando incorporado em FS para aplicações tópicas. Em um recente trabalho, Rapalli et al., (2020), desenvolveram CLN contendo curcumina para administração tópica, mediante o tratamento de psoríase crônica inflamatória e acne vulgar. Esses sistemas foram preparados pelo método de emulsificação seguida de sonicação, o que resultou em sistemas com tamanho de aproximadamente 96,2 nm. Além disso, os pesquisadores também relataram maior permeação da curcumina na pele quando a substância estava encapsulada, do que quando administrada em sua forma livre. Park et al., (2015), prepararam e caracterizaram CLN carregados com DH-I-180-3, um fotossensibilizador de segunda geração, para tratamento de células MCF-7. Os CLN foram baseados em tensoativos (poloxamer 188 e lectina) e lipídios líquido e sólido (ácido esteárico e Capmul[®] MCM C8), usando a técnica de homogeneização a quente. O tamanho das partículas variou em torno de 200 nm. Esses resultados foram promissores diante a incorporação de DH-I-180-3 no CLN, melhorando sua eficácia e direcionamento em células MCF-7.

Assim, os CLN utilizados no carreamento de insumo farmacêutico ativo hidrofóbicos, têm como objetivo principal minimizar a degradação ou inativação do ativo após administração,

prevenir efeitos adversos como excesso do insumo farmacêutico ativo e aumentar a sua entrega ao seu local de ação (DAS; NG; TAN, 2012; PUGLIA et al., 2017). Desta forma, a encapsulação da FC em CLN pode ser uma opção viável para sua administração tópica mediante a TFD.

3 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho foi desenvolver e caracterizar físico-quimicamente carreadores lipídicos nanoestruturados para administração de ftalocianina como sistemas de liberação tópica para a terapia fotodinâmica.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

4.1.1 Matérias Primas

- Estearato de polioxietileno 40 (Sigma Aldrich, Brasil);
- Triglicérides do ácido cáprico/caprílico (Via Farma, Brasil);
- Óleo de rícino (Mapric, Brasil);
- Pluronic[®] F127 (Sigma Aldrich, EUA).
- Zinc1,2,3,4,8,9,10,11,15,16,17,18,22,23,24,25-hexadecafluoro-29H,31H-phthalocyanine (Sigma-Aldrich, EUA);
- Água destilada (Destilador de água Pilsen, modelo SP5L, Prudente, Brasil).

4.1.2 Equipamentos

- Q700 Sonicator (Qsonica, Newtown, CT, USA);
- Balança semi-analítica (Shimadzu, modelo AW220);
- Banho ultrassônico – Ultrasonic Cleaner (Unique);
- Zetasizer Nano NS Malvern Instruments (Malvern, UK);
- Microscópio eletrônico de transmissão (JEOL JEM-100CX2);
- Infravermelho Bruker Vertex 70ATR;
- Espectrômetro Bruker Avance III 600;
- Centrifugal Spin Coater – SPI Supplies, modelo KW-4A.

4.2 Métodos

4.2.1 Preparação dos carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN)

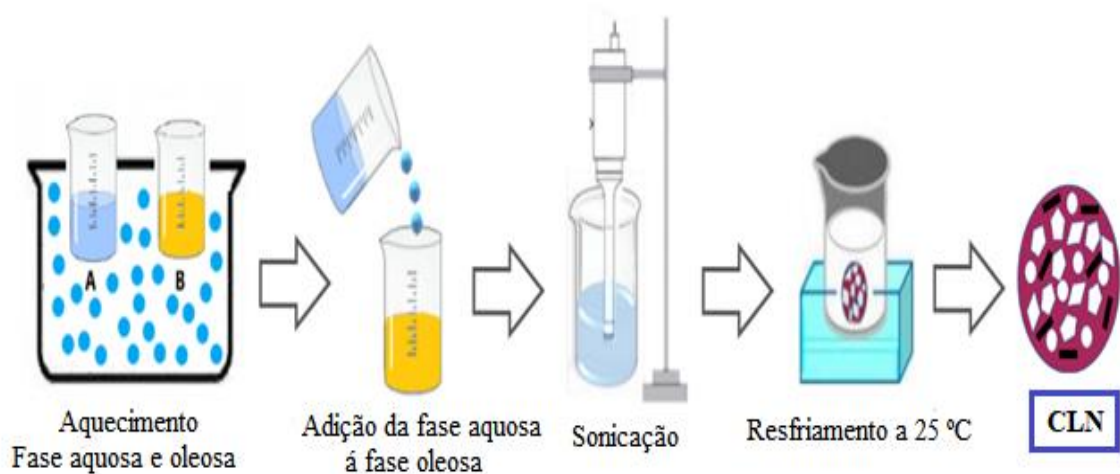
O desenvolvimento dos CLN foi baseado no trabalho conduzido por Sato e colaboradores, (2017), com modificações, pelo método de fusão-emulsificação por sonicação.

Neste método, inicialmente, a formulação contendo como fase lipídica foi composta por 2,0% de estearato de polioxietileno 40 (EP), 2,0% de triglicérides do ácido cáprico/caprílico (TGACC) e 0,9% de óleo de rícino (OR). Como fase aquosa, utilizou-se o Pluronic F-127 (PF-127) na concentração de 3,5% e água destilada.

Os componentes da fase aquosa e da fase lipídica foram pesados em béqueres separados, de modo que a fase aquosa foi aquecida a 70 °C e a fase lipídica a aproximadamente 5–10 °C acima do ponto de fusão do lipídio. A fase aquosa contendo o tensoativo foi vertida sobre a fase lipídica fundida sob constante agitação, dando origem a uma pré-emulsão

A dispersão da pré-emulsão foi realizada por sonificador com amplitude de 35%, em modo descontínuo por 4 minutos com intervalo de 30 segundos a cada 60 segundos. Após o processo de sonicação, as formulações foram resfriadas em banho de gelo para que ocorra a cristalização lipídica e a formação dos CLN. A Figura 9 apresenta uma ilustração do método de preparação. A fim de eliminar o titânio desprendido da haste durante o processo de sonicação, as formulações foram centrifugadas a 5000 rpm por 10 minutos. Em seguida, foram acondicionadas em frascos âmbar e mantidas em geladeira.

Figura 9- Representação esquemática da produção dos CLNs pelo método de fusão-emulsificação seguido por sonicação.



Fonte: própria autoria.

4.2.1.1 Incorporação da FC no CLN

A FC (zinco 1,2,3,4,8,9,10,11,15,16,17,18,22,23,24,25-hexadecafluoro 29H, 31H-ftalocianina) foi utilizado para este estudo, e adquirido comercialmente pela SigmaAldrich.

Na preparação de CLN acrescidos de FC, a técnica de preparação foi a mesma, sendo que a FC foi dispersa na fase lipídica fundida na concentração de 1% em relação a massa lipídica.

4.2.1.2 Eficiência de encapsulação (%EE)

Para avaliar a eficiência de encapsulamento (%EE), as amostras de CLN-FC foram centrifugadas a 10.000 rpm durante 30 minutos. Após este procedimento, os sobrenadantes foram filtrados usando filtros de Minisart® NML de acetato de celulose, visando separar a FC precipitada da encapsulada. A quantidade do FC encapsulada no CLN foi baseada no seu espectro de absorção de fluorescência usando espectrofotômetro de fluorescência (Cary Eclipse - UK) com excitação máxima em 639 nm e emissão em 677 nm. (FADEL; KASSAB; ABDEL FADEEL, 2010). A %EE foi estimada de acordo com a Equação 1.

$$\%EE = \frac{M1}{MT} \times 100 \quad \text{Equação 1}$$

Onde

EE: eficiência de encapsulação.

M1: absorbância da FC encapsulado no CLN.

MT: absorbância teórica da FC usada no CLN.

4.2.2 Caracterização físico-química dos CLN com e sem FC

4.2.2.1 Determinação do tamanho médio (D_{mn}), índice de polidispersidade (PDI) e do potencial zeta (Pz)

O diâmetro das gotículas e a análise do Pz dos CLN foram determinados pela técnica de correlação de fótons (conhecida como *Dynamic light scattering*- DLS) e mobilidade eletroforética das nanopartículas, respectivamente, utilizando o equipamento Zetasizer Nano NS (Malvem Instruments Malvern, UK). Ambas as medidas foram realizadas com temperatura constante de 25° C. As amostras foram diluídas em água ultra-purificada (1:100), mantidas em frascos fechado, vertidas em uma cubeta e colocadas na célula eletroforética em um ângulo de dispersão de 90°. Para cada amostra foram realizadas 3 determinações sendo analisadas nos tempos de 24 horas, 7, 15, 21, 28, 45, 60 e 90 dias. Durante o tempo de análise, as amostras permaneceram em geladeira. O estudo foi realizado no Departamento de Fármacos e Medicamentos da Universidade Estadual Paulista (UNESP) em Araraquara. As determinações foram realizadas em triplicata e os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. Os dados foram plotados utilizando *software SigmaPlot 10.0*.

4.2.2.2 *Microscopia eletrônica de transmissão (MET)*

A análise morfológica das CLN sem e com FC foi realizada por microscopia eletrônica de transmissão.

O tamanho e morfologia dos CLN foram caracterizados através de microscopia eletrônica de transmissão (JEOL JEM-100CX2). Este equipamento pertence a faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Para o preparo das amostras consiste em adicionar uma pequena alíquota na grade de níquel, seguido da remoção do excesso de amostra por um papel filtro. A contração negativa então foi realizada pela adição de uma gota de solução de acetato de uranila a 1% (m/v), foi adicionado sobre as amostras no intuito de melhorar o contraste das imagens. Após 10 minutos, o excesso de líquido foi removido, e a amostra secada à temperatura ambiente. As imagens foram adquiridas no microscópio a uma voltagem de 100 kV.

4.2.2.3 *Calorimetria exploratória diferencial (DSC)*

A calorimetria exploratória diferencial (DSC) foi realizada no departamento de Físico-química do Instituto de Química da UNESP – Araraquara, com a utilização do módulo calorimétrico modelo DSC Q10 (TA Instruments). Amostras de aproximadamente 5 mg previamente secas e acondicionadas em cadinhos de alumínio selado foram analisadas na faixa de temperatura de -35 a 350 °C com taxa de aquecimento de 10 °C/min, sob atmosfera de nitrogênio com fluxo de 50 mL/min. A partir dos curvas de DSC foram obtidas as temperaturas de pico (T_{pico}) e a entalpia (ΔH) dos eventos dos componentes isolados e do CLN com e sem FS. O aparelho foi calibrado para o parâmetro da temperatura utilizando como padrão o ponto de fusão do índio (156,6 °C) e a calibração para o fluxo de calor foi feita com base na entalpia de fusão do índio ($\Delta H_{\text{F}} = 28,54 \text{ J/g}^{-1}$). Os resultados de DSC foram plotados empregando o *software Oringin®*.

4.2.2.4 *Estudo de fotodegradação (photobleaching) por tempo de irradiação*

Para avaliar a fotodegradação, as amostras de FC, em solução (Tetrahidrofurano) ou incorporados nos CLN, foram submetidas à fonte de luz (LEDs – *light emitting diode*) no espectro de luz vermelha em diferentes intervalos de iluminação ($\cong 660\text{nm}$) e com potência de saída de 15 mW cada diodo. O espectro de absorção de cada amostra foi medido antes da

irradiação ($t = 0$) e após a irradiação com os seguintes intervalos de tempo 1, 2,5, 5, 10 minutos. Foi obtido um gráfico de decaimento experimental a partir da densidade óptica (D.O.) em função de tempo. Os resultados de *photobleaching* foram plotados utilizando *software SigmaPlot 10.0*.

4.2.2.5 Geração de oxigênio singlete em sistemas de célula (SOSG)

Uma solução de SOSG (2,5 μM) em metanol (1,750 mL) foi adicionado ao CLN-FC (0,250 mL (0,125 mg de FC)). A solução foi exposta à luz durante 30 minutos ((Fenix LD01 LED) e a intensidade de fluorescência de SOSG (após excitação a 505 nm) foi registrada a 525 nm a intervalos de 5 minutos. Os experimentos foram realizados para os seguintes grupos (I) FC livre, (II) FC livre + luz, (III) CLN-FC e (IV) CLN-FC +luz. As análises foram realizadas no departamento de farmácia da *University of Ulster*. Os dados foram plotados utilizando *software SigmaPlot 10.0*.

4.2.2.6 Linearidade

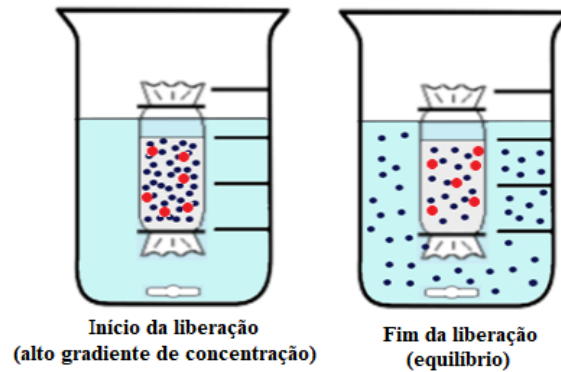
A linearidade foi alcançada com a concentração da curva analítica de média de três curvas analíticas independente. Preparou-se três soluções estoque de 100 $\mu\text{g/mL}$ e de cada uma seguiu diluição seriada em n-octanol, obtendo soluções FC nas concentrações de 0,25, 0,50, 1, 1,5, 2,0 $\mu\text{g/mL}$ em triplicata. A leitura foi realizada por meio do seu espectro de absorção de fluorescência usando espectrofotômetro de fluorescência (Cary Eclipse – UK) com excitação máxima em 639 nm e emissão em 677 nm.

4.2.2.7 Ensaios de liberação da formulação *in vitro*

O estudo de liberação do CLN-FC foi realizado pelo método do béquer utilizando membranas de diálise. Alíquotas de 1 mL CLN-FC ou FC livre foram colocadas em membranas de diálise do tipo SnakeSkin TM Dialysis Tubing (corte de 3.500, Thermo Scientific, Rockford, EUA), e posteriormente estas foram imersas em um béquer contendo 50 mL de n-octanol como meio a 37 °C, com velocidade constante de agitação de 500 rpm. Em intervalos de tempo pré-estabelecidos, foram coletados com uma pipeta do tipo eppendorf reference 700 μL do meio, sendo que esta quantidade foi reposta. A Figura 9 ilustra o processo de liberação *in vitro*.

A leitura da FC foi realizada conforme demonstrado no item 4.2.2.6. Os dados de liberação *in vitro* obtidos foram plotados utilizando *software SigmaPlot 10.0*, correlacionando tempo versus porcentagem de FC liberado.

Figura 10- Representação esquemática do experimento do perfil de liberação *in vitro* da FC a partir de CLN.



Fonte: própria autoria.

Os ensaios de cinética de liberação foram realizados a partir de modelos matemáticos utilizando *software SigmaPlot 10.0*. O melhor modelo matemático para prever a curva de liberação foi selecionada a partir do coeficiente de determinação (R^2) (AMEEDUZZAFAR et al., 2020; LOPES; LOBO; COSTA, 2005; SAMAHA; SHEHAYEB; KYRIACOS, 2009). Os modelos testados estão descritos na Equação 2 a 5.

Modelo de ordem zero:

$$Q = k \cdot t + Q_0$$

Equação 2

Onde q é a quantidade de insumo farmacêutico ativo liberado, t é o tempo e o Q_0 é o valor inicial do fármaco de Q e k é o coeficiente de liberação.

Modelo de primeira ordem:

$$Q = 100(1 - e^{-kt})$$

Equação 3

Onde Q é a quantidade de insumo farmacêutico ativo liberado, t é o tempo e k é o coeficiente de liberação.

Modelo de Higushi

$$Q = k \cdot t^{0,5} \quad \text{Equação 4}$$

Onde Q é a quantidade de insumo farmacêutico ativo liberado, t é o tempo e k é o coeficiente de liberação.

Modelo de Weibull

$$Q = 1 - \exp \left[\frac{-(t)^b}{a} \right] \quad \text{Equação 5}$$

Onde Q é a quantidade do insumo farmacêutico ativo liberado no tempo t , e a é a constante de tempo e b o expoente de liberação.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Preparação dos carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) e incorporação de ftalocianina (FC)

De modo a promover um sistema estável com aspecto homogêneo, a preparação do CLN foi realizada como descrito na metodologia de Sato et al., (2017) no item 4.2.1. Os autores desenvolveram CLN a partir do método de sonicação, no qual, prepararam 12 formulações utilizando TGACC, EP (40), óleo de rícino etoxilado 40 OE (OR 40 OE) e variando as concentrações de PF-127: 1, 2, 2,5, 3, 3,5 e 4%. O processo foi otimizado de modo a ser alcançado um sistema homogêneo e com elevada estabilidade física.

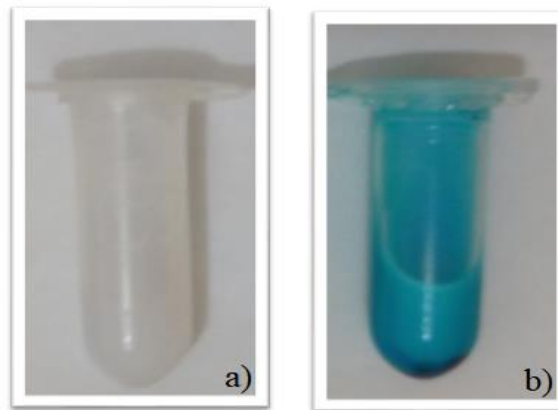
Em nosso estudo a fase lipídica foi constituída por lipídios líquidos TGACC, OR, além de lipídio sólido EP (40), para fase aquosa foi utilizado tensoativo PF-127 e água destilada. O trabalho foi realizado utilizando o método de fusão seguida de emulsificação por sonicador com amplitude de 35%, em modo descontínuo de 4 minutos com intervalos de 30 segundos. Este método foi usado principalmente para obter partículas em tamanho nanométrico, além disso, esta técnica também foi utilizada por ser segura, bem estabelecida e por ser facilmente reproduzida em larga escala (GANESAN; NARAYANASAMY, 2017).

De acordo com os autores Naseri et al., (2015) e Beloqui et al., (2016), um dos fatores mais importantes é concentração e seleção adequada de lipídeos e tensoativos, além da técnica utilizada na preparação de CLN, pois, são determinantes para garantir o tamanho da partícula e aumentar a sua estabilidade física durante o tempo de armazenamento.

Além disso, de modo a promover a incorporação da FC, foi realizada a etapa da preparação da fase lipídica, do mesmo modo de produção para CLN. Pois, este método é capaz de incorporar insumo farmacêutico ativo hidrofóbico, permitindo que o ativo fique retido e disperso na matriz lipídica (OSHIRO-JUNIOR et al., 2020).

Desta forma, o CLN apresentou-se como um sistema homogêneo, opaco e sem processos de instabilidade como floculação, cremação ou coalescência. Por outro lado, os CLN-FC apresentaram-se homogêneo e com aspecto opalescente azulado. A Figura 11 estão representadas as características macroscópicas do CLN e CLN-FC, dos quais foram desenvolvidos durante o estudo.

Figura 11- Características macroscópicas dos CLN (a) e CLN-FC (b).

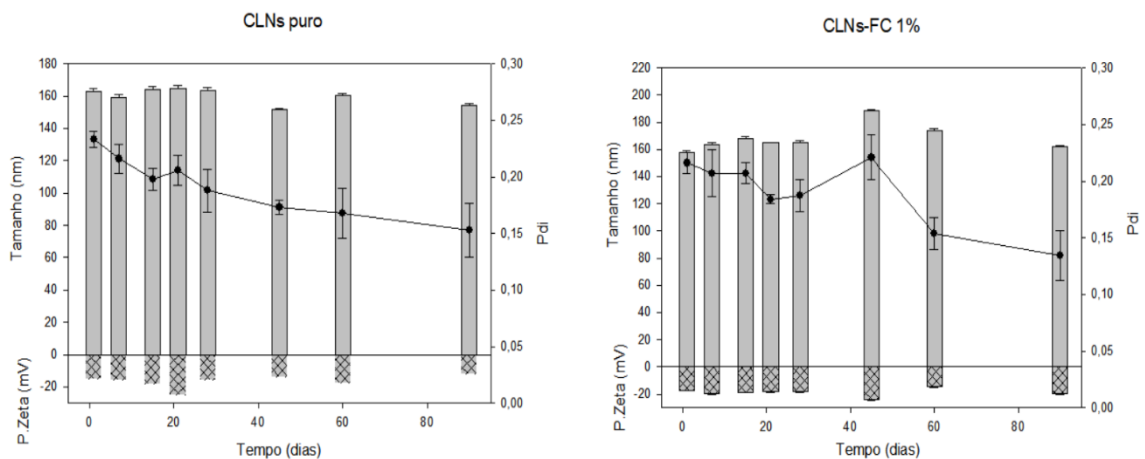


Fonte: dados da pesquisa.

5.2 Determinação do diâmetro hidrodinâmico médio das partículas (D.mn), índice de polidispersidade (PdI) e do potencial zeta (Pz)

Os CLN e CLN-FC, desenvolvidos neste estudo foram avaliados durante 90 dias por meio da determinação do diâmetro hidrodinâmico (D.mn), índice de polidispersão (PdI) e potencial zeta (Pz), a partir da técnica de espectroscopia de correlação de fótons, esta técnica mede a variação na intensidade do espalhamento da luz causado pelo o movimento browniano das partículas (BELOQUI et al., 2016; BUNJES, 2011; DE PAULA et al., 2013). Estes parâmetros estão diretamente associados com o início da perda de estabilidade dos sistemas (KOVALCHUK et al., 2009; MITRI et al., 2011). Os valores de D.mn, PdI e Pz estão representados na Figura 12.

Figura 12- Média e desvio padrão do diâmetro médio (nm), índice de polidispersidade e potencial zeta dos CLNs puros e carregados com FC no período de 90 dias.



Fonte: dados da pesquisa.

Os resultados referentes ao CLN revelaram valores de diâmetro médio entre $162,6 \pm 1,82\text{nm}$ e $154,4 \pm 1,07\text{nm}$, durante os 90 dias de armazenamento (Figura 12). No entanto, a incorporação de FC no CLN resultou no aumento no tamanho médio da partícula de $158,00 \pm 1,49\text{ nm}$ a $161,80 \pm 0,70\text{ nm}$, estes valores também foram observados por (OSHIRO-JUNIOR et al., 2020). Apesar disto, é importante destacar algumas diferenças, por exemplo, o tamanho médio do CLN contendo a FC foi relativamente maior do que o tamanho dos CLN a partir dos 40 dias de armazenamento, propondo que as moléculas do ativo estão inseridas na matriz lipídica (ALMEIDA et al., 2012; GOTO; SIQUEIRA-MOURA; TEDESCO, 2017; KUMAR; RANDHAWA, 2013b; PATRA et al., 2018).

Desta forma, o diâmetro médio das partículas se manteve estável durante os 90 dias de análise, com variações insignificantes. No âmbito farmacêutico, este sistema pode ser favorável e promissor para o uso diante administração tópica e cutânea, devido ao seu tamanho reduzido, variando de 50 a 300 nm (GARCÊS et al., 2018; KHOSA; REDDI; SAHA, 2018).

Além do diâmetro médio das partículas, também foi obtido o PdI. O PdI é um parâmetro importante para avaliar a polidispersidade de uma amostra baseada na distribuição do tamanho dos sistemas nanoestruturados (CHU; LIU, 2000). A obtenção do diâmetro de PdI das formulações de CLN podem ser influenciados por alguns parâmetros, por exemplo: composição de matriz lipídica, proporção de fase aquosa e oleosa, além do método utilizado na preparação (DAS et al., 2011; GOTO; SIQUEIRA-MOURA; TEDESCO, 2017). Desse modo, são considerados valores ótimos de PdI abaixo de 0,35 indicando um sistema homogêneo com menor valor de polidispersidade (DAS NEVES; SARMENTO, 2015; MÜLLER; RADTKE; WISSING, 2002a).

Os CLN apresentaram valores médios de PdI menores que $0,23 \pm 0,01$, característico de sistema com menor valor de polidispersidade. Para as formulações de CLN-FC, foram obtidos valores de PdI entre $0,21 \pm 0,02$ a $0,13 \pm 0,02$, durante os 90 dias (Figura 12). Desse modo, pode-se concluir que os valores de PdI permaneceram inferiores a 0,3 o que configura um sistema homogêneo, tornando as formulações estáveis. (BHATTACHARJEE, 2016; DAS; NG; TAN, 2012).

O Pz também foi avaliado, e indica a média geral das cargas elétricas que são adquiridas pelas partículas a partir de um determinado meio, podendo ser considerado uma referência para controlar a estabilidade de sistemas coloidais, uma vez que indica a intensidade de repulsão entre as partículas na dispersão (BHATTACHARJEE, 2016; CALIXTO; GRUMEZESCU, 2016; KOTAL; BHOWMICK, 2015).

Portanto, o Pz das formulações de CLN e CLN-FC demonstraram valores médios entre $-15,3 \pm 0,18$ a $-12,2 \pm 0,7$ e $-17,8 \pm 0,54$ a $-19,9 \pm 0,5$, ao longo dos 90 dias (Figura 12). Os resultados de potencial zeta obtidos neste trabalho mostra concordância a partir dos estudos de CLN e CLN-FC desenvolvidos por (GARG; SINGH, 2011; OSHIRO-JUNIOR et al., 2020).

De acordo com a literatura, partículas com valores de Pz entre 30 a 50 mV (valor em módulo) são considerados altamente estáveis, porém partículas com valores entre 20 mV são moderadamente estáveis (BHATTACHARJEE, 2016; MITRI et al., 2011). No entanto, este fato apenas atribui para que as partículas nos valores entre 20 mV permaneçam com estabilização eletrostática (SOUTO; MÜLLER, 2005). Contudo, a presença do PF-127, um tensoativo não-iônico, permite que ocorra um impedimento estérico, o que por si só, garante uma estabilidade nos sistemas nanoestruturados, impedindo a agregação das partículas. Além disso, os grupamentos hidroxilas presente no tensoativo confere carga negativa explicando os valores negativos obtidos neste trabalho. Os resultados de Pz mais a capacidade de impedimento estérico garantem um sistema estável durante os 90 dias de armazenamento, como demonstrado nesse estudo (GARG; SINGH, 2011; SAWANT; KHAN, 2017; VAGHASIYA; KUMAR; SAWANT, 2013).

Diante disto, a veiculação de ativos em sistemas nanoestruturados destinados a via tópica tem se tornado cada vez mais frequente, pois, esse sistema permite a incorporação do ativo com baixa solubilidade, como no caso dos FSs. Além disso, os efeitos oclusivos exercido pelo CLN tendem a melhorar a hidratação da pele, promovendo a penetração do insumo farmacêutico ativo. Os componentes do CLN, incluindo lipídios e tensoativos, são determinantes para promover sistemas nanoesturados em escala manométrica e mais estável, assim, podendo atuar como intensificadores de permeação em bicamadas lipídicas do estrato córneo (EC) (BELOQUI et al., 2016; KHOSA; REDDI; SAHA, 2018; SHARMA; BALDI, 2018).

Nesse contexto, os pesquisadores Kamel e colaboradores, (2019), desenvolveram e caracterizaram CLN com objetivo de obter sistemas em escala nanométrica, para aplicação tópica de curcumina, nesse caso, o tamanho da partícula das formulações de CNL estavam abaixo 200 nm, PdI de 0,29 e Pz $-47,50$ mV, demonstrando que o tamanho das partículas foram estáveis para a realização estudo.

Qidwai et al., (2016), realizou um estudo analisando o tamanho médio das partículas de CLN com incorporação de ácido 5-aminilevuínico (5-ALA), o resultados referentes ao diâmetro médio de CLN-5-ALA, foi entre $185,2 \pm 1,20$ e PdI $0,156 \pm 0,02$. O estudo foi realizado para avaliação da permeabilidade de um sistema tópico para tratamento de carcinoma basocelular.

Um estudo realizado por Almeida et al., (2018), demonstrou propriedades do tamanho das partículas de CLN carregadas com FC para análise de permeação cutânea na pele. O diâmetro médio das partículas foi inferior a $205,9 \pm 22,7$ nm, PDI de $0,47 \pm 0,04$ e Pz de $-69,1 \pm 18,5$ mV, respectivamente, este estudo forneceu evidências de estabilidade *in vitro e in vivo* de CLN-FC com a aplicação da TFD. Estas características puderam ser corroboradas nos ensaios de estabilidade, realizado neste trabalho, indicando ser promissores para aplicações tópicas frente a utilização de TFD.

A partir disso, pode-se identificar que as formulações apresentaram estabilidade física quando avaliadas ao longo dos 90 dias. Mediante a isto, o Pz, é um parâmetro importante para o monitoramento da estabilidade de formulações, o que demonstrou estabilidade das formulações. É importante ressaltar que para a estabilidade ser avaliada é necessário levar em consideração fatores como composição da formulação, propriedades físico-químicas e composição química, entretanto, parâmetros como D.mn. PDI e Pz fornecem indícios a respeito do estado físico-químico da formulação (ALVAREZ-LORENZO; GARCÍA-GONZÁLEZ; CONCHEIRO, 2017; RETAMAL MARÍN; BABICK; HILLEMANN, 2017).

5.3 Eficiência de Encapsulação %EE

A eficiência de encapsulação %EE é uma medida usada para avaliar a capacidade que o sistema possui em reter o composto ativo encapsulado (DAS et al., 2011; MITRI et al., 2011; MÜLLER et al., 2007). Através da %EE foi possível verificar a porcentagem do FC inserido no CLN, sendo o valor obtido para EE de $75,57\% \pm 0,58$. A %EE da formulação é expressa na Tabela 3.

Tabela 3- Resultado da eficiência de encapsulação (%EE) do CLN.

Formulação	%EE
CLN-FC	$75,57\% \pm 0,58$

Valor expresso em média e desvio padrão (n=3).

Neste contexto, considera-se um valor alto de %EE segundo a literatura. De acordo com os autores Oshiro-Junior et al., (2020), a %EE de CLN-FC correspondeu a $63,00 \pm 1,19\%$. Em outro estudo realizado por Almeida et al., (2018), observou-se que 88,2% do ativo foi encapsulado no CLN, indicando que a maior parte da FC está incorporada no sistema nanoestruturado, evitando assim a agregação.

Desse modo, estes resultados podem ser explicados mediante as vantagens dos CLN, devido a formação de cristais imperfeitos na rede cristalina da matriz lipídica sólida quando a mistura de lipídios líquidos, o que por sua vez, permite deixar espaço suficiente para acomodar moléculas do ativo, o que conduz a uma melhor capacidade de eficiência de encapsulamento e consequentemente reduz o tempo de expulsão do ativo (SHARMA; BALDI, 2018). Comparando esse valor com outros sistemas nanoestruturados desenvolvidos com FC, observou-se que a eficiência de encapsulação CLN foi maior do que quando encapsulado em lipossomas com EE máxima de 45% (ABDEL FADEEL et al., 2018).

Um pré-requisito para obter uma alta capacidade de encapsulação é alta solubilidade do ativo no lipídio fundido (MÜLLER; RADTKE; WISSING, 2002b). Além disso, estudo de revisão realizado por Bunjes, (2011), mostra que a capacidade de incorporação depende das propriedades físico-químicas do fármaco, bem como da composição da matriz lipídica do estado cristalino.

5.4 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

A microscopia eletrônica de transmissão (MET) foi realizada para obter informações sobre o tamanho de partícula e morfologia, através da técnica é possível confirmar a obtenção de partículas em nanoescala.

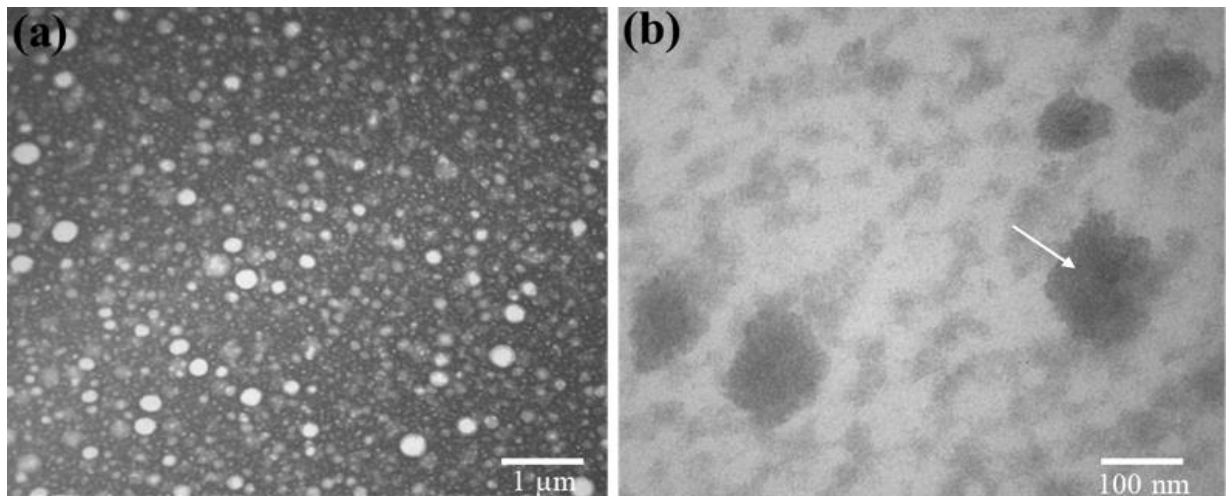
As fotomicrografias obtidas por MET das amostras de CLN e CLN-FC encontra-se apresentadas na Figura 13 A e 13 B. Os sistemas nanoestruturados apresentaram estruturas predominantemente esféricas. Além disso, morfologia semelhante foi observada na produção de CLN por outros pesquisadores (EL-SHERIDY et al., 2019; JAIN et al., 2010). O tamanho das partículas variou em torno de 30 a 300 nm, respectivamente, além do mais, a adição do PF-127, previne a aglomeração destas nanopartículas, aumentando a estabilidade, e esses resultados corroboram com os dados obtidos por DLS.

Destaca-se o aumento do tamanho das CLN com a incorporação da FC na formulação, comparando-se os CLN, também é possível observar um contraste escuro do CLN com a incorporação do ativo, isso ocorre devido ao metal presente da FC, e isto é decorrente pois q FC possui hidrofobicidade e consequentemente estaria disperso nos cristais imperfeitos da matriz lipídica (Figura 13 B).

Os resultados encontrados, conferem com o trabalho de Mo et al., (2018), na qual realizaram a análise de CLN, e verificaram que a morfologia das partículas encontrava-se de forma esférica e regular, e com dimensões nanométricas de 150 nm. Estudo realizado por

Oshiro-Junior et al., (2020), corroborou com dados referente as imagens obtidas no estudo, sendo identificado a incorporação da FC no CLN, mediante o contraste escuro do metal presente da FC. Estes resultados estão de acordo com os dados obtidos para sistemas nanoestruturados preparados neste presente trabalho.

Figura 13- Fotomicroscopia dos sistemas nanoestruturados, (a) CLN) e (b) CLN-FC, aumento 50.000x, 370.000x, respectivamente. A seta indica um contraste escuro do CLN provavelmente referente a FC nanoencapsulado.



Fonte: dados da pesquisa.

5.5 Calorimetria exploratória diferencial

O DSC foi utilizado para obter informações sobre cristalinidade, temperatura de fusão e entalpia dos sistemas nanoestruturados e seus componentes com o objetivo de encontrar informações sobre a estruturas das partículas, visto que alterações estruturais são acompanhadas por trocas de calor (FACHINETTI et al., 2018; FONSECA-SANTOS et al., 2019). Por este motivo os sistemas nanoestruturados foram submetidos a análise calorimétrica. Os componentes das formulações foram avaliados isoladamente, a fim de compreender as características de cada um e sua influência sobre os sistemas nanoestruturados, conforme descrito na Figura 14 e Tabela 4, respectivamente.

A FC não apresentou evento de fusão na faixa de temperatura adotada. De acordo com o dado apresentado na ficha de informação do produto fornecido pela a empresa Sigma Aldrich, seu ponto de fusão está acima de 300°C, por essa razão não foi possível observar tal evento. O TGACC apresentou um evento endotérmico ($T_{\text{pico}} = -3,84 \text{ } ^\circ\text{C}$ e $\Delta H = 137,69 \text{ J/g}$) característico do lipídeo (ALFUTIMIE et al., 2016). O PF-127 apresentou apenas um evento endotérmico

($T_{\text{pico}} = 63,42 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e $\Delta H = 122 \text{ J/g}$) referente à fusão do tensoativo (ARANGO-RUIZ et al., 2018). A curva calorimétrica do EP mostrou um evento endotérmico ($T_{\text{pico}} = 52,87 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e $\Delta H = 315,38 \text{ J/g}$) relativo à fusão desse lipídeo, este resultado correspondo com os encontrados na literatura, $38 \text{ }^{\circ}\text{C}$ (MALKIN, 2006) e $52,45 \text{ }^{\circ}\text{C}$ (SATO et al., 2017), Esta pequena diferença pode ser devido ao rearranjo na estrutura cristalina resultando formas polimórficas mais estáveis ou menos estáveis (DA SILVA; ESCOBEDO; GIOELLI, 2008). O OR não apresentou eventos térmicos na faixa de temperatura estudada devido ao seu comportamento amorfo (JAMIL et al., 2011).

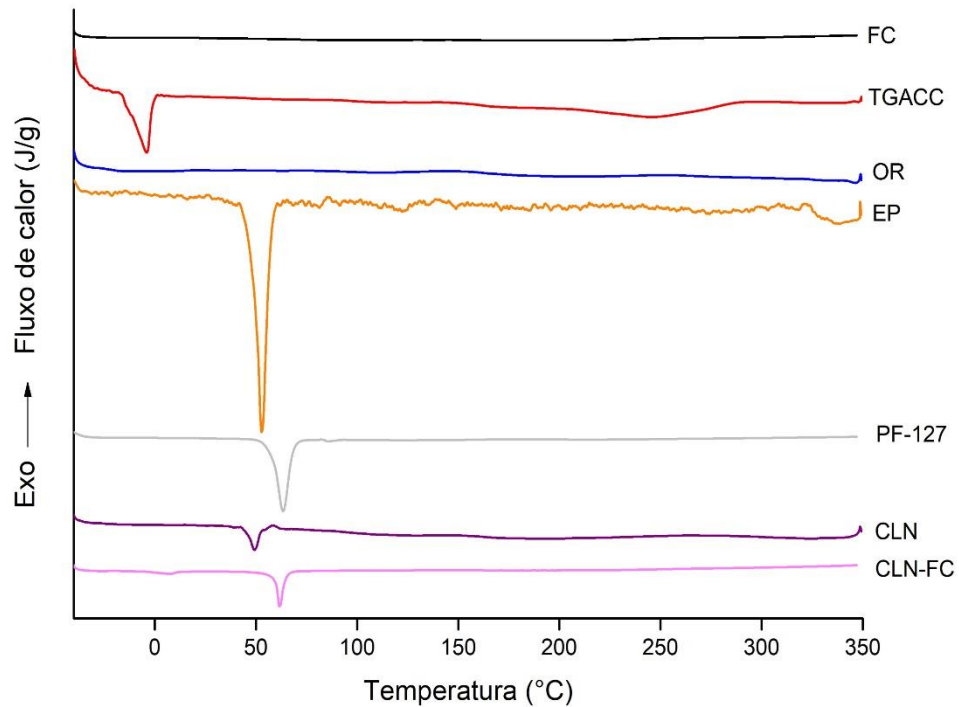
Tabela 4- Temperatura de pico (T_{pico}) e variação de entalpia (ΔH) dos eventos de fusão das amostras.

Amostras	Tpico ($^{\circ}\text{C}$)	ΔH (J/g)
TGACC	-3,84	137,69
EP	52,87	315,38
PF-127	63,42	122,00
CLN	49,38	44,26
CLN-FC	61,81	56,07

Fonte: dados da pesquisa.

A amostras CLN e CLN-FC apresentaram comportamento térmico semelhante. Ambas as amostras apresentaram um evento endotérmico característico de fusão com T_{pico} de 49,38 e 61,81 $^{\circ}\text{C}$ com ΔH de 44,26 e 56,07 para as amostras CLN e CLN-FC. A diferença nos parâmetros dessas amostras é devido à dissolução e distribuição do fármaco na matriz lipídica na amostra CLN-FC, que alterou a organização cristalina do sistema nanoestruturado e refletiu no aumento da temperatura e energia necessárias para ocorrer a fusão. Esses mesmos parâmetros sofreram diminuição no CLN em relação ao EP e é justificada pela presença dos demais componentes, que provocou mudanças estruturais no sistema nanoestruturado, deixando-o mais amorfo. O menor tamanho de partícula e maior área superficial também podem explicar essa diferença (FANG; A. AL-SUWAYEH; FANG, 2012).

Figura 14- Curva calorimétricas das amostras.



Fonte: dados da pesquisa.

Os dados de fusão dos sistemas nanoestruturados entram em consenso com o uso como sistemas de liberação, visto que em sistemas coloidais para uso *in vivo*, lipídeos que possuem temperaturas de fusão acima de 40°C são desejáveis, pois evita a fusão das partículas após a administração (SEVERINO et al., 2012).

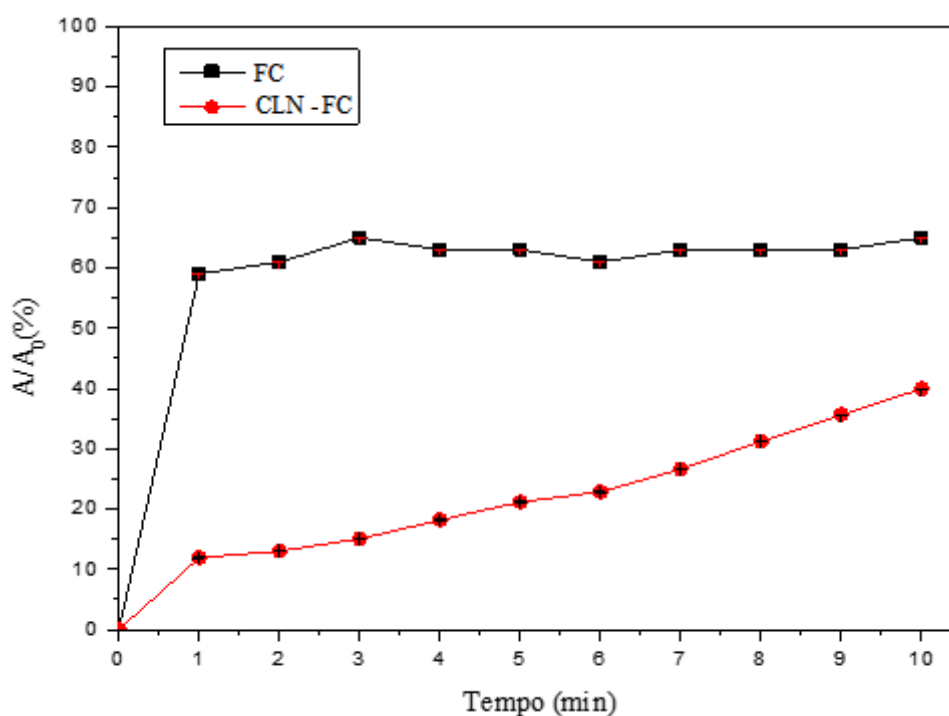
5.6 Estudo de fotodegradação (*Photobleaching*)

A fotoestabilidade, ou seja, a resistência a *Photobleaching*, consiste na capacidade de um fotossensibilizador gerar espécies reativas de oxigênio (EROs), das quais são fundamentais para reação fotodinâmica (LAMCH et al., 2019). Os FSs são foto-degradados rapidamente, podendo prejudicar a destruição do tecido doente, levando assim ao tratamento incompleto e reduzindo a fotossensibilidade após irradiação (DE SOUZA et al., 2016). Pesquisadores também demonstram que a extensão da fotodegradação do FS também está correlacionada com a intensidade do dano fotobiológico (CYZA et al., 2018; LAMCH et al., 2019). Desse modo, as FC são vulneráveis à fotodegradação que envolve a perda de absorbância, fluorescência e fotoatividade, e por esse motivo a utilização de sistemas nanoestruturados no encapsulamento

pode minimizar de maneira eficaz essas desvantagens (FANCHIOTTI et al., 2016; KUZNETSOVA; KALIYA, 2012).

Assim, ao investigar a possível degradação da FC após irradiação da luz se torna importante a fim de garantir o sucesso da terapia fotodinâmica. Como mostra a Figura 15, após 2 minutos de irradiação ocorreu uma diminuição no *Photobleaching* da FC com valor de $61\% \pm 0,001$, porém, esse valor se manteve estável. Contudo, o FS incorporado no CLN demonstrou-se durante os 10 minutos de irradiação um aumento na taxa do *Photobleaching* de $39,9\% \pm 0,02$. Assim, o encapsulamento da FC em CLN aumentou a sua fotoestabilidade.

Figura 15- Porcentagem de FC e CLN-FC por vários intervalos de tempo de irradiação (0,1,2,3,4,5,6,7,8,9 e 10 minutos).



Fonte: dados da pesquisa.

Esse efeito protetor exercido por formulações também foi relatado por Lin et al., (2012), que desenvolveram nanopartículas lipídicas (NLs) para incorporação de FC. Os pesquisadores relataram que a FC incorporada em NLs permaneceu intacta e estável durante o tempo de irradiação com obtenção de *photobleaching* de 3,08%, o que é possível, devido ao efeito de proteção das NLs, enquanto que a FC livre em solução aquosa obteve 4,12 % de *photobleaching*, sendo rapidamente degradada (LIN et al., 2012). Em outro estudo, Lima et al., (2013), fizeram *photobleaching* de hipericina livre e encapsulada em NLS, obtendo $37,6 \pm 3\%$

de *photobleaching* livre e $18,5 \pm 0,2$ % de *photobleaching* em NLS com irradiação de 40 minutos (LIMA et al., 2013).

A melhoria da foto-estabilidade da FC, indica que este fica mais protegido da fotodegradação quando está incorporado em matriz lipídica do CLN. Portanto o encapsulamento da FC em sistemas nanoestruturados apresentou um grande potencial para melhorar a fotoestabilidade da FC (FANCHIOTTI et al., 2016). Diante disto, esses efeitos são de grande importância para o desempenho terapêutico clínico da FC na TFD.

5.7 Geração de oxigênio singleto em sistemas livres de célula (SOSG)

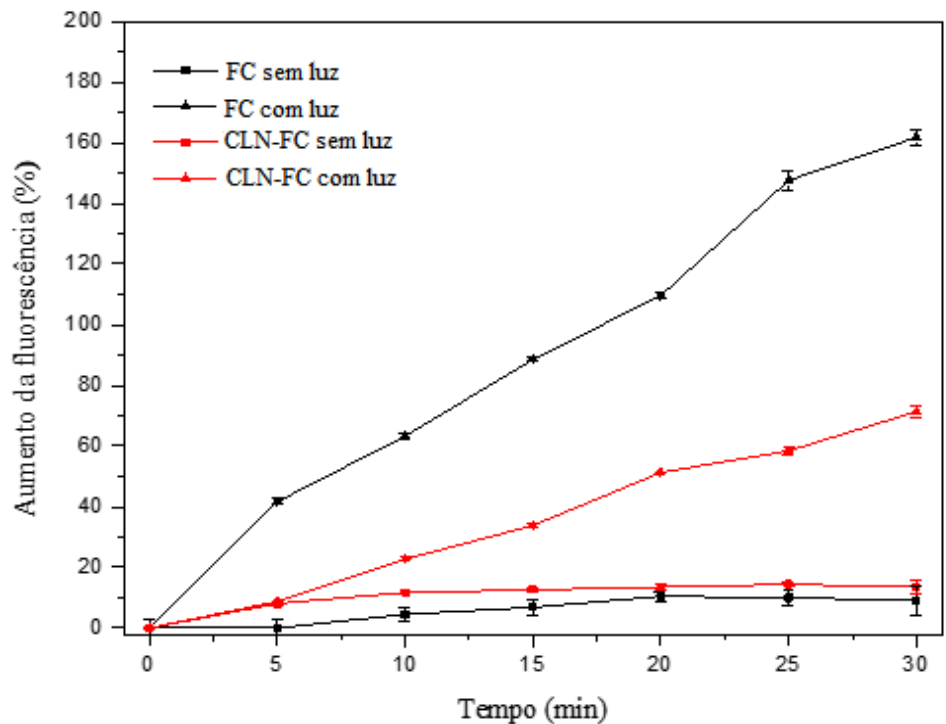
O oxigênio singleto (1O_2) é uma espécie reativa de oxigênio, podendo danificar componentes celulares biológicos, como, lipídios, proteínas ou ácidos nucleicos (LIU et al., 2019; PRASAD; SEDLÁŘOVÁ; POSPÍŠIL, 2018; RAGÀS et al., 2009). Utilizado propositalmente para TFD e seu papel como mensageiro biológico está sendo cada vez mais usufruído. Contudo a produção do oxigênio singleto pode ser estimada por ensaios de SOSG (PRASAD; SEDLÁŘOVÁ; POSPÍŠIL, 2018).

O SOSG exibe picos fracos de fluorescência no azul em 395 e 416 nm sob excitação em 372 e 393 nm (FLORS et al., 2006). No entanto, na presença de 1O_2 , o SOSG emite fluorescência verde, com máximos de excitação e emissão a 504 e 525 nm, respectivamente. Essa emissão de fluorescência verde foi atribuída a um endoperóxido gerado pela interação de 1O_2 com o componente antraceno do SOSG (FLORS et al., 2006; KOH; FLUHR, 2016; RAGÀS et al., 2009). Assim, os resultados da taxa do percentual de SOSG para avaliar possíveis modificações na produção do 1O_2 da FC com CLN e da FC livre em relação a FC e CLN sem a presença de luz são demonstrados na Figura 16.

A FC com luz, produziu um aumento gradual no percentual na emissão de SOSG durante 30 minutos de irradiação, sendo que a produção do 1O_2 foi bastante eficiente (Figura 16). Este resultado foi corroborado com os dados obtidos por Pucelik et al., (2016), na qual o resultado demonstrou alto rendimento quântico da FC após a exposição de fluorescência por SOSG (PUCELIK et al., 2016).

No entanto, não há evidência da reação química entre FC e o CLN sem a presença de irradiação (luz) e com a interação de SOSG, pois os espectros intrínsecos são inalterados (Figura 16). Apesar disto, estes dados estão em concordância com os resultados obtidos por (LIN et al., 2013).

Figura 16- Aumento da porcentagem de intensidade de fluorescência de SOSG para as amostras dos seguintes grupos: (I) FC livre, (II) FC livre + luz, (III) CLN-FC e (IV) CLN-FC + luz.



Fonte: dados da pesquisa.

Foi possível observar que a produção de $^1\text{O}_2$ da FC diminuiu após sua incorporação no CLN (Figura 16), isso ocorre devido a distribuição da FC no CLN, pois, a concentração local na matriz lipídica pode aumentar, a vista disto, as colisões das moléculas da FC entre si, pode ocasionar uma supressão de moléculas no estado excitado (NAVARRO et al., 2014; PRESS, 2017). Uma outra possível explicação se dá pelo fato de que o $^1\text{O}_2$ gerado dentro no sistema nanoestruturado pode rapidamente se difundir para outras regiões do sistema e ser suprimido e gerar espécies reativas secundárias (DOU et al., 2015; ROSLANIEC et al., 2000).

Além disso, uma outra possibilidade é o que a FC dentro da matriz lipídica é protegida da luz, e deste modo não gera $^1\text{O}_2$, e isso pode ser corroborado com os dados obtidos por *Photobleaching*, mostrando que a FC com CLN não é degradado, pois, está protegido e não é liberado rapidamente. No entanto, esse resultado está de acordo com a literatura utilizando sistemas nanoestruturados (GARCIA et al., 2011; ZHEN et al., 2013). Porém, os resultados continuam sendo suficientes para ativar os processos de produção de $^1\text{O}_2$ na TFD.

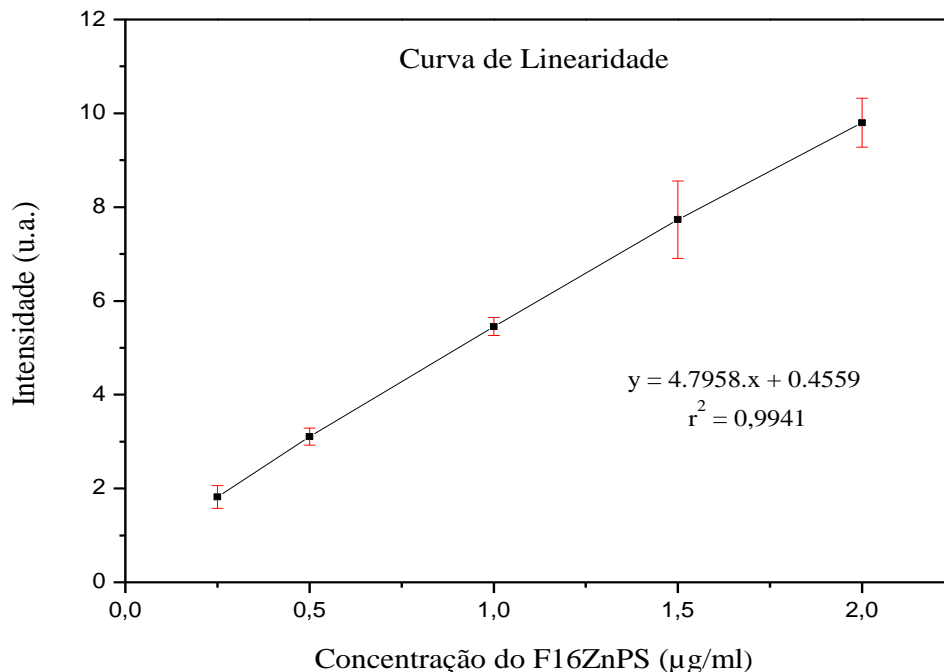
5.8 Linearidade

A linearidade de um método analítico pode ser definida como a capacidade de obter resultados experimentais de absorção diretamente proporcionais a concentração do analito (AGENCY, 2011)

De acordo com o resultado apresentado na Figura 17, a linearidade do método de quantificação da FC foi determinada através da regressão linear da curva analítica pela equação dos mínimos quadrados onde $y = (4.7958 + 0.4559)$ e o coeficiente $r^2 = 0,9941$ (figura 17).

Assim, o método mostrou-se linear nas concentrações de 0,25, 0,50, 1, 1,5, 2,0 $\mu\text{g/mL}$, sendo analisadas de acordo com o preconizado pela RDC N° 166, 24/07/2017 (BRASIL, 2017) desse modo, o critério mínimo aceitável do coeficiente de determinação (r^2) deve ser igual 0,99, indicando linearidade para o método desenvolvido.

Figura 17- Representação gráfica da curva analítica da FC na faixa de concentração de 0,25 a 2,0 $\mu\text{g/mL}$; n= 3.



Fonte: dados da pesquisa.

5.9 Liberação *in vitro*

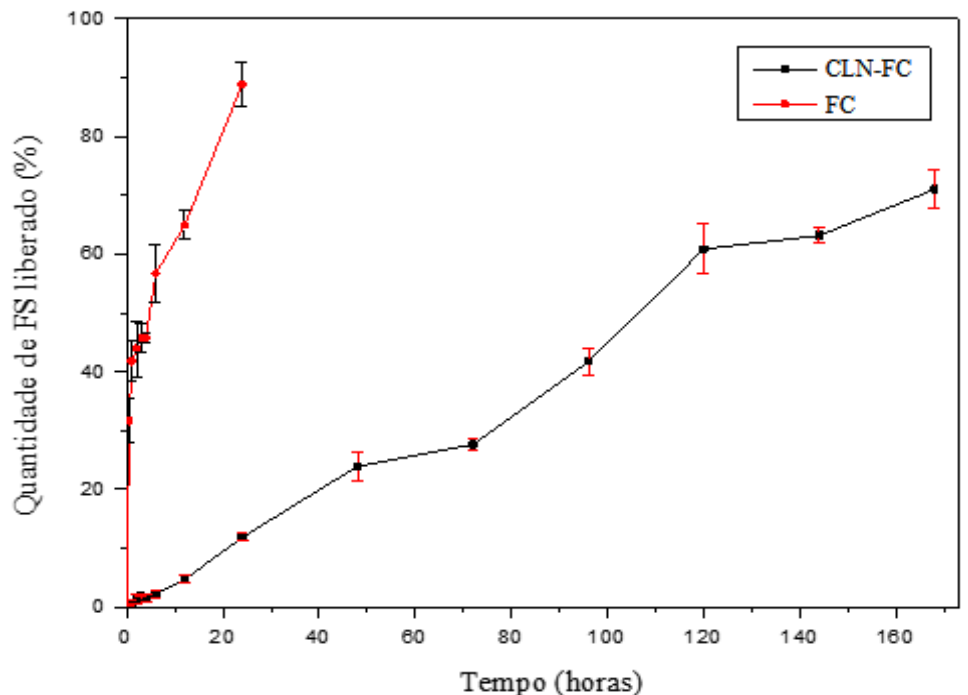
O perfil de liberação *in vitro* foi determinado através do estudo realizado em béquer utilizando membranas de dialise como descrito no item 4.2.2.7. A avaliação da liberação *in*

in vitro das formulações permite analisar o perfil de liberação do insumo farmacêutico ativo, isto pode estar relacionado com a saída do mesmo da matriz dos sistemas nanoestruturados. Permite ainda comparar a capacidade de diferentes amostras de reter o fármaco incorporado, durante um tempo mais longo (BEBER et al., 2014).

O perfil de liberação *in vitro* da FC e CLN-FC após 160 horas, desenvolvidos neste trabalho, foram investigadas experimentalmente, e são demonstrados na Figura 18. Para o CLN carregados com FC o perfil de liberação foi mais prolongado, sendo que ao nas primeiras 24h de análise houve liberação de pouco mais de 15% da quantidade do insumo farmacêutico ativo total. É importante ressaltar que ao longo das 160 h de ensaio 70% da quantidade do insumo farmacêutico ativo total foi liberado.

No entanto, para a FC, o perfil de liberação mostrou-se bastante diferenciado daquele obtido para os CLN-FC. Nas primeiras 24h de ensaio aproximadamente 90% da quantidade total do insumo farmacêutico ativo foi liberada para o meio externo.

Figura 18- Perfil de liberação *in vitro* de FC e CLN-FC.



Fonte: dados da pesquisa.

Alguns trabalhos da literatura relatam uma liberação mais controlada do insumo farmacêutico ativo quando encapsulado em CLN, em comparação da sua forma livre (LV et al., 2016; OLIVEIRA et al., 2016; RAHMAN; ZIDAN; KHAN, 2010; SHAO et al., 2015). Tal fato se dá, pois quando o insumo farmacêutico ativo está na sua forma livre, a liberação pode ocorrer

essencialmente por simples mecanismo de difusão da fração livre no saco de diálise para o meio receptor. Porém, quando o insumo farmacêutico ativo está encapsulado, é necessário um mecanismo que o libere da nanoestrutura, tais como, erosão, desintegração ou desadsorção (RAHMAN et al., 2014), este processo permite que a liberação seja mais lenta, diferentemente da solução do insumo farmacêutico ativo livre (VAGHASIYA; KUMAR; SAWANT, 2013).

Dessa forma, para avaliar o mecanismo de liberação da FC pelo CLN, diferentes modelos matemáticos como, ordem zero, primeira ordem, Higuchi e weibull, foram utilizados, conforme descrito na Tabela 5. O modelo que apresentou coeficiente de correlação (R^2) mais próximo de 1 foi o escolhido para representar tal sistema.

Tabela 5- Análise de cinética de liberação de FC incorporados em CLN por diferentes modelos de liberação *in vitro*, em termos de coeficiente de regressão linear (R^2).

Sistema	Modelo (R^2)			
	Ordem Zero	Primeira ordem	Higuchi	Weibull
CLN-FC	0,9886	0,9773	0,8967	0,9888

Fonte: dados da pesquisa.

Foi observado que o melhor modelo que apresentou maior coeficiente de correlação, foi o de Weibull ($R^2=0,9888$) e de ordem zero ($R^2=0,9886$), apresentando o melhor ajuste. Assim, ambos foram utilizados para descrever o perfil de liberação de CLN-FC. Os outros modelos aplicados aos dados como primeira ordem e Higuchi, não mostraram vantagens, quanto ao ajuste dos dados experimentais.

A equação empírica de Weibull pode ser aplicado para processo de dissolução/liberação. Esse modelo descreve a fração cumulativa de fármaco na solução ao tempo, sendo que o logaritmo da quantidade de fármaco dissolvido versus o logaritmo do tempo será linear, e deve ser aplicado aos dados dos primeiros 63,2% de liberação (SAMAH; SHEHAYEB; KYRIACOS, 2009). Valores de $b < 1$ caracterizam mecanismo de difusão fickiana. Valores de b no intervalo de 0,75 e 1 estão relacionados com difusão fickiana. Enquanto que para valores de $b > 1$ a curva exibe forma sigmoideal e o processo de liberação não é explicado pela difusão de Fick (KOSMIDIS; ARGYRAKIS; MACHERAS, 2003; PAPADOPOULOU et al., 2006). Os autores Papadopoulou et al. (2006), mencionam esse processo como “mecanismo mais complexo” identificando que esse comportamento é frequente em fármacos hidrofóbicos, onde os aspectos de solubilidade são relevantes na cinética de liberação (PAPADOPOULOU et al., 2006). Dessa maneira, a cinética de Weibull possibilita caracterizar o modo de liberação do

fármaco, assim, os resultados indicam a ocorrência de mecanismo complexo de liberação, associando simultaneamente a erosão do polímero durante liberação do fármaco e relaxamento das cadeias poliméricas (RIGON et al., 2019).

A cinética de ordem zero tem como base a liberação lenta da substância, pois, a matriz não desagrega e libera lentamente o fármaco, descrevendo a liberação de fármacos com baixa solubilidade e K_0 constante, sendo considerado o método ideal para obter ação farmacológica prolongada, uma vez que avalia a liberação de quantidades iguais de fármaco por unidade de tempo (DASH et al., 2010; SAMAHA; SHEHAYEB; KYRIACOS, 2009).

Dessa maneira, os dados sugerem que há uma liberação controlada do FC quando encapsulada em CLN, pois, comparando-se os dois perfis de liberação pode-se compreender que as moléculas de FC estão dispersas ao longo da matriz lipídica do carreador, visto que os CLN são compostos por lipídios sólidos e líquidos (óleos), além de tensoativos, formando então cristais imperfeitos, assim, resultando em maior incorporação do fármaco, possibilitando uma liberação mais lenta e controlada (DAS; NG; TAN, 2012; OSHIRO-JUNIOR et al., 2020; PUGLIA et al., 2017).

O perfil de liberação sustentado como apresentado pelos sistemas nanoestruturados é desejável, visto que a formulação visa atuar como reservatório do fármaco para aplicações na TFD (EH et al., 2019; GABA et al., 2015; JANSOOK; FÜLÖP; RITTHIDEJ, 2019). Por conseguinte, a formulação de CLN-FC apresenta características de liberação adequadas para o objetivo proposto deste trabalho, possibilitando assim a diminuição da necessidade de replicação da formulação.

6 CONCLUSÕES

Neste trabalho, foi possível desenvolver e caracterizar carreador lipídico nanoestruturado (CLN) contendo ftalocianina (FC). Os CLN e CLN-FC preparados neste estudo pelo método de fusão-emulsificação, apresentaram tamanho inferior 200 nm, baixo índice de polidispersão ($<0,3$) e potencial zeta negativo e foram estáveis durante os 90 dias de armazenamento. Ademais, apresentaram morfologia esférica mediante microscopia eletrônica de transmissão.

Os CLN-FC apresentaram eficiência de encapsulação de 75%, indicando alta encapsulação do fármaco pelo sistema. Esses resultados também evidenciaram ótimas propriedades para encapsulação de fármacos lipofílicos, possibilitando maior acomodação da FC. Curvas de DSC confirmaram a obtenção de um sistema com características físico-químicas próprias sem incompatibilidade entre FC e CLN.

Além disso, foi observado que a incorporação da FC em CLN provocou um aumento da foto-estabilidade indicando que a FC fica mais protegido do *Photobleaching* quando está incorporado em uma matriz lipídica, esses resultados foram corroborados com os dados obtidos por SOSG, mostrando-se que CLN-FS não é degradado, gerando então $^1\text{O}_2$ suficiente para TFD.

Os resultados de liberação *in vitro* mostrou que os CLN-FS apresentaram cinética de liberação segundo o modelo matemático Weibull. e de ordem zero. Assim, pode-se concluir que os carreadores lipídicos nanoestruturados constituem um bom sistema para melhorar a entrega de ftalocianina.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Algumas sugestões que se pode apontar para trabalhos futuros:

- Estudos de ampliação de escala da produção das sistema CLN contendo FC.
- Avaliação da atividade *in vitro* e *in vivo* das formulações contendo CLN-FC associadas a terapia fotodinâmica para aplicação tópica.

REFERÊNCIAS

- ABDEL FADEEL, D. et al. Improved photodynamic efficacy of thiophenyl sulfonated zinc phthalocyanine loaded in lipid nano-carriers for hepatocellular carcinoma cancer cells. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, Amsterdam, v. 23, n. March, p. 25–31, 2018.
- ABRAHAMSE, H.; HAMBLIN, M. R. New photosensitizers for photodynamic therapy. **Biochemical Journal**, London, v. 473, n. 4, p. 347–364, 2016.
- AGENCY, E. M. European Medicines Agency: An unacceptable choice. **Prescrire International**, Paris, v. 20, n. 121, p. 278, 2011.
- AGOSTINIS P, BERG K, CENGEL K., ET AL. Republic of Yemen Ministry of Public Health and Population Nutrition and Mortality Survey Report Ibb Governorate , Yemen. **Ca Cancer J Clin**, New York, v. 61, n. April, p. 250–281, 2017.
- ALFUTIMIE, A. et al. The Effect of monoglycerides on the crystallisation of triglyceride. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, Amsterdam, v. 494, p. 170–179, 2016.
- ALLEN, C. M.; SHARMAN, W. M.; VAN LIER, J. E. Current status of phthalocyanines in the photodynamic therapy of cancer. **Journal of Porphyrins and Phthalocyanines**, New York, v. 5, n. 2, p. 161–169, 2001.
- ALLISON, R. R. et al. Photosensitizers in clinical PDT. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, Amsterdam, v. 1, n. 1, p. 27–42, 2004.
- ALMEIDA, E. D. P. et al. Preparation and characterization of chloroaluminum phthalocyanine-loaded solid lipid nanoparticles by thermal analysis and powder X-ray diffraction techniques. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, Budapest, v. 108, n. 1, p. 191–196, 2012.
- ALMEIDA, E. D. P. et al. Skin permeation, biocompatibility and antitumor effect of chloroaluminum phthalocyanine associated to oleic acid in lipid nanoparticles. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, Amsterdam, v. 24, p. 262–273, 2018.
- ALVAREZ-LORENZO, C.; GARCÍA-GONZÁLEZ, C. A.; CONCHEIRO, A. Cyclodextrins as versatile building blocks for regenerative medicine. **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v. 268, p. 269–281, 2017.
- AMEEDUZZAFAR et al. BBD-Based Development of Itraconazole Loaded Nanostructured Lipid Carrier for Topical Delivery: In Vitro Evaluation and Antimicrobial Assessment. **Journal of Pharmaceutical Innovation**, New York, 2020.
- ARANGO-RUIZ, Á. et al. Encapsulation of curcumin using supercritical antisolvent (SAS) technology to improve its stability and solubility in water. **Food Chemistry**, London, v. 258, n. October 2017, p. 156–163, 2018.
- ARSHAD, S. et al. S-Protected thiolated nanostructured lipid carriers exhibiting improved mucoadhesive properties. **International Journal of Pharmaceutics**, Oxford, v. 587, n. June, p. 119690, 2020.

ASFOUR, M. H.; KASSEM, A. A.; SALAMA, A. Topical nanostructured lipid carriers/inorganic sunscreen combination for alleviation of all-trans retinoic acid-induced photosensitivity: Box-Behnken design optimization, in vitro and in vivo evaluation. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, Amsterdam, v. 134, n. February, p. 219–232, 2019.

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

BAPTISTA, A. et al. Antimicrobial photodynamic therapy as a strategy to arrest enamel demineralization: A short-term study on incipient caries in a rat model. **Photochemistry and Photobiology**, New York, v. 88, n. 3, p. 584–589, 2012.

BEBER, T. C. et al. Submicron polymeric particles prepared by vibrational spray-drying: Semisolid formulation and skin penetration/permeation studies. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, New York, v. 88, n. 3, p. 602–613, 2014.

BELOQUI, A. et al. Nanostructured lipid carriers: Promising drug delivery systems for future clinics. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, Paris, v. 12, n. 1, p. 143–161, 2016.

BELOQUI, A. et al. Nanostructured lipid carriers as oral delivery systems for poorly soluble drugs. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, Paris, v. 42, p. 144–154, 2017.

BHATTACHARJEE, S. DLS and zeta potential - What they are and what they are not? **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v. 235, p. 337–351, 2016.

BIEL, M. A. et al. Reduction of endotracheal tube biofilms using antimicrobial photodynamic therapy. **Lasers in Surgery and Medicine**, New York, v. 43, n. 7, p. 586–590, 2011.

BRASIL. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC N° 166, de 25 de Julho de 2017. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, Brasília, v. 2017, p. 1–21, 2017.

BROWN, T. Design thinking. **Harvard Business Review**, Washington, v. 86, n. 6, p. 84–92, 2008.

BUNJES, H. Structural properties of solid lipid based colloidal drug delivery systems. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, Amsterdam, v. 16, n. 5, p. 405–411, 2011.

CALIXTO, G. M. F. et al. Chitosan-Based Drug Delivery Systems for Optimization of Photodynamic Therapy: a Review. **AAPS PharmSciTech**, Arlington, v. 20, n. 7, 2019.

CALIXTO, G. M. F.; GRUMEZESCU, A. M. Nanotechnology-based drug delivery systems for photodynamic therapy of cancer: A review. **Molecules**, New York, v. 21, n. 3, p. 1–18, 2016.

CALORI, I. R.; TEDESCO, A. C. Aluminum chloride phthalocyanine in MCF-7: Rationally accounting for state of aggregation of photosensitizers inside cells. **Dyes and Pigments**, Amsterdam, p. 107940, 2019.

CHU, B.; LIU, T. Characterization of nanoparticles by scattering techniques. **Journal of Nanoparticle Research**, Netherlands, v. 2, n. 1, p. 29–41, 2000.

CIEPLIK, F. et al. Antimicrobial photodynamic therapy—what we know and what we don't. **Critical Reviews in Microbiology**, Boca Raton, v. 44, n. 5, p. 571–589, 2018.

COHEN, D. K.; LEE, P. K. Photodynamic therapy for non-melanoma skin cancers. **Cancers**, London, v. 8, n. 10, 2016.

CORTÉS-ROJAS, D. F. Encapsulação de compostos bioativos de *Syzygium aromaticum* em carreadores lipídicos sólidos. p. 138, 2015.

CYZA, M. et al. Iodinated zinc phthalocyanine – The novel visible-light activated photosensitizer for efficient generation of singlet oxygen. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, Lausanne, v. 358, p. 265–273, 2018.

DAS NEVES, J.; SARMENTO, B. Precise engineering of dapivirine-loaded nanoparticles for the development of anti-HIV vaginal microbicides. **Acta Biomaterialia**, Amsterdam, v. 18, n. February, p. 77–87, 2015.

DAS, S. et al. Formulation design, preparation and physicochemical characterizations of solid lipid nanoparticles containing a hydrophobic drug: Effects of process variables. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, Amsterdam, v. 88, n. 1, p. 483–489, 2011.

DAS, S.; NG, W. K.; TAN, R. B. H. Are nanostructured lipid carriers (NLCs) better than solid lipid nanoparticles (SLNs): Development, characterizations and comparative evaluations of clotrimazole-loaded SLNs and NLCs? **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, Haslemere, v. 47, n. 1, p. 139–151, 2012.

DA SILVA, R. C.; ESCOBEDO, J. P.; GIOIELLI, L. A. Crystallization behavior of structured lipids by chemical interesterification of lard and soybean oil. *Quimica Nova*, v. 31, n. 2, p. 330–335, 2008.

DASH, S. et al. Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems. **Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research**, Warszawa, v. 67, n. 3, p. 217–223, 2010.

DE ANNUNZIO, S. R. et al. Chlorin, phthalocyanine, and porphyrin types derivatives in phototreatment of cutaneous manifestations: A review. **International Journal of Molecular Sciences**, Faisalabad, v. 20, n. 16, 2019.

DE OLIVEIRA DE SIQUEIRA, L. B. et al. Formulations based on solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) for cutaneous use: A review. **Nanotechnology**, New York, v. 28, n. 6, 2017.

DE PAULA, C. S. et al. Chloroaluminium phthalocyanine polymeric nanoparticles as photosensitisers: Photophysical and physicochemical characterisation, release and phototoxicity in vitro. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, Haslemere, v. 49, n. 3, p. 371–381, 2013.

DE SOUZA, T. D. et al. Evaluation of photodynamic activity, photostability and in vitro drug

release of zinc phthalocyanine-loaded nanocapsules. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, Haslemere, v. 83, p. 88–98, 2016.

DING, C.; LI, Z. A review of drug release mechanisms from nanocarrier systems. **Materials Science and Engineering C**, Stäfa, v. 76, p. 1440–1453, 2017.

DOS SANTOS RAMOS, M. A. et al. Nanotechnology-based drug delivery systems for control of microbial biofilms: A review. **International Journal of Nanomedicine**, London, v. 13, n. February, p. 1179–1213, 2018.

DOU, Q. Q. et al. Effective near-infrared photodynamic therapy assisted by upconversion nanoparticles conjugated with photosensitizers. **International Journal of Nanomedicine**, London, v. 10, p. 419–432, 2015.

DUCHI, S. et al. Development of near-infrared photoactivable phthalocyanine-loaded nanoparticles to kill tumor cells: An improved tool for photodynamic therapy of solid cancers. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, New York, v. 12, n. 7, p. 1885–1897, 2016.

DURMUŞ, M.; AHSEN, V. Water-soluble cationic gallium(III) and indium(III) phthalocyanines for photodynamic therapy. **Journal of Inorganic Biochemistry**, New York, v. 104, n. 3, p. 297–309, 2010.

DURMUŞ, M.; NYOKONG, T. Synthesis, photophysical and photochemical properties of tetra- and octa-substituted gallium and indium phthalocyanines. **Polyhedron**, Lake Geneva, v. 26, n. 13, p. 3323–3335, 2007.

EH, H. Y. H. et al. Sequential photodynamic therapy with phthalocyanine encapsulated chitosan-tripolyphosphate nanoparticles and flucytosine treatment against candida tropicalis. **Pharmaceutics**, London, v. 11, n. 1, 2019.

EL-SHERIDY, N. A. et al. Itraconazole lipid nanocapsules gel for dermatological applications: In vitro characteristics and treatment of induced cutaneous candidiasis. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, Amsterdam, v. 181, n. March, p. 623–631, 2019.

ELZOGHBY, A. O. Pharmaceutical nanotechnology in Egypt: Diverse applications and promising outcomes. **Nanomedicine**, Lake Geneva, v. 14, n. 6, p. 649–653, 2019.

ESCOBAR, P. et al. Photodynamic therapy using ultradeformable liposomes loaded with chlorine aluminum phthalocyanine against *L. (V.) braziliensis* experimental models. **Experimental Parasitology**, New York, v. 194, n. September, p. 45–52, 2018.

ESSAGHRAOUI, A. et al. Improved dermal delivery of cyclosporine a loaded in solid lipid nanoparticles. **Nanomaterials**, Berlin, v. 9, n. 9, 2019.

FACHINETTI, N. et al. Comparative Study of Glyceryl Behenate or Polyoxyethylene 40 Stearate-Based Lipid Carriers for Trans-Resveratrol Delivery: Development, Characterization and Evaluation of the In Vitro Tyrosinase Inhibition. **AAPS PharmSciTech**, Arlington, v. 19, n. 3, p. 1401–1409, 2018.

FADEL, M.; KASSAB, K.; ABDEL FADEEL, D. Zinc phthalocyanine-loaded PLGA biodegradable nanoparticles for photodynamic therapy in tumor-bearing mice. **Lasers in Medical Science**, Berlin, v. 25, n. 2, p. 283–292, 2010.

FANCHIOTTI, B. G. et al. The photobleaching of the free and encapsulated metallic phthalocyanine and its effect on the photooxidation of simple molecules. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, Lausanne, v. 165, p. 10–23, 2016.

FANG, C.-L.; A. AL-SUWAYEH, S.; FANG, J.-Y. Nanostructured Lipid Carriers (NLCs) for Drug Delivery and Targeting. **Recent Patents on Nanotechnology**, Oak Park, v. 7, n. 1, p. 41–55, 2012.

FANG, J. Y. et al. Lipid nanoparticles as vehicles for topical psoralen delivery: Solid lipid nanoparticles (SLN) versus nanostructured lipid carriers (NLC). **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, New York, v. 70, n. 2, p. 633–640, 2008.

FERNANDES, A.; DIAS, M. The microbiological profiles of infected prosthetic implants with an emphasis on the organisms which form biofilms. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, Delhi, v. 7, n. 2, p. 219–223, 2013.

FLORS, C. et al. Imaging the production of singlet oxygen in vivo using a new fluorescent sensor, Singlet Oxygen Sensor Green®. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 57, n. 8, p. 1725–1734, 2006.

FONSECA-SANTOS, B. et al. Formulating SLN and NLC as innovative drug delivery systems for non-invasive routes of drug administration. **Current medicinal chemistry**, Hilversum, p. 1–33, 2019.

FREIRE, F. et al. Photodynamic therapy of oral Candida infection in a mouse model. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, New York, v. 159, p. 161–168, 2016.

GABA, B. et al. Nanostructured lipid carrier system for topical delivery of terbinafine hydrochloride. **Bulletin of Faculty of Pharmacy, Cairo University**, Cairo, v. 53, n. 2, p. 147–159, 2015.

GANESAN, P.; NARAYANASAMY, D. Lipid nanoparticles: Different preparation techniques, characterization, hurdles, and strategies for the production of solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers for oral drug delivery. **Sustainable Chemistry and Pharmacy**, Amsterdam, v. 6, n. July, p. 37–56, 2017.

GARCÊS, A. et al. Formulations based on solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) for cutaneous use: A review. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, Amsterdam v. 112, n. November 2017, p. 159–167, 2018.

GARCIA, A. M. et al. Photophysical behaviour and photodynamic activity of zinc phthalocyanines associated to liposomes. **Photochemical and Photobiological Sciences**, London, v. 10, n. 4, p. 507–514, 2011.

GARG, A.; SINGH, S. Enhancement in antifungal activity of eugenol in immunosuppressed rats through lipid nanocarriers. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, Amsterdam, v. 87, n.

2, p. 280–288, 2011.

GESZKE-MORITZ, M.; MORITZ, M. Solid lipid nanoparticles as attractive drug vehicles: Composition, properties and therapeutic strategies. **Materials Science and Engineering C**, Washington, v. 68, p. 982–994, 2016.

GHATE, V. M. et al. Nanostructured lipid carriers for the topical delivery of tretinoin. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, Amsterdam, v. 108, p. 253–261, 2016.

GOMER, C. J. PRECLINICAL EXAMINATION OF FIRST and SECOND GENERATION PHOTOSENSITIZERS USED IN PHOTODYNAMIC THERAPY. **Photochemistry and Photobiology**, New York, v. 54, n. 6, p. 1093–1107, 1991.

GONZÁLEZ-MIRA, E. et al. Potential use of nanostructured lipid carriers for topical delivery of flurbiprofen. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, New Jersey, v. 100, n. 1, p. 242–251, 2011.

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

HAIDER, M. et al. Nanostructured Lipid Carriers for Delivery of Chemotherapeutics: A Review. **Pharmaceutics**, London, v. 12, n. 3, p. 288, 2020.

HONGCHARU, W. et al. Topical ALA-photodynamic therapy for the treatment of acne vulgaris. **Journal of Investigative Dermatology**, Oxford, v. 115, n. 2, p. 183–192, 2000.

HÖNIGSMANN, H. History of phototherapy in dermatology. **Photochemical and Photobiological Sciences**, London, v. 12, n. 1, p. 16–21, 2013.

HU, X. et al. Antimicrobial photodynamic therapy to control clinically relevant biofilm infections. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 9, n. JUN, p. 1–24, 2018.

ISSA, M. C. A.; MANELA-AZULAY, M. Terapia fotodinâmica: Revisão da literatura e documentação iconográfica. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 85, n. 4, p. 501–511, 2010.

JAIN, S. et al. Design and development of solid lipid nanoparticles for topical delivery of an anti-fungal agent. **Drug Delivery**, London, v. 17, n. 6, p. 443–451, 2010.

JAMIL, A. et al. Thermal properties of non-crystallizable oil-in-water highly concentrated emulsions. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, Amsterdam, v. 382, n. 1–3, p. 266–273, 2011.

JANSOOK, P.; FÜLÖP, Z.; RITTHIDEJ, G. C. Amphotericin B loaded solid lipid nanoparticles (SLNs) and nanostructured lipid carrier (NLCs): physicochemical and solid-solution state characterizations. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, Abingdon-on-Thames v. 45, n. 4, p. 560–567, 2019.

KAMEL, A. E.; FADEL, M.; LOUIS, D. Curcumin-loaded nanostructured lipid carriers prepared using peceolTM and olive oil in photodynamic therapy: Development and application in breast cancer cell line. **International Journal of Nanomedicine**, Babol, v. 14, p. 5073–5085, 2019.

KAMKAEW, A. et al. BODIPY dyes in photodynamic therapy. **Chemical Society Reviews**, London, v. 42, n. 1, p. 77–88, 2013.

KESSEL, D. Photodynamic Therapy: A Brief History. **Journal of Clinical Medicine**, Ivirne, v. 8, n. 10, p. 1581, 2019.

KHALIL, R. Formulation and Characterization of Nystatin-loaded Nanostructured Lipid Carriers for Topical Delivery against Cutaneous Candidiasis. **British Journal of Pharmaceutical Research**, London, v. 4, n. 4, p. 490–512, 2014.

KHOSA, A.; REDDI, S.; SAHA, R. N. Nanostructured lipid carriers for site-specific drug delivery. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, Amsterdam, v. 103, n. April, p. 598–613, 2018.

KHURANA, S.; BEDI, P. M. S.; JAIN, N. K. Preparation and evaluation of solid lipid nanoparticles based nanogel for dermal delivery of meloxicam. **Chemistry and Physics of Lipids**, Amsterdam, v. 175–176, p. 65–72, 2013.

KIM, T. W.; MOON, J. W.; YU, H. G. N-acetylcysteine protects against chorioretinal damage induced by photodynamic therapy for experimental choroidal neovascularization in a rat model. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, Amsterdam, v. 23, n. January, p. 12–17, 2018.

KOH, E.; FLUHR, R. Singlet oxygen detection in biological systems: Uses and limitations. **Plant Signaling and Behavior**, Berlin, v. 11, n. 7, p. 1–5, 2016.

KOSMIDIS, K.; ARGYRAKIS, P.; MACHERAS, P. A reappraisal of drug release laws using Monte Carlo simulations: The prevalence of the Weibull function. **Pharmaceutical Research**, Osaka, v. 20, n. 7, p. 988–995, 2003.

KOTAL, M.; BHOWMICK, A. K. Polymer nanocomposites from modified clays: Recent advances and challenges. **Progress in Polymer Science**, Tokyo, v. 51, p. 127–187, 2015.

KOVALCHUK, N. et al. Formation of stable clusters in colloidal suspensions. **Advances in Colloid and Interface Science**, Amsterdam, v. 147–148, n. C, p. 144–154, 2009.

KUMAR, S.; RANDHAWA, J. K. High melting lipid based approach for drug delivery: Solid lipid nanoparticles. **Materials Science and Engineering C**, Washington, v. 33, n. 4, p. 1842–1852, 2013a.

KUMAR, S.; RANDHAWA, J. K. Preparation and characterization of Paliperidone loaded solid lipid nanoparticles. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, Amsterdam, v. 102, p. 562–568, 2013b.

KURNIAWAN, A. et al. Biocompatibility and drug release behavior of curcumin conjugated gold nanoparticles from aminosilane-functionalized electrospun poly(N-vinyl-2-pyrrolidone)

fibers. **International Journal of Pharmaceutics**, Oxford, v. 516, n. 1–2, p. 158–169, 2017.

KUZNETSOVA, N. A.; KALIYA, O. L. Oxidative photobleaching of phthalocyanines in solution. **Journal of Porphyrins and Phthalocyanines**, New York, v. 16, n. 7–8, p. 705–712, 2012.

LAKHANI, P. et al. Optimization, stabilization, and characterization of amphotericin B loaded nanostructured lipid carriers for ocular drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 572, n. June, p. 118771, 2019.

LAMCH, Ł. et al. Folate-directed zinc (II) phthalocyanine loaded polymeric micelles engineered to generate reactive oxygen species for efficacious photodynamic therapy of cancer. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, Amsterdam, v. 25, n. January, p. 480–491, 2019.

LEME GOTO, P. Nanopartículas lipídicas sólidas e vesículas cataniônicas contendo ftalocianina de cloro alumínio aplicadas nos processos fotodinâmicos Nanopartículas lipídicas sólidas e vesículas cataniônicas contendo ftalocianina de cloro alumínio aplicadas nos process. 2016.

LI, X. et al. New application of phthalocyanine molecules: From photodynamic therapy to photothermal therapy by means of structural regulation rather than formation of aggregates. **Chemical Science**, Gaithersburg, v. 9, n. 8, p. 2098–2104, 2018.

LI, X. et al. Phthalocyanines as medicinal photosensitizers: Developments in the last five years. **Coordination Chemistry Reviews**, Amsterdam, v. 379, p. 147–160, 2019.

LIMA, A. M. et al. Hypericin encapsulated in solid lipid nanoparticles: Phototoxicity and photodynamic efficiency. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, New York, v. 125, p. 146–154, 2013.

LIN, H. et al. Feasibility Study on quantitative measurements of singlet oxygen generation using singlet oxygen sensor green. **Journal of Fluorescence**, v. 23, n. 1, p. 41–47, 2013.

LIN, R. et al. Characterization and photodynamic activity of a new phthalocyanine nanoparticles. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, New York v. 23, n. 7, p. 1629–1635, 2012.

LIU, H. et al. Singlet Oxygen Sensor Green is not a Suitable Probe for $^{1}O_2$ in the Presence of Ionizing Radiation. **Scientific Reports**, London, v. 9, n. 1, p. 1–8, 2019.

LOPES, C. M.; LOBO, J. M. S.; COSTA, P. Formas farmacêuticas de liberação modificada: polímeros hidrofílicos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 41, n. 2, p. 143–154, 2005.

LV, W. et al. Brucea javanica oil-loaded nanostructure lipid carriers (BJO NLCs): Preparation, characterization and in vitro evaluation. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, Amsterdam, v. 504, p. 312–319, 2016.

MALACARNE, M. C. et al. Photodynamic activity of new photosensitizers obtained from

5,10,15,20-tetrapentafluorophenylporphyrin. **Journal of Porphyrins and Phthalocyanines**, New York, v. 23, n. 9, p. 1047–1056, 2019.

MALKIN, R. **On site service factor works for minetec**. [s.l.: s.n.].

MANTAREVA, V. et al. Photodynamic inactivation of pathogenic species *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida albicans* with lutetium (III) acetate phthalocyanines and specific light irradiation. **Lasers in Medical Science**, Berlin, v. 31, n. 8, p. 1591–1598, 2016.

MD, S. et al. Lipid based nanocarriers system for topical delivery of photosensitizers. **Drug Discovery Today**, Amsterdam, v. 22, n. 8, p. 1274–1283, 2017.

MEISEL, P.; KOCHER, T. Photodynamic therapy for periodontal diseases: State of the art. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, Amsterdam, v. 79, n. 2, p. 159–170, 2005.

MILLER, J. D. et al. Photodynamic therapy with the phthalocyanine photosensitizer Pc 4: The case experience with preclinical mechanistic and early clinical-translational studies. **Toxicology and Applied Pharmacology**, New York, v. 224, n. 3, p. 290–299, 2007.

MITRI, K. et al. Lipid nanocarriers for dermal delivery of lutein: Preparation, characterization, stability and performance. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 414, n. 1–2, p. 267–275, 2011.

MO, Z. et al. Nanostructured lipid carriers-based thermosensitive eye drops for enhanced, sustained delivery of dexamethasone. **Nanomedicine**, Philadelphia, v. 13, n. 11, p. 1239–1253, 2018.

MORGADO, L. F. et al. Photodynamic Therapy treatment of onychomycosis with Aluminium-Phthalocyanine Chloride nanoemulsions: A proof of concept clinical trial. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, New York, v. 173, p. 266–270, 2017.

MUEHLMANN, A. L. et al. Aluminium-phthalocyanine chloride nanoemulsions for anticancer photodynamic therapy: Development and in vitro activity against monolayers and spheroids of human mammary adenocarcinoma MCF-7 cells. **Journal of Nanobiotechnology**, Madison, v. 13, n. 1, p. 1–11, 2015.

MÜLLER, R. H. et al. Nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic dermal products. **Advanced Drug Delivery Reviews**, New York, v. 59, n. 6, p. 522–530, 2007.

MÜLLER, R. H.; RADTKE, M.; WISSING, S. A. Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations. **Advanced Drug Delivery Reviews**, New York, v. 54, n. SUPPL., p. 131–155, 2002a.

MÜLLER, R. H.; RADTKE, M.; WISSING, S. A. Nanostructured lipid matrices for improved microencapsulation of drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 242, n. 1–2, p. 121–128, 2002b.

NASERI, N.; VALIZADEH, H.; ZAKERI-MILANI, P. Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers: Structure preparation and application. **Advanced**

Pharmaceutical Bulletin, Tabriz, v. 5, n. 3, p. 305–313, 2015.

NAVARRO, F. P. et al. Preparation and characterization of mTHPC-loaded solid lipid nanoparticles for photodynamic therapy. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, New York, v. 130, p. 161–169, 2014.

NESI-REIS, V. et al. Phototoxic effect of aluminium-chlorine and aluminium-hydroxide phthalocyanines on *Leishmania (L.) amazonensis*. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, Amsterdam, v. 21, p. 239–245, 2018.

OLIVEIRA, M. S. et al. α -Tocopherol succinate improves encapsulation and anticancer activity of doxorubicin loaded in solid lipid nanoparticles. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, Amsterdam, v. 140, p. 246–253, 2016.

OSHIRO-JUNIOR, J. A. et al. Phthalocyanine-loaded nanostructured lipid carriers functionalized with folic acid for photodynamic therapy. **Materials Science and Engineering C**, Washington, v. 108, n. July 2019, p. 110462, 2020.

OSIFEKO, O. L.; NYOKONG, T. Applications of lead phthalocyanines embedded in electrospun fibers for the photoinactivation of *Escherichia coli* in water. **Dyes and Pigments**, Amsterdam, v. 111, p. 8–15, 2014.

PAPADOPOULOU, V. et al. On the use of the Weibull function for the discernment of drug release mechanisms. **International Journal of Pharmaceutics**, Oxford, v. 309, n. 1–2, p. 44–50, 2006.

PARK, J. H. et al. Development of DH-I-180-3 loaded lipid nanoparticle for photodynamic therapy. **International Journal of Pharmaceutics**, Oxford, v. 491, n. 1–2, p. 393–401, 2015.

PARMEGGIANI, F. et al. Impact of methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism on the efficacy of photodynamic therapy in patients with neovascular age-related macular degeneration. **Scientific Reports**, London, v. 9, n. 1, p. 1–10, 2019.

PATRA, J. K. et al. Nano based drug delivery systems: Recent developments and future prospects 10 Technology 1007 Nanotechnology 03 Chemical Sciences 0306 Physical Chemistry (incl. Structural) 03 Chemical Sciences 0303 Macromolecular and Materials Chemistry 11 Medical and He. **Journal of Nanobiotechnology**, Madison, v. 16, n. 1, p. 1–33, 2018.

PINTO, J. G. et al. In vitro evaluation of photodynamic therapy using curcumin on *Leishmania major* and *Leishmania braziliensis*. **Lasers in Medical Science**, Godalming, v. 31, n. 5, p. 883–890, 2016.

PINTO, J. Q.; SOARES, C. P.; MITTMANN, J. Assessment of *leishmania major* and *leishmania braziliensis* promastigote viability after photodynamic treatment with aluminum phthalocyanine tetrasulfonate (ALPcS 4). **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, Botucatu, v. 17, n. 3, p. 300–307, 2011.

PIRES, V. G. A.; DE MOURA, M. R. Preparação De Novos Filmes Poliméricos Contendo Nanoemulsões Do Óleo De Melaleuca, Copaíba E Limão Para Aplicação Como Biomaterial

Preparation of New Nanocomposites Containing Nanoemulsions of Melaleuca, Copaíba and Lemon Oil for Application. **Quim. Nova**, São Paulo, v. 40, n. 1, p. 1–5, 2017.

PLAETZER, K. et al. Photophysics and photochemistry of photodynamic therapy: Fundamental aspects. **Lasers in Medical Science**, Godalming, v. 24, n. 2, p. 259–268, 2009.

POONIA, N. et al. Nanostructured lipid carriers: Versatile oral delivery vehicle. **Future Science OA**, London, v. 2, n. 3, 2016.

PRASAD, A.; SEDLÁŘOVÁ, M.; POSPÍŠIL, P. Singlet oxygen imaging using fluorescent probe Singlet Oxygen Sensor Green in photosynthetic organisms. **Scientific Reports**, Berlin, v. 8, n. 1, p. 1–13, 2018.

PRASAD, M. et al. Nanotherapeutics: An insight into healthcare and multi-dimensional applications in medical sector of the modern world. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, Amsterdam, v. 97, n. October 2017, p. 1521–1537, 2018.

PRESS, D. IJN-126553-light-triggered-liposomal-cargo-delivery-platform-incorporat. p. 969–977, 2017.

PRIYANKA, K.; ABDUL HASAN SATHALI, A. Preparation and evaluation of montelukast sodium loaded solid lipid nanoparticles. **Journal of Young Pharmacists**, Mumbai, v. 4, n. 3, p. 129–137, 2012.

PROW, T. W. et al. Nanoparticles and microparticles for skin drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, New York, v. 63, n. 6, p. 470–491, 2011.

PUCELIK, B. et al. **Fluorination of phthalocyanine substituents: Improved photoproperties and enhanced photodynamic efficacy after optimal micellar formulations**. [s.l.] Elsevier Ltd, 2016. v. 124

PUGLIA, C. et al. Nanostructured Lipid Carriers (NLC) as Vehicles for Topical Administration of Sesamol: In Vitro Percutaneous Absorption Study and Evaluation of Antioxidant Activity. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 83, n. 5, p. 398–404, 2017.

QIDWAI, A. et al. Nanostructured lipid carrier in photodynamic therapy for the treatment of basal-cell carcinoma. **Drug Delivery**, New York, v. 23, n. 4, p. 1476–1485, 2016.

RAGÀS, X. et al. Singlet oxygen photosensitisation by the fluorescent probe Singlet Oxygen Sensor Green®. **Chemical Communications**, London, n. 20, p. 2920–2922, 2009.

RAHMAN, H. S. et al. Zerumbone-loaded nanostructured lipid carrier induces G2/M cell cycle arrest and apoptosis via mitochondrial pathway in a human lymphoblastic leukemia cell line. **International Journal of Nanomedicine**, London, v. 9, n. 1, p. 527–538, 2014.

RAHMAN, Z.; ZIDAN, A. S.; KHAN, M. A. Non-destructive methods of characterization of risperidone solid lipid nanoparticles. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, London, v. 76, n. 1, p. 127–137, 2010.

RAJESH, S. et al. Antimicrobial photodynamic therapy: An overview. **Journal of Indian**

Society of Periodontology, Mumbai, v. 15, n. 4, p. 323–327, 2011.

RAPALLI, V. K. et al. Curcumin loaded nanostructured lipid carriers for enhanced skin retained topical delivery: optimization, scale-up, in-vitro characterization and assessment of ex-vivo skin deposition. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, Amsterdam, v. 152, n. June, p. 105438, 2020.

RETAMAL MARÍN, R. R.; BABICK, F.; HILLEMANN, L. Zeta potential measurements for non-spherical colloidal particles – Practical issues of characterisation of interfacial properties of nanoparticles. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, Amsterdam, v. 532, p. 516–521, 2017.

REZUSTA, A. et al. In vitro fungicidal photodynamic effect of hypericin on candida species. **Photochemistry and Photobiology**, New York, v. 88, n. 3, p. 613–619, 2012.

RIBEIRO, A. P. D. et al. Antimicrobial photodynamic therapy against pathogenic bacterial suspensions and biofilms using chloro-aluminum phthalocyanine encapsulated in nanoemulsions. **Lasers in Medical Science**, Amsterdam, v. 30, n. 2, p. 549–559, 2015.

RICCI-JÚNIOR, E. et al. Nanostructured delivery system for zinc phthalocyanine: preparation, characterization, and phototoxicity study against human lung adenocarcinoma A549 cells. **International Journal of Nanomedicine**, Madison, p. 227, 2011.

RIGON, R. B. et al. Quantification of trans-resveratrol-loaded solid lipid nanoparticles by a validated reverse-phase HPLC photodiode array. **Applied Sciences (Switzerland)**, Switzerland, v. 9, n. 22, p. 1–15, 2019.

ROGUIN, L. P. et al. Zinc(II) phthalocyanines as photosensitizers for antitumor photodynamic therapy. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, Oxford, v. 114, n. Ii, 2019.

ROSLANIEC, M. et al. <Liposome binding constants and singlet oxygen quantum yields of HY.pdf>. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, New York, v. 57, p. 149–158, 2000.

SAFARI, J.; ZARNEGAR, Z. Advanced drug delivery systems: Nanotechnology of health design A review. **Journal of Saudi Chemical Society**, [s.l.], v. 18, n. 2, p. 85–99, 2014.

SAKIMA, V. T. et al. Antimicrobial photodynamic therapy mediated by curcumin-loaded polymeric nanoparticles in a murine model of oral candidiasis. **Molecules**, New York, v. 23, n. 8, 2018.

SAMAHA, D.; SHEHAYEB, R.; KYRIACOS, S. Modeling and comparison of dissolution profiles of diltiazem modified-release formulations. **Dissolution Technologies**, New York, v. 16, n. 2, p. 41–46, 2009.

SANNA, V. et al. Solid lipid nanoparticles (SLN) as carriers for the topical delivery of econazole nitrate: in-vitro characterization, ex-vivo and in-vivo studies. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, London, v. 59, n. 8, p. 1057–1064, 2007.

SAOKHAM, P.; LOFTSSON, T. γ -Cyclodextrin. **International Journal of Pharmaceutics**,

Oxford, v. 516, n. 1–2, p. 278–292, 2017.

SATO, M. R. et al. Nanostructured lipid carriers for incorporation of copper(II) complexes to be used against *Mycobacterium tuberculosis*. **Drug Design, Development and Therapy**, Albany, Albany, v. 11, p. 909–921, 2017.

SAWANT, B.; KHAN, T. Recent advances in delivery of antifungal agents for therapeutic management of candidiasis. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, Paris, v. 96, n. November, p. 1478–1490, 2017.

SEVERINO, P. et al. Crystallinity of Dynasan ®114 and Dynasan ®118 matrices for the production of stable Miglyol ®-loaded nanoparticles. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, Dordrecht, v. 108, n. 1, p. 101–108, 2012.

SHAFIRSTEIN, G. et al. Interstitial photodynamic therapy—a focused review. **Cancers**, v. 9, n. 2, p. 1–14, 2017.

SHAO, Z. et al. Targeted lung cancer therapy: Preparation and optimization of transferrin-decorated nanostructured lipid carriers as novel nanomedicine for co-delivery of anticancer drugs and DNA. **International Journal of Nanomedicine**, Madison, v. 10, p. 1223–1233, 2015.

SHARMA, A.; BALDI, A. Nanostructured Lipid Carriers : A Review. **Journal of Developing Drugs**, Los Angeles, v. 7, n. 2, p. 12, 2018.

SINGH HALLAN, S. et al. Ellagic acid containing nanostructured lipid carriers for topical application: A preliminary study. **Molecules**, New Delhi, v. 25, n. 6, 2020.

SORIA-LOZANO, P. et al. In vitro effect photodynamic therapy with different photosensitizers on cariogenic microorganisms. **BMC Microbiology**, London, v. 15, n. 1, p. 1–8, 2015.

SORIANO, J. et al. Cell death mechanisms in Tumoral and Non-Tumoral human cell lines triggered by photodynamic treatments: Apoptosis, necrosis and parthanatos. **Scientific Reports**, London, v. 7, n. November 2016, p. 1–13, 2017.

SOUTO, E. B.; MÜLLER, R. H. SLN and NLC for topical delivery of ketoconazole. **Journal of Microencapsulation**, London, v. 22, n. 5, p. 501–510, 2005.

TRIGO-GUTIERREZ, J. K. et al. Effect of Chloroaluminium phthalocyanine in cationic nanoemulsion on photoinactivation of multispecies biofilm. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, Amsterdam, v. 24, p. 212–219, 2018.

VAGHASIYA, H.; KUMAR, A.; SAWANT, K. Development of solid lipid nanoparticles based controlled release system for topical delivery of terbinafine hydrochloride. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, Amsterdam, v. 49, n. 2, p. 311–322, 2013.

VALLI, F. et al. **Crosstalk between oxidative stress-induced apoptotic and autophagic signaling pathways in Zn(II) phthalocyanine photodynamic therapy of melanoma.** [s.l.] Elsevier Inc., 2020.

VOLOBOUEVA, L. A. et al. Inflammatory response of microglial BV-2 cells includes a glycolytic shift and is modulated by mitochondrial glucose-regulated protein 75/mortalin. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 587, n. 6, p. 756–762, 2013.

VOLTAN, A. R. et al. Fungal diseases: Could nanostructured drug delivery systems be a novel paradigm for therapy? **International Journal of Nanomedicine**, Madison, v. 11, p. 3715–3730, 2016.

WANG, Y. Y. et al. Chlorin e6-mediated Photodynamic therapy suppresses P. acnes-induced inflammatory response via NF κ B and MAPKs signaling pathway. **PLoS ONE**, Cambridge, v. 12, n. 1, p. 1–14, 2017.

WIEGELL, S. R.; WULF, H. C. Photodynamic therapy of acne vulgaris using 5-aminolevulinic acid versus methyl aminolevulinate. **Journal of the American Academy of Dermatology**, Amsterdam, v. 54, n. 4, p. 647–651, 2006.

WIENCH, R. et al. Assessment of sensitivity of selected Candida strains on antimicrobial photodynamic therapy using diode laser 635 nm and toluidine blue – In vitro research. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, Amsterdam, v. 27, n. June, p. 241–247, 2019.

WILLIAMS, D. W. et al. Candida biofilms and oral candidosis: Treatment and prevention. **Periodontology 2000**, Barcelona, v. 55, n. 1, p. 250–265, 2011.

WU, K. et al. Antimicrobial activity and cytocompatibility of silver nanoparticles coated catheters via a biomimetic surface functionalization strategy. **International Journal of Nanomedicine**, Paris, v. 10, p. 7241–7252, 2015.

YANO, T. et al. Photodynamic therapy for esophageal cancer. **Annals of Translational Medicine**, Sha tin, v. 2, n. 3, p. 2–5, 2014.

YOON, G.; PARK, J. W.; YOON, I. S. Solid lipid nanoparticles (SLNs) and nanostructured lipid carriers (NLCs): Recent advances in drug delivery. **Journal of Pharmaceutical Investigation**, v. 43, n. 5, p. 353–362, 2013.

YU, W. et al. Zinc phthalocyanine encapsulated in polymer micelles as a potent photosensitizer for the photodynamic therapy of osteosarcoma. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, Amsterdam, v. 14, n. 4, p. 1099–1110, 2018.

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

ZHEN, Z. et al. Ferritin nanocages to encapsulate and deliver photosensitizers for efficient photodynamic therapy against cancer. **ACS Nano**, Washington, v. 7, n. 8, p. 6988–6996, 2013.