UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

NAYARA REZENDE

Avaliação *in vitro* da cisplatina veiculada em lipossomas nanoestruturados e associada à
ftalocianina de cloro alumínio empregando-se laser e radiação ionizante

RIBEIRÃO PRETO

2016

NAYARA REZENDE

Avaliação *in vitro* da cisplatina veiculada em lipossomas nanoestruturados e associada à ftalocianina de cloro alumínio empregando-se laser e radiação ionizante

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Diferenciação Celular Normal e Neoplásica.

Orientador: Prof. Dr. Harley Francisco de Oliveira.

RIBEIRÃO PRETO

2016

FICHA CATALOGRÁFICA

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

Catálogo da Publicação

Preparada pela Biblioteca do Serviço de Biblioteca e

Documentação

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Rezende, Nayara.

Avaliação *in vitro* da cisplatina veiculada em lipossomas nanoestruturados e associada à ftalocianina de cloro alumínio empregando-se laser e radiação ionizante. Ribeirão Preto, 2016.

103.páginas. : il. ; 30 cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Rbeirão Preto/USP – Área de concentração: Diferenciação Celular Normal e Neoplásica.

Orientador: de Oliveira, Harley Francisco.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nayara Rezende

Avaliação *in vitro* da cisplatina veiculada em lipossomas nanoestruturados e associada à ftalocianina de cloro alumínio empregando-se laser e radiação ionizante

Dissertação de Mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Oncologia Clínica, Células Tronco e Terapia Celular para obtenção do Título de Mestre em CIÊNCIAS.

Área de concentração: Diferenciação Celular Normal e Neoplásica.

Orientada: Nayara Rezende.

Orientador: Prof. Dr. Harley Francisco de Oliveira.

Aprovado em: __/__/__

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____Assinatura:_____

Dedicatória

Às pessoas que acreditaram neste trabalho e contribuíram de alguma forma para que obtivéssemos as respostas esperadas ao fim desta jornada.

À minha família, cuja tenho profunda admiração e respeito, está sempre presente em minha vida me proporcionando imenso amor e carinho. Aos meus amados pais Ailton e Aparecida, pilares da minha integridade sentimental e moral. Aos meus irmãos Arthur e Leonardo pela confiança, companheirismo e amizade. Á minha tia Marli pelo imenso incentivo.

Especialmente aos pacientes oncológicos e à memória de meu avô Gino e tia Isabel, razão pela qual iniciei e prossigo meus estudos em oncologia. Aonde quer que estejam posso sentir sua presença, apoio, incentivo e imenso amor. Seus ensinamentos de fé, perseverança e amor à vida foram determinantes nesta caminhada, o caminho pode se tornar sinuoso e sombrio, mas devemos confiar na luminosidade transcendente do criador.

Aos meus tão amados sobrinhos Stella, Vitor e Vinícius, os quais têm transbordado o meu ser com amor genuíno, a razão da minha felicidade.

Agradecimentos

Em especial aos Professores Doutor Harley Francisco de Oliveira e Doutor Antônio Claudio Tedesco, pela confiança e todos os ensinamentos oferecidos.

À Professora Doutora Maria Sol Brassesco pelos ensinamentos e colaboração nos estudos *in vitro*, assim como suas alunas Lara e Gabriela.

À Professora Doutora Márcia Andréia Mesquita Silva da Veiga pela gentileza em realizar as análises quantitativas da Cisplatina, em especial agradecimento aos alunos Lilian e Bryan pela imensa colaboração.

Aos Professores Doutor Dimas Tadeus Covas e Doutora Belinda Simões pela gentileza em temporariamente assumir a orientação da aluna junto à secretaria da pós-graduação.

Aos funcionários da fundação Hemocentro pelo auxílio nos processos referentes ao programa de pós-graduação, em especial as funcionárias Adriana, Renata e Dalvinha.

Aos funcionários da Casa da Ciência, em especial Profa. Marisa, Rose e Fernando.

À todos os funcionários da Radioterapia do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto, em especial a Rita pela imensa colaboração e carinho, assim como a Rose, Francisco, Luciano, e aos físicos Edenyse Cristhiane Bertucci e Leandro Federiche Borges.

Aos funcionários do setor administrativo da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto pela gestão dos recursos do processo Fapesp nº 2014/09421-1 destinado ao desenvolvimento deste trabalho, em gratidão especial à funcionária Michele.

À equipe da empresa Lipid Ingredients & Technologies, Gustavo, Guilherme e Thyerre pela gentileza em fornecer os lipídios e cooperação na etapa final deste trabalho. Em especial a Dra. Daniela Spuri Bernardi pela confiança no projeto de treinamento técnico sob processo FAPESP nº 2015/23802-0.

Aos jovens pesquisadores integrantes do Centro de Nanotecnologia e Engenharia Tecidual pelo companheirismo, descontração e contribuição intelectual nesta jornada. Em especial aos alunos Ítalo e Emanuel pela contribuição no desenvolvimento das formulações, ao aluno Leonardo Franqui pela imensa paciência e profissionalismo nas análises de citometria, aos alunos Cristiano e Patrícia pelas sempre tão interessantes discussões referentes aos estudos fotofísicos e quantitativos e, aos alunos Aldo, Andrielly, Gracielly, Natália, Leonardo, Marta, Maryanne e TÁCILA pela amizade.

À Olimpia integrante do Centro de Nanotecnologia e Engenharia Tecidual pelo imenso carinho e profissionalismo.

Aos queridos amigos Mateus, Bruna, Luana, Rita, Jéssica, Rafael, Maraísa e TÁCILA pelo carinho, companheirismo e incentivo determinante nesta jornada.

À Fundação Hemocentro e Ministério da Educação – CAPES, pela concessão de bolsa institucional.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pela bolsa de treinamento técnico concedida sob processo nº 2015/23802-0 e, concessão do projeto regular sob processo nº 2014/09421-1.

Epígrafe

“... ainda que eu tivesse o dom da profecia,
o conhecimento de todos os mistérios e de toda ciência,
ainda que eu tivesse toda a fé,
a ponto de transportar montanhas,
se não tivesse o amor,
eu nada seria...”

Paulo de Tarso, I Coríntios 13: 2

RESUMO

Rezende, N. **Avaliação *in vitro* da cisplatina veiculada em lipossomas nanoestruturados e associada à ftalocianina de cloro alumínio empregando-se laser e radiação ionizante.** 2016. 103f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Este trabalho de tese de mestrado baseia-se em um desenvolvimento científico amplamente multidisciplinar combinando-se protocolos, técnicas e ensaios experimentais da área de tecnologia farmacêutica, nanotecnologia, fotobiologia e radiobiologia. O trabalho foi realizado em duas etapas subsequentes. Primeiramente realizaram-se os estudos de desenvolvimento e caracterização de um sistema de veiculação de fármacos, o qual foi amplamente avaliado a partir de testes físico-químicos e ensaios de citotoxicidade *in vitro* em cultura carcinoma epidermóide e glioblastoma humanos. Na sequência realizaram-se estudos fotobiológicos e radiobiológicos combinando-se a aplicação de laser e radiação ionizante e, fármaco fotosensibilizante e radiosensibilizantes veiculados em lipossomas nanoestruturados em monocamada e tridimensional células, para avaliação da resposta biológica aos estímulos. Os resultados obtidos foram promissores, auxiliando na compreensão dos mecanismos de interação dos processos fotodinâmicos e radiação ionizante com as matrizes celulares. Foi possível estabelecer também as bases para novos protocolos disponíveis para testes oncológicos envolvendo produtos do segmento farmacêutico.

Palavras-chave: Processos Fotodinâmico, Radiação ionizante, Lipossomas, Cisplatina, Ftalocianinas, Carcinoma epidermóide, Glioblastoma.

ABSTRACT

Rezende, N. ***In vitro* evaluation of cisplatin in nanostructured liposome and associatedchloro aluminum phthalocyanine employing laser and radiation ionizing** . 2016. 103f. Dissertation (Master). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

This work of master dissertation bases on a scientific development thoroughly multidiscipline combining protocols, techniques and experimental assays of the pharmaceutical technology, nanotechnology, radiobiology and photobiology. The work was accomplished in two subsequent stages. Firstly were carried out studies and characterization of a drug delivery system with nanotechnology, which was evaluated thoroughly starting from physical-chemical tests and assays of cytotoxicity in squamous cell carcinoma and human glioblastoma culture. In the sequence were carried photobiological and radiobiological studies combining the application of radiation ionizing and laser and, photosensitizers and radiosensitizers carrier in liposome in cell three-dimensional and monolayer, for evaluation of the biological stimulation. Results were promising, aiding in the understanding of interaction of cellular matrix with radiation ionizing and photodynamic processes. Therefore, the work was based in combination of techniques with application in pharmaceutical process and correlate areas.

Keywords: Photodynamic Processes, Radiation Ionizing, Liposomes, Cisplatin, Phthalocyanine Squamous Cell Carcinoma, Glioblastoma.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química da Cisplatina (CDDP)	5
Figura 2 - Ilustração de alguns sistemas de liberação de fármaco (DDS) extraído (74).	7
Figura 3 - Vantagens da liberação controlada de fármacos. ■ liberação controlada ■ sistema convencional extraído de (74).	8
Figura 4 - Estrutura química Ftalocianinas de Zinco (A) e de Cloro-Alumínio (B)	10
Figura 5 - Esquema de preparo dos lipossomas pelo método de injeção etanólica (LIE).	16
Figura 6 - Esquema de preparo dos lipossomas pelo método de formação de filme lipídico (LFLE).	18
Figura 7 - Micrografias das células OSCC (A) e U87MG em objetiva de 10X.	24
Figura 8 - Micrografias das células OSCC (A) e U87MG (B) em formato de esferóides na objetiva de 10X.	25
Figura 9 - Sistema de irradiação com fibra-óptica difusa usado nos estudos de fotoestimulação (luz monocromática $\lambda = 660$ nm) extraído de (74).	29
Figura 10 - Acelerador Linear Siemens Primus com energia de 6 MV.	30
Figura 11 - Estudo de estabilidade avaliando-se o tamanho de partícula (A), índice de polidispersidade (B) e potencial zeta (C) dos LIE em função do tempo. A significância estatística das diferenças em relação ao tempo inicial foi determinada pelo teste de análise e variância <i>One-Way</i> Anova seguido do pós teste <i>Tukey t-test</i> para múltiplas comparações ($*p < 0,05$).	37
Figura 12 - Estudo de estabilidade avaliando-se o tamanho de partícula (A), índice de polidispersidade (B) e potencial zeta (C) dos LFLE em função do tempo. A significância estatística das diferenças em relação ao tempo inicial foi determinada pelo teste de análise de variância <i>One-Way</i> ANOVA seguido do pós teste <i>Tukey t-test</i> para múltiplas comparações ($*p < 0,05$).	38
Figura 13 - Padrão de ZnPc (0,7 mmol.L ⁻¹) em etanol analítico.	40
Figura 14 - Perfil dos espectros de absorção dos lipossomas LIE contendo ZnPc (5 μ mol.L ⁻¹) (—) e na associação ZnPc - CDDP (5 μ mol.L ⁻¹ – 15 μ mol.L ⁻¹) (—).	41
Figura 15 - Monitoramento do perfil dos espectros de absorção dos lipossomas LIE nas associações ZnPc-CDDP (5 μ mol.L ⁻¹ – 15 μ mol.L ⁻¹) por 3 dias.	42
Figura 16 - Padrão de ClAlPc (1,5 mmol.L ⁻¹) em etanol analítico (A). Monitoramento do perfil dos espectros de absorção dos lipossomas LFLE incorporado com ClAlPc (2,5 x 10-	

4mol.L⁻¹)(B) e, nas associações ClAlPc-CDDP (2,2 x 10⁻⁴e 8 x 10⁻⁶ mol.L⁻¹) (C) por 15 dias.
.....43

Figura 17 - Espectro da curva padrão de calibração para quantificação do fármaco fotossensível ClAlPc em THF (n = 3); $\lambda_{\text{máxima}} = 674 \text{ nm}$, faixa de concentração de $9,5 \times 10^{-8}$ a $8,6 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$44

Figura 18 - Curva padrão de calibração para quantificação do fármaco fotossensível ClAlPc em THF (n = 3); $y = 215857x + 0,03539$, $R^2 = 0,9993$, $\lambda_{\text{máxima}} = 674 \text{ nm}$, faixa de concentração de $9,5 \times 10^{-8}$ a $8,6 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$45

Figura 19 - Ativação de mecanismo de ação da CDDP dentro das células adaptado de (76)..
.....47

Figura 20 - Curva padrão de calibração para quantificação do metal Platina em PBS (n = 3); $y = 0,0002x + 0,0006$, $R^2 = 0,9995$, $\lambda_{\text{máxima}} = 265,9 \text{ nm}$, faixa de concentração de 100 a 400 $\mu\text{g.L}^{-1}$47

Figura 21- Ensaio *in vitro* de citotoxicidade da CDDP em cultura de OSCC. C = controle; 5; 15; 25; 35 e 45 = concentração da CDDP ($\mu\text{mol.L}^{-1}$). Teste na ausência de luz e radiação ionizante. A significância estatística das diferenças entre as doses de foi determinada pelo teste de análise de variância *One-way* Anova seguido pós-teste *Tukey t-test* para múltiplas comparações ($p < 0,05$).....50

Figura 22 - Ensaio *in vitro* de citotoxicidade da CDDP em cultura de U87MG. C = controle; 5; 15; 25; 35 e 45 = concentração da CDDP ($\mu\text{mol.L}^{-1}$). Teste na ausência de luz e radiação ionizante. A significância estatística das diferenças entre as doses de foi determina pelo teste de análise de variância *One-way* ANOVA seguido pós-teste *Tukey t-test* para múltiplas comparações ($*p < 0,05$).....50

Figura 23 - Ensaio *in vitro* de citotoxicidade do laser-diodo 660 nm em cultura de OSCC e U87MG. 1= controle; 2 = 100 mJ/cm², 3 = 250 mJ/cm² e 4 = 500 mJ/cm². A significância estatística das diferenças entre as doses de foi determinada pelo teste de análise de variância *One-way* ANOVA seguido pós-teste *Tukey t-test* para múltiplas comparações ($*p < 0,05$)..52

Figura 24 - Micrografias das linhagens OSCC (A) e U87MG (B) quando irradiadas em laser-diodo no comprimento de 660 nm na dose de 250 mJ/cm².....53

Figura 25 - Ensaio *in vitro* de citotoxicidade da radiação ionizante em cultura de OSCC e U87MG. 1= controle; 2 = 2 Gy, 3 = 4 Gy e 4 = 6 Gy. A significância estatística das diferenças entre as doses de foi determinada pelo teste de análise de variância *One-way* ANOVA seguido do pós-teste *Tukey t-test* para múltiplas comparações (* $p < 0,05$).....54

Figura 26 - Micrografias das linhagens OSCC (A) e U87MG (B) quando irradiadas em acelerador de 6 MV a dose de 2 Gy.....55

Figura 27 - Ensaio *in vitro* de citotoxicidade dos lipossomas em cultura de OSCC (A) e U87MG (B). 1 = controle; 2 = formulação vazia; 3= CDDP incorporado na concentração ($1 \mu\text{mol.L}^{-1}$); 4 = CIAIPc incorporada na concentração ($10 \mu\text{mol.L}^{-1}$); 5 = CDDP + CIAIPc incorporados nas respectivas (1 e $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$). Teste na ausência de luz e radiação ionizante. A significância estatística das diferenças foi determinada pelo teste de análise de variância *One-way* ANOVA seguido pós-teste *Tukey t-test* para múltiplas comparações (* $p < 0,05$)...56

Figura 28 - Ensaio *in vitro* de citotoxicidade dos lipossomas em cultura 3D de OSCC (A) e U87MG (B). 1 = controle; 2 = formulação vazia; 3= CDDP incorporado na concentração ($1 \mu\text{mol.L}^{-1}$); 4 = CIAIPc incorporada na concentração ($10 \mu\text{mol.L}^{-1}$); 5 = CDDP + CIAIPc incorporados nas respectivas (1 e $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$). Teste na ausência de luz e radiação ionizante. A significância estatística das diferenças foi determinada pelo teste de análise de variância *One-way* ANOVA seguido pós-teste *Tukey t-test* para múltiplas comparações ($p < 0,05$)....57

Figura 29 - Ensaio *in vitro* de citotoxicidade dos lipossomas em cultura de OSCC (A) e U87MG (B). 1 = controle; 2 = laser 250 mJ/ cm²; 3= lipossoma vazio, 4= CDDP incorporado na concentração ($1 \mu\text{mol.L}^{-1}$); 5 = CIAIPc incorporada na concentração ($10 \mu\text{mol.L}^{-1}$); 6 = CDDP + CIAIPc incorporados nas respectivas (1 e $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$). A significância estatística das diferenças foi determinada pelo teste de análise de variância *One-way* ANOVA seguido pós-teste *Tukey t-test* para múltiplas comparações (* $p < 0,05$).....59

Figura 30 - Ensaio *in vitro* de citotoxicidade dos lipossomas em cultura 3D de OSCC (A) e U87MG (B). 1 = controle laser 250 mJ/ cm²; 2= lipossoma vazio, 3= CDDP incorporado na concentração ($1 \mu\text{mol.L}^{-1}$); 4 = CIAIPc incorporada na concentração ($10 \mu\text{mol.L}^{-1}$); 5 = CDDP + CIAIPc incorporados nas respectivas (1 e $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$). A significância estatística das diferenças foi determinada pelo teste de análise de variância *One-way* ANOVA seguido pós-teste *Tukey t-test* para múltiplas comparações (* $p < 0,05$).....60

Figura 31 - Ensaio *in vitro* de citotoxicidade dos lipossomas em cultura de OSCC (A) e U87MG (B). 1 = controle; 2 = dose 2Gy no AL; 3= lipossoma vazio, 4= CDDP incorporado na concentração ($1 \mu\text{mol.L}^{-1}$); 5 = CIAIPc incorporada na concentração ($10 \mu\text{mol.L}^{-1}$); 6 = CDDP + CIAIPc nas respectivas (1 e $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$). A significância estatística das diferenças foi determinada pelo teste de análise de variância *One-way* ANOVA seguido pós-teste *Tukey t-test* para múltiplas comparações (* $p < 0,05$)......62

Figura 32 - Ensaio *in vitro* de citotoxicidade dos lipossomas em cultura 3D de OSCC (A) e U87MG (B). 1 = controle dose 2 Gy -; 2= lipossoma vazio, 3= CDDP incorporado na concentração ($1 \mu\text{mol.L}^{-1}$); 4 = CIAIPc incorporada na concentração ($10 \mu\text{mol.L}^{-1}$); 5 = CDDP + CIAIPc incorporados nas respectivas (1 e $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$). A significância estatística foi determinada pelo teste de análise de variância *One-way* ANOVA seguido pós-teste *Tukey t-test* para múltiplas comparações (* $p < 0,05$)......63

Figura 33 – Gráfico referente a análise por citometria de fluxo após tratamento lipossomal associado TFD.....64

Figura 34 - Gráfico referente a análise por citometria de fluxo após tratamento lipossomal associado RT.....65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação das vesículas lipídicas conforme sua estrutura, composição e metodologia de preparo extraída de (30).....	78
Tabela 2 - Programa de aquecimento empregado nas determinações de Pt por espectrometria de absorção atômica (AAnalyst 800 - PerkinElmer).....	23
Tabela 3 - Métodos de preparação de lipossomas e vesículas extraída de (30)	31
Tabela 4 - Valores de tamanho de partícula, Pdl e potencial zeta do método de preparação lipossomal por injeção etanólica na ausência, presença e associações dos fármacos CDDP e ZnPc.....	32
Tabela 5 - Valores de tamanho de partícula, Pdl e potencial zeta do método de preparação lipossomal por filme lipídico na ausência, presença e associações dos fármacos CDDP e ClAlPc	33
Tabela 6 - Concentração ($\mu\text{mol.L}^{-1}$) dos fármacos ClAlPc incorporado no lipossoma LFLE.	45
Tabela 7 - Concentração ($\mu\text{mol.L}^{-1}$) do fármaco CDDP incorporado no lipossoma LIE e LFLE.....	47

LISTA DE ABREVIATURAS

7-AAD indicador de apoptose tardia e necrose

A absorbância da molécula

AL acelerador linear de partículas

Al₃ átomo de alumínio

AlCl₃ complexo molecular de cloro alumínio

Anexina V-PE indicador de apoptose inicial

BCR-ABL proteína tirosina quinase

BSA soro de albumina bovina

CDDP – ClAlPc associação entre Cisplatina e Ftalocianina de cloro alumínio

CDDP – ZnPc associação entre Cisplatina e Ftalocianina de zinco

CDDP dicloreto cis-diaminaplatina (II)

Cl átomo de cloro

ClAlPc ftalocianina de cloro alumínio

CO₂ molécula de dióxido de carbono

cP centipoise

DDS *Drug Delivery Systems*

DMEM *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DMF dimetilformamida

DMSO dimetilsufóxido

DNA ácido desoxirribonucleico

EGFR receptor de fatores de crescimento endotelial

EROS espécies reativas de oxigênio

FDA *Food Drug Administration*

FF fármaco fotossensibilizante

G2 fase de duplicação do DNA no ciclo celular

Gy dose de radiação ionizante em Gray

J/K energia em Joule por kilo

LFLE lipossomas nanoestruturados por formação de filme lipídico seguido de extrusão

LIE lipossomas nanoestruturados por injeção etanólica

m/v razão massa - volume

mol.L⁻¹ mol por litro

MV Megavolts (10⁶ Volt)

MΩ•cm Megaohm por centímetro

NAD(P)H complexo enzimático ligado à membrana catalisador de superóxido

NH₃ molécula da amina primária

OSCC *Oral Squamous Cancer Cell*

PBS *Phosphate Buffered Saline*

PdI índice de polidispersidade

ppb parte por bilhão

Pt – DNA ligação cross linking da platina na estrutura do DNA

Pt átomo de platina

Qt quimioterapia

R² coeficiente angular

Rb gene supressor tumoral

RNA ácido ribonucleico

rpm rotação por minuto

RT radioterapia

S₀ estado singlete fundamental

S₁ estado singlete excitado

S₂ estado singlete

TFD Terapia Fotodinâmica

THF tetrahidrofurano

TOC *total organic carbon*

U87MG células de glioblastoma/ astrocitoma humano classificado como grau IV

ULA *ultra-low attachment*

UV radiação eletromagnética ultravioleta

v/v razão volume – volume

W potência elétrica em Watt

ZnPc ftalocianina de zinco

ζ potencial zeta

λ comprimento de onda eletromagnética

λ_{máxima} comprimento de onda de absorbância máxima da molécula

π transição eletrônica

MLV vesículas multilamelares

OLV vesículas oligolamelares

LUV vesículas unilamelares grandes

SUV vesículas unilamelares pequenas

BSV vesículas preparadas por borbulhamento

DOPC 1,2-dioleiol-sn-glicerol-3-fosfatidilcolina

DSPC 1,2-diestearoil-sn-glicerol-3-fosfatidilcolina

µg.L⁻¹ massa em microgramas por litro (10⁻³ gramas)

µg/mL massa em microgramas (10⁻³ gramas) por mL

µL/h vazão em microlitro (10⁻³ litro) por hora

mA miliampéres (10⁻³ Ampére)

mJ/cm² dose de luz visível em milijoules (10⁻³ Joule) por centímetro quadrado

mL mililitro (10⁻³ litro)

mmol.L⁻¹ micromol por litro (10⁻³ mol)

mV milivolts (10⁻³ Volt)

µm micrometros (10⁻⁶ metros)

µmol,L⁻¹ micromol por litro (10⁻⁶ mol)

nm nanometros (10⁻⁹ metros)

SUMÁRIO

I – Introdução.....	1
1.1 – Câncer	1
1.2 – Terapias aplicadas na clínica oncológica	3
1.3 – Radioterapia	4
1.4 – Cisplatina (CDDP)	5
1.5 – Sistemas de liberação de fármacos	6
1.5.1 - Sistemas lipossomais	8
1.6 – Terapia Fotodinâmica (TFD)	9
II – Justificativa	11
III – Objetivo	12
2.1 – Geral.....	12
2.2 – Específicos	12
IV – Materiais	13
V – Equipamentos	14
VI – Métodos	16
6.1 – Preparo dos lipossomas nanoestruturados por injeção etanólica (LIE)	16
6.1.2 – Incorporação da ftalocianina de zinco (ZnPc).....	17
6.1.3 – Incorporação da cisplatina (CDDP)	17
6.2 – Preparo dos lipossomas nanoestruturados por formação de filme lipídico seguida por extrusão (LFLE).....	18
6.2.1 – Incorporação da ftalocianina de cloro alumínio (ClAlPc)	18
6.2.2 – Incorporação da Cisplatina (CDDP)	19
6.3 – Caracterização físico-química.....	19
6.3.1 – Determinação do tamanho de partícula por espalhamento dinâmico de luz	19
6.3.2 – Determinação do potencial zeta por mobilidade eletroforética.....	20
6.3.3 - Monitoramento da estabilidade físico-química em função do tempo.....	20
6.3.4 – Determinação do espectro de absorção (UV-visível).....	21

6.4 – Doseamento	21
6.4.1 – Determinação da curva padrão de quantificação por espectroscopia de absorção (uv – visível).....	21
6.4.2 – Determinação da curva padrão de quantificação da Cisplatina por espectrometria de absorção atômica	22
6.5 – Cultura Celular.....	23
6.5.1 – Protocolo de cultivo das linhagens OSCC e U87MG	23
6.5.2 – Protocolo de cultivo das linhagens OSCC e U87MG em formato tridimensional (esferoide).....	24
6.5.3 – Micrografias das culturas celulares.....	25
6.5.4 – Procedimento para contagem celular e teste de integridade de membrana (Azul de Tripan)	25
6.5.5 – Ensaio de citotoxicidade: avaliação da proliferação e viabilidade celular através do teste de Resazurina.....	26
6.5.5.1 – Determinação da dose do quimioterápico CDDP	26
6.5.5.2 – Determinação da dose de luz em TFD	27
6.5.5.3 – Determinação da dose de radiação ionizante em AL	27
6.6 – Estudo de citotoxicidade <i>in vitro</i>	28
6.6.1 – Estudo de citotoxicidade <i>in vitro</i> dos fármacos CDDP e CIAIPc incorporados em lipossomas	28
6.6.2 – Estudo de citotoxicidade <i>in vitro</i> dos fármacos CDDP e CIAIPc incorporados em lipossomas associada ao diodo-laser em 660 nm	28
6.6.3 – Estudo de citotoxicidade <i>in vitro</i> dos fármacos CDDP e CIAIPc incorporados em lipossomas associada à radiação ionizante	29
6.6.4 - Identificação do tipo de morte celular (Apoptose e necrose)	30
6.4 – Análises estatísticas e softwares	30
VII – Resultados e Discussões.....	32
Parte 1 – Desenvolvimento e caracterização físico química dos sistemas lipossomais	32
7.1. – Determinação do tamanho de partícula por espalhamento dinâmico de luz.....	32

7.1.2. – Monitoramento da estabilidade físico-química em função do tempo	36
7.1.3. – Determinação do espectro de absorção dos fotossensibilizantes ClAlPc e ZnPc em uv-visível	39
7.1.4. – Determinação da curva padrão de quantificação da ClAlPc por espectroscopia de absorção em uv-visível	44
7.1.5. – Determinação da curva padrão de quantificação da CDDP por espectrometria de absorção atômica	46
7.2 – Conclusão Parcial – Parte I	48
Parte II – Estudos <i>in vitro</i>	49
7.3.1 – Determinação da dose do fármaco CDDP	49
7.3.2 – Determinação da dose de luz em TFD	51
7.3.3 – Determinação da dose de radiação ionizante em RXT	53
7.3.4 – Estudo de citotoxicidade <i>in vitro</i> dos fármacos CDDP e ClAlPc incorporados em lipossomas	55
7.3.4.1 - Estudo de citotoxicidade <i>in vitro</i> dos fármacos CDDP e ClAlPc incorporados em lipossomas associada ao diodo-laser em 660 nm	58
7.3.4.2 - Estudo de citotoxicidade <i>in vitro</i> dos fármacos CDDP e ClAlPc incorporados em lipossomas associada à radiação ionizante	60
7.3.5 – Identificação do tipo de morte celular (apoptose e necrose)	63
7.4. Conclusão Parcial – Parte II	66
VIII – Conclusão	67
IX - Referências	68
X – Anexos	77

I – Introdução

1.1 – Câncer

O Câncer é um grupo de doenças caracterizado pelo crescimento celular desordenado e a capacidade de disseminação para outras regiões e tecidos. Vários pontos dentro desta definição que precisam ser enfatizados. O tecido e o tipo de célula do local de origem distinguem os diferentes tipos de câncer. Aproximadamente 85% dos cânceres acometem células epiteliais e são classificados como carcinomas. Os originados de células da mesoderme são chamados de sarcomas, e cânceres de tecidos glandulares são chamados adenocarcinomas (1). Os cânceres originados de células sanguíneas e nervosas são denominados respectivamente hematopoiéticos e neuroectodermais. Os tumores cuja origem não pode ser identificada em função de suas células terem se desdiferenciado (perderam todas as características tecido-específicas), são ditos anaplásicos (2). A distinção entre um tumor benigno e um maligno leva em consideração o crescimento celular e a capacidade de disseminação para outras regiões. Tumores benignos não disseminam metástases, embora alguns apresentem maior risco de vida devido a sua localização e por liberarem altos níveis de hormônios que geram desequilíbrios fisiológicos no organismo. Por outro lado, tumores malignos não permanecem isolados, apresentam características de invasão e metástase. Mais especificamente, são as metástases disseminadas por estes tumores que são responsáveis por cerca de 90% dos óbitos causados por câncer (1;2).

O câncer é um importante problema de saúde pública em países desenvolvidos e emergentes, sendo responsável por 8,2 milhões de óbitos em 2012, representando cerca de 13% de todas as causas de morte no mundo segundo Organização Mundial da Saúde (78).

Alguns dos mais de 100 tipos de cânceres humanos são causados por acidentes de natureza aleatórios e inevitáveis, e, dessa forma, ocorrem com frequências comparáveis em várias populações humanas. Isso parece ser verdadeiro para alguns tipos de tumores pediátricos. Em adição a essas taxas de incidência relativamente constantes de alguns cânceres específicos, ainda outros fatores parecem intervir em certas populações para aumentar dramaticamente o número total de casos de câncer. Os dois fatores contribuintes são a hereditariedade e ambiente. Diferentes populações humanas podem carregar alelos suscetíveis ao câncer em diferentes frequências. De maneira alternativa, o meio ambiente

onde vivem esses indivíduos pode contribuir para as taxas de incidência elevadas. O ambiente, de maneira ampla inclui o estilo de vida, hábitos alimentares e outros diversos como o tabagismo (2). A exposição a agentes cancerígenos, alterações hormonais e contaminações virais, fundamentam esses fatores de risco. A epidemiologia, os estudo da doença na população, tem sido fundamental para elucidar as contribuições de tais fatores em diferentes tipos de câncer (1). Há três importantes processos que contribuem para o número total de células em um indivíduo. O primeiro e mais evidente é a proliferação celular, responsável pela divisão e crescimento celular. O segundo, a eliminação celular pela morte programada (apoptose), Ainda, a diferenciação celular pode inserir uma fase inativa de crescimento células, sendo que a diferenciação pode afetar o número de células . Mutações no DNA que alteram o funcionamento normal de genes envolvidos no crescimento, apoptose, ou diferenciação podem afetar número de células no organismo e desencadear um crescimento desordenado (1). As alterações podem ocorrer em genes especiais, denominados protooncogenes, que a princípio são inativos em células normais. Quando ativados, os protooncogenes transformam-se em oncogenes, responsáveis pela transformação maligna (79).

O processo fisiopatológico inicia-se, quando uma determinada população de células sofre transformações no material genético contido no núcleo (ácido desoxirribonucleico – DNA), dando origem a células resistentes aos mecanismos reguladores de crescimento e divisão celular normal (3). Existem dois principais tipos de genes mutados que contribuem para a carcinogênese: oncogenes e genes supressores tumorais. Os oncogenes codificam as proteínas que participam na transdução de sinais durante várias etapas do ciclo celular. Estes genes estão associados à divisão celular e ao desenvolvimento de câncer, estimulando a produção inapropriada de fatores reguladores do ciclo celular, tais como: fator de crescimento, receptor de fator de crescimento, proteínas envolvidas na transdução de sinais e proteínas reguladoras nucleares. Uma variedade de mudanças estruturais em proteínas pode desencadear a ativação do oncogene. Exemplos incluem alterações na estrutura dos receptores de fatores de crescimento (tais como receptores EGFR) e translocações que fusionam duas fases de leitura distintas para gerar uma proteína híbrida (como BCR/ABL). Ambos os tipos de alterações desregulam proteínas levando-as a emitirem sinais promotores de crescimento pronunciado e persistente (2). Os genes supressores de tumor (anti-oncogenes) codificam proteínas que inibem a divisão celular, assim são denominados, por desempenharem tal função e por terem sido descobertos em estudo com células tumorais. O primeiro gene

supressor descrito foi o Rb o qual está localizado no cromossomo 13q14 e está associado ao desenvolvimento do retinoblastoma.

Com o constante desenvolvimento de células cancerígenas, novos vasos sanguíneos são formados para que haja nutrição das mesmas, pelo processo denominado angiogênese. Devido ao descontrole da especialização das funções em tais células, à medida que as mesmas vão substituindo as células normais, os tecidos invadidos terão o comprometimento das suas funções. Assim, como exemplo, a invasão neoplásica dos pulmões gera alterações respiratórias, com isto há a disfunção orgânica que pode levar à falência do órgão ou, em maior gravidade à morte do paciente (79). A invasão de outros locais implica na habilidade de intravasar a circulação sanguínea ou vasos linfáticos, e formar metástases, em órgãos distantes. Quanto mais o câncer se disseminar, mais difícil se torna a sua erradicação (4).

A estrutura de um tumor não consiste simplesmente em um aglomerado de células em constante proliferação. As células neoplásicas frequentemente ocupam menos da metade do volume total do tumor. O volume deste é preenchido de 1 a 10% por vasos sanguíneos que se entrelaçam na massa tumoral. O espaço restante é composto por uma matriz rica em colágeno – o interstício – envolvendo as células neoplásicas e podendo separá-las da vascularização. Consequentemente, algumas áreas do tumor são bem irrigadas, outras têm pouca ou nenhuma vascularização, tornando o aporte de oxigênio e nutrientes em algumas regiões tumorais menos eficiente do que nos tecidos normais. Sendo assim, as células com localização próxima aos vasos sanguíneos, geralmente na periferia do tumor são bem oxigenadas, e, as células localizadas no centro do tumor, por vezes distantes da vascularização, são células anóxicas e necróticas. Finalmente, as células existentes entre essas suas regiões são células em hipóxia, pois estão localizadas em uma região de baixa concentração de oxigênio (5;6).

1.2 – Terapias aplicadas na clínica oncológica

Na clínica observa-se a predominância de tratamentos cirúrgicos, radioterapia (RT) e quimioterapia (QT). A combinação de mais de uma modalidade terapêutica visando potencializar a resposta antitumoral é prática padrão (79).

Há três razões que justificam o uso concomitante da quimioterapia aplicada com a RT. A técnica pode ser utilizada com a intenção de preservar órgãos, com ou sem tratamento adjuvante; o quimioterápico pode atuar como radiosensibilizador para um melhor controle local e, em alguns casos, a sobrevivência, por meio de potencializar os efeitos radiobiológicos

atuando nos clones radorresistentes. Ainda, como parte de uma abordagem combinada, a QT pode agir sistematicamente na erradicação de micrometástases à distância (7;8).

Atualmente a quimiorradioterapia concomitante é amplamente utilizada no tratamento de tumores sólidos. Em quase todos os tumores na qual o controle locorregional é necessário, esta abordagem pode ser empregada ou investigada (8).

O embasamento teórico dos mecanismos pelos quais essas duas modalidades interagem foi introduzido por Stell e Peckham em 1979, em análise da citotoxicidade *in vitro* (9). Uma revisão de Bentzen et al (10) propôs uma modernização do conceito anteriormente estabelecido (9) para o advento de novas drogas em desenvolvimento pré-clínico e clínico além das terapias alvo moleculares, definindo uma nova estratégia de interação da RT e QT (10).

A RT é responsável pelo controle locorregional, enquanto QT atua em metástases distantes, sem a interação de ambos os tratamentos, segundo o conceito de cooperação espacial. Assim, a toxicidade de ambas não são sobrepostas. Uma situação diversa de interação da RT e QT é a radiosensibilização, onde a QT potencializa os efeitos da radiação no tecido alvo (11). O nível deste aumento pode ser: igual (aditivo) ou maior que (sinérgico) a soma esperada da morte causada em cada modalidade. Há a possibilidade dos tratamentos interagirem de forma antagônica: a morte é menor do que a soma esperada. Tal situação pode ser utilizada como vantagem clínica caso objetive proteger os tecidos normais, onde a interação das modalidades reduz a toxicidade ao tecido normal enquanto mantém a susceptibilidade do tumor à RT (11).

1.3 – Radioterapia

Os efeitos biológicos da radiação ionizante nos tecidos ocorrem por deposição de energia. Inicialmente há interação do estímulo físico com as moléculas de água, formando íons pelo processo de hidrólise ($H_2O \rightarrow H^+ OH^-$). Posteriormente os radicais reagem com as moléculas de RNA e DNA, gerando alterações letais ou subletais, inibindo a proliferação celular. Devido à sua alta taxa de crescimento as neoplasias malignas tendem a ter maior sensibilidade à radiação quando comparada aos tecidos normais que circundam o tumor, o mesmo ocorre entre as linhagens tumorais conforme sua proliferação. A mitose e a fase final da G2 são as mais radiosensíveis do ciclo celular.

Quando se avalia a resposta clínica aos efeitos radiobiológicos, deve se considerar as células anóxias que podem iniciar processo de crescimento decorrente de fatores de maior sensibilidade à radiação, melhorias na oxigenação, expressão de fatores de crescimento, secreção autócrina e parócrina. Desta forma, o emprego do fracionamento de doses de radiação permitem melhores resultados terapêutico. A dose por fração e o intervalo da dose constituem um importante campo de pesquisa em radiobiologia clínica.

1.4 – Cisplatina (CDDP)

O uso de agentes radiosensibilizadores derivados de platina é comumente aplicado na clínica, principalmente a Cisplatina (Figura 1), estes compostos atuam em processos que interferem no metabolismo de DNA e RNA (11), causando danos tumorais por indução da apoptose que é mediada pela ativação dos sinais de transdução danificando os mecanismos dos receptores, bem como vias mitocondriais. A apoptose é responsável pelos efeitos adversos, principalmente nefrotoxicidade e ototoxicidade. A limitação da aplicação clínica da cisplatina tem sido o desenvolvimento de resistência tumoral à droga, mecanismos que estão relacionados à redução do acúmulo da droga dentro das células tumorais devido a barreiras da membrana celular, reparação rápida de cisplatina, modulação das vias de apoptose, regulação positiva dos fatores de transcrição, perda das funções da p53 e outras proteínas reguladoras do ciclo celular, maior concentração de glutathione e metalotioneínas (13). Quando a cisplatina é aplicada concomitantemente com a RT há um aumento no número de intermediários tóxicos da platina na presença de espécies reativas de oxigênio (EROs) gerados pela radiação ionizante (14). Também foi demonstrado um aumento na permeação da droga pela membrana celular (15), e a inibição do reparo do DNA. O análogo oxaliplatina também possui potencial radiosensibilizador e citotóxico em células cisplatina-resistentes, e vem sendo avaliada em estudos clínicos em conjunto com a RT (16;17).

Figura 1 - Estrutura química da Cisplatina (CDDP)

1.5 – Sistemas de liberação de fármacos

Os tratamentos padrão de QT e RT são destituídos de toxicidade seletiva, provocando efeitos colaterais graves, dentre eles a inibição da resposta imunológica, crítica para a recuperação do paciente. A intensidade da dose, o aumento da quantidade de QT aplicada por unidade de tempo e o emprego de sistemas transportadores de fármacos visam aumentar a seletividade do agente antitumoral, minimizar sua toxicidade e elevar as taxas de cura. A nanoencapsulação constitui um importante campo para as novas formulações farmacêuticas, uma vez que possibilita, de maneira racional e efetiva, aumentar a eficiência terapêutica e, além disso, torna possível a utilização de fármacos potencialmente tóxicos, como é o caso de diversos antineoplásicos, dentre eles a cisplatina (6;18;19).

Nas últimas décadas a tecnologia farmacêutica tem contribuído para o desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos (*DDS – drug delivery systems*) para diversos tipos de aplicações terapêuticas (20;21).

Os DDS (Figura 2) possuem capacidades físico-químicas de especificidade alvo-tumoral, revertendo diversas limitações da administração do fármaco isolado. A interação biológica de fármacos está diretamente relacionada a biodisponibilidade conferida pelos sistemas de liberação, o desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos com maior potencial biológico favorece a absorção da droga pelo alvo biológico, associado a uma farmacocinética adequada, reduzindo os efeitos colaterais usualmente presentes que limitam a utilização das terapias convencionais. O emprego da tecnologia farmacêutica proporciona ainda vantagens relacionadas ao transporte eficiente de fármaco, ocasionando maior absorção tumoral, liberação controlada, biocompatibilidade, redução de toxicidade, entre outros fatores. Vários tipos de DDS têm sido estudados e projetados para aplicação em nova modalidade terapêutica de neoplasias a Terapia Fotodinâmica (TFD), como as vesículas lipossomais (22-26), micropartículas (27-30), proteínas de baixa densidade, sistemas dendriméricos (31), entre outros, com propriedades físico-químicas e biológicas de interesse (19;20;32-40).

Figura 2 - Ilustração de alguns sistemas de liberação de fármaco (DDS) extraído (74)

Os aspectos que combinam pesquisas nas áreas de "nanotecnologia" e "biomedicina" resultaram na chamada "nanobiotecnologia" que envolve áreas como a genômica, robótica, tecnologia farmacêutica e biotecnologia, as quais estão associadas à descoberta de novas drogas e processos bioquímicos (31). Numa comparação com sistemas tradicionais, os sistemas de liberação controlada de fármaco apresentam diversas vantagens. Numa forma tradicional de administração, a droga atinge um pico máximo gradativo na corrente sanguínea seguido do decaimento da concentração. Desde que cada composto possui uma determinada faixa terapêutica. O objetivo dos sistemas de liberação controlada é manter a concentração do fármaco em faixa terapêutica por um tempo prolongado, utilizando-se de uma única dosagem (Figura 3).

Figura 3 - Vantagens da liberação controlada de fármacos. ■ liberação controlada ■ sistema convencional extraído de (74)

1.5.1 - Sistemas lipossomais

A interação de fármacos com a interface de agregados supramoleculares de compostos anfifílicos, ou de polímeros, representa um aspecto importante na tecnologia farmacêutica. Devido suas implicações biológicas, a associação de fármacos a sistemas de veiculação interfere diretamente no perfil de biodisponibilidade, liberação e sucesso farmacêutico, conduzindo a relevantes avanços na administração de fármacos (74).

Os lipossomas são definidos como vesículas esféricas cujo tamanho apresenta-se na faixa de 30 nm a vários micrometros. Sua estrutura consiste de uma ou mais bicamadas fosfolipídicas em torno de um núcleo aquoso, as cabeças dos grupos polares da cadeia estão direcionadas na orientação lateral da camada lipídica das vesículas. Estas partículas coloidais foram descritas no início da década de 60 por Bangham (54;55) e colaboradores inicialmente foram utilizadas como modelo de membrana simulando sistemas celulares simples para investigação de mecanismos e funções de transporte, propriedades de permeação e cinética de adesão e fusão. Tais características tornaram o sistema promissor candidato a veículo de liberação de ativos (54;56). Desde então foram investigada aplicações de lipossomas na indústria médica, cosmética, agrícola e alimentícia. Embora a consolidação de formulações comercialmente viáveis tenha ocorrido principalmente em aplicações biomédicas e farmacêuticas. Os primeiros produtos foram Doxil (Sequus) e DaunoXome (Gilead, Nexstar), ambos medicamentos anticâncer, efetivamente testados em estudos clínicos e aprovados para

comercialização em 1990 pelo agência regulamentadora americana *Food and Drug Administration* (FDA) (55).

Os sistemas lipossomais incluem diferentes tipos de arranjos coloidais e aplicações, desta forma seria um equívoco defini-los de maneira generalizada. A classificação das vesículas é definida conforme: estrutura, composição e metodologia de preparo como mostrado na Tabela 1 no item anexo.

1.6 – Terapia Fotodinâmica (TFD)

O avanço da nanotecnologia farmacêutica tem possibilitado sua aplicação em a Terapia Fotodinâmica (TFD). Uma terapêutica minimamente invasiva que exerce atividade citotóxica seletiva para células (41).

Fundamenta-se pelo acúmulo tumoral seletivo do fármaco fotossensibilizante (FF). A aplicação de luz, em comprimento de onda (geralmente visível) específico, em tecidos tumorais contendo o FF e na presença de oxigênio molecular pode levar a dano ou morte celular (40;42;43).

Ftalocianinas são FF solúveis apenas em solventes orgânicos. Possuem alta estabilidade térmica, alta absorção de luz no infra-vermelho na faixa espectral de 600 a 800 nm, ou seja na janela terapêutica, e capacidade de ajustar seu potencial de oxidação e redução, alterando o átomo central e os substituintes periféricos (40;43). Suas propriedades fotofísicas são fortemente pela presença e natureza do íon metálico central, o que é refletido diretamente no rendimento quântico e tempo de vida dos estados excitados (46).

Estudos mostram que um bom exemplo de ftalocianinas de segunda geração são as ftalocianinas de cloro-alumínio (ClAlPc) e de zinco (ZnPc), muito útil em TFD (44;45). As ZnPc (Figura 4-A) e ClAlPc (Figura 4-B) apresentam propriedades fotofísicas favoráveis, isto é, possui estado singlete excitado de vida relativamente curta e bom rendimento quântico de estado triplete excitado (46).

Figura 4 - Estrutura química Ftalocianinas de Zinco (A) e de Cloro-Alumínio (B)

II – Justificativa

O desenvolvimento tecnológico farmacêutico de sistemas que apresentam maior seletividade e absorção do fármaco no alvo tumoral corrobora à administração do quimioterápico CDDP associado a luz visível e radiação ionizante. O sinergismo da farmacocinética adequada e vesículas nanoparticuladas representa uma nova proposta de aplicação da CDDP em neoplasias cerebrais, usualmente limitada na clínica oncológica devida aos efeitos colaterais associados ao fármaco, como incompatibilidade com a barreira hematoencefálica.

III – Objetivo

2.1 – Geral

Avaliar a ação do quimioterápico antineoplásico radiosensibilizante cisplatina (CDDP) quando veiculados em sistemas de liberação de fármacos e associado aos fármacos fotossensibilizantes ftalocianina de cloro-alumínio (ClAlPc) e de zinco (ZnPc) na presença de luz visível e radiação ionizante.

2.2 – Específicos

Incorporar o quimioterápico em questão no nanossistema lipossomal de veiculação mais adequado com e sem o fármaco fotossensibilizante, e determinar a estabilidade e parâmetros físico-químicos dos DDS.

IV – Materiais

As soluções aquosas foram preparadas com água do tipo 1 (ultrapura), obtida através de filtragem sequencial em membranas de osmose reversa de um sistema Direct-Q® 3 da Merck Millipore, com fotodegradação de moléculas orgânicas por radiação de lâmpada UV e filtragem final em membrana de 0,22 µm de diâmetro. Tendo resistividade final de 18,2 MΩ•cm (25°C) e valor de TOC abaixo de 5 ppb.

Os reagentes químicos a seguir foram empregados sem nenhum tipo de tratamento prévio ou modificação química. Todos os solventes utilizados possuem alta pureza de grau analítico.

Fosfatidilcolina de soja (Lipoid S100®); 1,2-diestearoil-sn-glicerol-3-fosfatidilcolina (Lipoid DSPC); 1,2-dioleoil-sn-glicerol-3-fosfatidilcolina (Lipoid DOPC) cedidos gentilmente pela empresa Lipid Ingredients & Technologies. Colesterol (≥ 99%, Sigma Aldrich); dicloreto cis-diaminaplatina (II) (≥ 99%, Sigma Aldrich); ftalocianina de cloro alumínio (~ 85%, Sigma Aldrich); ftalocianina de zinco (97%, Sigma Aldrich); Clorofórmio (J. T. Baker); dicloroetano (J. T. Baker); dimetilformamida (Mallinckrodt); dimetil-sufóxido (J. T. Baker); etanol (J. T. Baker); tetrahidrofurano (Aldrich).

No preparo das formulações dos lipossomas foram utilizadas soluções tamponadas contendo Tris – HCL (Sigma Aldrich), na concentração de 10 mmol.L⁻¹ em solução, pH 7,4 e cloreto de sódio 0,9 % (m/v).

No preparo das soluções de tamponadas aplicadas nos ensaios biológicos foram utilizados sais de fosfato de potássio dibásico e fosfato de sódio dibásico heptahidratado (Sigma Aldrich), na concentração de 1 mol.L⁻¹ em solução, pH 7,4, cloreto de sódio 0,140 mol.L⁻¹ e cloreto de potássio 0,0027 mol.L⁻¹. Posteriormente filtrada em membrana 0,22 µm de diâmetro da Merck Millipore.

O protocolo de cultura celular foi estabelecido com os seguintes reagentes em condições estéreis: meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) com alta glicose, suplementado com L-glutamina e hidrocloreto de pirodoxina, sem piruvato e bicarbonato de sódio (Gibco); soro fetal bovino estéril e filtrado (Sigma); penicilina 10.000 U.I./mL + estreptomicina 10.000 µg/mL (Gibco); solução de aminoácidos não essenciais 100X (Gibco), anfotericina B 250 µg/mL (Gibco); tripsina-EDTA 10X (Sigma Aldrich).

No protocolo de contagem e avaliação da viabilidade celular foram utilizados os reagentes: azul de tripan 0,4% (m/v) (Sigma Aldrich) e sal de sódio resazurina (Sigma Aldrich), respectivamente.

Para os ensaios *in vitro* foram utilizadas as linhagens celulares OSCC (*oral squamous cancer cell*) e U87MG (glioblastoma/astrocitoma humano classificado como grau IV) (80) obtidas gentilmente do banco de células do Prof. Dr. Antônio Cláudio Tedesco, Grupo de Fotobiologia e Fotomedicina – Centro de Nanotecnologia e Engenharia Tecidual, Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

V – Equipamentos

Os equipamentos descritos no preparo das formulações e, nos estudos de tamanho das partículas por espalhamento de luz, determinação do potencial elétrico zeta e espectroscopia uv-visível são pertencentes ao parque de equipamentos do Laboratório de Fotobiologia e Fotomedicina do Prof. Dr. Antônio Cláudio Tedesco.

Para preparo das formulações foram utilizadas placas de agitação magnéticas da Corning modelo *Stirrer/Hot Plate*, bomba injetora *WPI-SP100*, banho termostatzado da Polyscience, rotaevaporadores Büchi (*Waterbath B-481/Rotavapor R-215*, Büchi, Canadá) disruptor celular (*SONICS®*, *Vibracell VC700*) e extrusora *Lipex Biomembranas*.

Utilizaram-se também os seguintes equipamentos: balança analítica eletrônica da (*A-200 DS*, *Denver Instruments Company*, Estados Unidos), sistema vortex (*Phoenix AP-50*), ultrassom (*2210*, *Bronson*, Estados Unidos) pHmetro (*Accumet 50*, *Fischer Scientific*, Reino Unido).

Na determinação do tamanho de partícula, do índice de polidispersidade e do potencial zeta, utilizou-se um equipamento *Zetasizer Nano ZS (ZEN3600*, *Malvern*, Canadá) operando a 25°C no comprimento de onda de 633 nm, tendo ajustes nos parâmetros a seguir: água como dispersante, viscosidade de 0.8872 cP, índice de refração de 1.330, constante dielétrica de 78.2 (mV) e detecção a um ângulo de espalhamento de 90°.

Nos estudos de caracterização espectroscópica dos fármacos ClAlPc e ZnPc assim como dos lipossomas contendo os ativos utilizou-se inicialmente um espectrofotômetro de arranjo de diodo (*8452-A*, *Hewlett Packard*, Estados Unidos) cedido gentilmente pelo Prof^ª. Dr^ª. Márcia Andréia Mesquita Silva da Veiga, Departamento de Química, Faculdade de

Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de Ribeirão Preto. Após aquisição do espectrofotômetro (*Ultrospec 7000, GE, Suíça*) a caracterização e quantificação das moléculas foram realizadas neste equipamento. Os recursos destinados para a aquisição deste provieram do Processo Fapesp 2014/09421-1 em benefício do Prof. Dr. Harley Francisco de Oliveira, cuja proposta está vinculado a este projeto de mestrado.

Nos estudos de quantificação do quimioterápico cisplatina (CDDP) utilizou-se um espectrômetro de absorção atômica (*AAnalyst 800, Perkin Elmer, Estados Unidos*) realizado junto ao Laboratório de Química Analítica Instrumental e Aplicada sob responsabilidade da Prof^a. Dr^a. Márcia Andréia Mesquita Silva da Veiga, Departamento de Química, Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de Ribeirão Preto.

As culturas celulares foram estabelecidas em incubadora (3130, *Forma Scientific, Holanda*) com controle digital de injeção de CO₂ (5%) e temperatura de 37°C. Para manipulação em condições estéreis empregou-se cabines de fluxo laminar vertical (PA400, *Pachane, Brasil*) com radiação germicida ultravioleta. Toda vidraria foi previamente esterilizada em autoclave da (Clear 2001, *Temotron, Brasil*) por 30 minutos a 120°C. O material plástico foi esterilizado previamente por formaldeído realizado junto ao setor de esterilização do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – HC/FMRP/USP.

As imagens da cultura celular e da lesão cicatricial foram registradas utilizando-se um microscópio óptico (*Axiovert 40-CFL, Carl Zeiss, Alemanha*), acoplado a uma câmera digital *Axio-Cam MRC* de alta resolução, com conjunto de objetivas para aumento de 10, 20, 40 e 100 X respectivamente, calibradas para escalas micrométricas (contraste de fase, *pladisc* e emissão de fluorescência).

O sistema laser utilizado nos ensaios de irradiação com luz foi um diodo-laser (*Eagle Quantum Tech, Brasil*) com feixe de excitação à 660 nm (Figura 9), operando a uma potência de 0,16 W.

A fonte de radiação utilizada nos ensaios com radiação ionizante foi um acelerador linear (*Primus, Siemens, Estados Unidos*) (Figura 10) operando a uma energia de 6 MV, e irradiador biológico (*RS200, Rad Source, Estados Unidos*) pertencente ao Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – HC/FMRP/USP, sob responsabilidade do Prof. Dr. Harley Francisco de Oliveira.

Os estudos de viabilidade celular foram determinados utilizando-se um leitor espectrofotométrico para protocolos de ELISA (*Safire²*, *TECAN*, Estados Unidos).

Os estudos de apoptose e necrose celular foram determinados utilizando-se um equipamento de citometria de fluxo (*GuavaEasycyte 8HT*, *Millipore*, Estados Unidos).

VI – Métodos

6.1 – Preparo dos lipossomas nanoestruturados por injeção etanólica (LIE)

Os lipossomas utilizados neste trabalho foram preparados inicialmente, segundo o método de injeção etanólica como descrito previamente por Kremer, com adaptações e aperfeiçoamento para associação dos fármacos (47). Inicialmente preparou-se uma fase etanólica contendo DOPC/DSPC/colesterol na respectiva proporção de 0,34: 0,34: 0,31 (mol%), os lipídios foram dispersos sob banho ultrassônico (15 minutos). Posteriormente esta fase foi adicionada, com auxílio de uma microseringa, diretamente a uma jaqueta termostatzada (57°C) contendo solução de tampão fosfato (10 mmol.L⁻¹) no valor de pH de 7.4, conforme o método de injeção (Figura 5). A formação dos lipossomas ocorreu espontaneamente sob agitação magnética lenta e constante, sendo a velocidade controlada por uma bomba de injeção e vazão de 3600 µL/h. A preparação foi realizada em triplicata e as formulações armazenadas a temperatura controlada de $\pm 25^{\circ}\text{C}$.

Figura 5 - Esquema de preparo dos lipossomas pelo método de injeção etanólica (LIE)

6.1.2 – Incorporação da ftalocianina de zinco (ZnPc)

Empregou-se a ftalocianina de zinco como fármaco fotossensibilizante (FF) ao sistema coloidal nanoestruturado, sua estrutura química pode ser caracterizada por heterociclos benzoindólico ligados via fusão de átomos de nitrogênio estabilizados por um átomo de zinco (Zn).

Foram preparados lipossomas na presença apenas do FF e associado a CDDP. Devido a baixa solubilidade da ZnPc em etanol foi necessário preparar uma solução de alta concentração ($0,33 \text{ mmol.L}^{-1}$) no solvente THF. Durante o processo de preparo das partículas nanoestruturadas o FF foi incorporada à fase etanólica sob agitação vigorosa em vortex prosseguida por banho ultrassônico (15 minutos) para concentração de $5 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ na formulação. Esta fase foi então injetada na fase aquosa conforme o procedimento descrito na seção 6.1.

6.1.3 – Incorporação da cisplatina (CDDP)

Empregou-se a cisplatina como fármaco antineoplásico ao sistema coloidal nanoestruturado. Sua estrutura química contém o centro metálico composto por um átomo de platina, conformação *cis*, ligado a dois átomos de amina primária (NH_3) e dois átomos de Cloro (Cl).

Foram preparados lipossomas na presença de CDDP e em associação à ZnPc. Apesar da solubilidade de CDDP em solução salina, foi preparada uma solução de alta concentração do fármaco (1 mmol.L^{-1}) em tampão fosfato sob agitação vigorosa em vortex (5 minutos), visando otimizar o processo de preparo. Esta solução foi adicionada à fase aquosa a um volume determinado para concentração de $15 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ na formulação, na associação à ZnPc incorporou-se o fármaco fotossensibilizante conforme descrito na seção 6.1.2. Posteriormente seguiu-se o procedimento descrito na seção 6.1.

6.2 – Preparo dos lipossomas nanoestruturados por formação de filme lipídico seguida por extrusão (LFLE)

Os lipossomas foram preparados segundo o método de formação de filme lipídico prosseguido de extrusão conforme descrito previamente por Lasic (48), com adaptações e aperfeiçoamento para associação dos fármacos.

Inicialmente preparou-se uma fase orgânica contendo fosfatidilcolina de soja/colesterol na proporção 0,5: 0,5 (mol %) em 10 mL de solução de clorofórmio/dicloroetano na proporção 1: 1 (v/v), os lipídios foram dispersos sob agitação vigorosa em vortex. Posteriormente realizou-se a extração total do solvente orgânico sob pressão reduzida em rotação moderada (100 rpm) com banho a 40°C até a formação de um filme lipídico delgado e uniforme. O processo de hidratação do filme obtido ocorreu com adição de 5 mL de tampão Tris – HCl (10 mmol.L⁻¹) de pH 7,4. Na sequência a solução foi transferida a um béquer e dispersa sob ultrassonificação por disruptor celular, o processo foi finalizado após extrusão das partículas em membranas de 0,2 e 0,1 µm sob banho termostatzado. A preparação (Figura 6) foi realizada em triplicata e as formulações armazenadas a temperatura controlada de $\pm 4^{\circ}\text{C}$.

Figura 6 - Esquema de preparo dos lipossomas pelo método de formação de filme lipídico (LFLE)

6.2.1 – Incorporação da ftalocianina de cloro alumínio (CIAIPc)

Empregou-se a ftalocianina de cloro alumínio (CIAIPc) como fármaco fotossensibilizante ao sistema coloidal nanoestruturado. Sua estrutura química possui

semelhanças a ZnPc entretanto o metal zinco da molécula é substituído por um complexo de cloro alumínio (AlCl₃).

Foram preparados lipossomas na presença apenas do FF e associado à CDDP. Durante o processo de preparo das partículas nanoestruturadas a ClAlPc foi incorporada à fase orgânica sob agitação vigorosa em vortex prosseguida por banho ultrassônico para concentração de 170 µmol.L⁻¹. Posteriormente seguiu-se o procedimento descrito na seção 6.2.

6.2.2 – Incorporação da Cisplatina (CDDP)

Foram preparados lipossomas na presença de CDDP e em associação ao fármaco fotossensibilizante ClAlPc. Durante o processo de preparo das partículas nanoestruturadas incorporou-se a CDDP ao volume de 5 mL de solução tampão Tris – HCl (10 mmol.L⁻¹) para concentração de 80 µmol.L⁻¹ na etapa de hidratação do filme lipídico. Na associação à ClAlPc incorporou-se o fármaco fotossensibilizante conforme descrito na seção 6.2.1. Posteriormente seguiu-se o procedimento descrito no 6.2.

6.3 – Caracterização físico-química

6.3.1 – Determinação do tamanho de partícula por espalhamento dinâmico de luz

O diâmetro hidrodinâmico das partículas foi determinado empregando-se a espectroscopia de fotocorrelação por espalhamento dinâmico de luz. A técnica consiste na medida das flutuações na intensidade da luz espalhada em função do tempo proveniente do movimento browniano das partículas em suspensão, o equipamento *Zetasizer*[®] da *Malvern* é acompanhado por um *software* que converte as análises em dados numéricos aplicando-se a equação de Stokes-Einstein (equação 1). Sendo: D = coeficiente de difusão da partícula, k = constante de Boltzmann ($1,3806505 \times 10^{-23}$ J/K), T = temperatura absoluta, η = viscosidade do solvente, a = diâmetro esférico hidrodinâmico da partícula.

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta a}$$

As amostras foram preparadas em água ultrapura usando fator de diluição 1:100 para cada análise. As leituras foram realizadas utilizando-se os conjuntos de cubetas de acrílico

padronizadas do próprio equipamento. Os lipossomas foram avaliados na ausência e presença dos fármacos a fim de verificar-se a influência da incorporação dos mesmos no sistema coloidal. Através da mesma técnica determinou-se o índice de polidispersidade (PdI) das partículas. As medidas foram realizadas em ensaios independentes igual a 3.

6.3.2 – Determinação do potencial zeta por mobilidade eletroforética

O potencial zeta corresponde a carga elétrica da superfície das partículas, para a sua determinação empregou-se a tecnologia do velocímetro laser doppler do equipamento *Zetasizer*[®] da *Malvern*. Quando uma suspensão coloidal é submetida a uma variação de potencial, as partículas carregadas presentes nesta suspensão são atraídas ao eletrodo de carga oposta, a velocidade pela qual as partículas migram sob o efeito do campo elétrico é denominada mobilidade elétrica (77). O *software* presente no equipamento relaciona o potencial zeta (ζ) com a mobilidade elétrica através da equação de Henry (equação 2). Sendo: μ = mobilidade eletroforética (mV), ε = constante dielétrica do meio dispersor, ζ = potencial zeta, $f(kR)$ = função de Henry, η = viscosidade do meio dispersor.

$$\mu = \frac{\varepsilon \zeta f(kR)}{1,5\eta}$$

As amostras foram preparadas conforme descrito na seção 6.3.1. Entretanto as medidas foram realizadas em uma cubeta eletroforética apropriada para análise a qual possui eletrodos externos que viabilizam a condutividade da voltagem (mV). As medidas foram realizadas em ensaios independentes igual a 3.

6.3.3 - Monitoramento da estabilidade físico-química em função do tempo

Um dos primeiros fatores a se determinar no desenvolvimento de um sistema de liberação de fármacos é sua estabilidade físico-química. O monitoramento do comportamento termodinâmico é essencial para se validar o método de preparação além de delinear as condições de caracterização para estudos posteriores.

Avaliou-se inicialmente o diâmetro hidrodinâmico das vesículas coloidais, índice de polidispersidade e o potencial Zeta de superfícies dos lipossomas na ausência e presença dos fármacos estudados, à temperatura de 25°C para LIE e 4°C para LFLE, em função do tempo durante 30 dias. Os parâmetros de leitura seguiram as mesmas condições apresentadas nas seções 6.3.1 e 6.3.2.

6.3.4 – Determinação do espectro de absorção (UV-visível)

Os espectros de absorção da ClAlPc e ZnPc na presença dos ativos em lipossomas foram determinados no estado estacionário como parte da caracterização espectroscópica dos fármacos fotossensibilizantes.

Os espectros foram obtidos utilizando-se cubetas de quartzo com 1,0 cm de caminho óptico. Como referência foi utilizada uma solução de ClAlPc em etanol ($1,5 \text{ mmol.L}^{-1}$), ZnPc em DMSO:DMF (1:1) ($0,7 \text{ mmol.L}^{-1}$).

As amostras dos lipossomas preparados pelo método de injeção etanólica foram transferidas diretamente à cubeta de quartzo no volume total de 2 mL e, os lipossomas preparados pelo método de formação de filme lipídico devida a baixa transmitância da formulação usou-se fator de diluição 1:10 (lipossoma/solvente) em tampão Tris – HCl (10 mmol.L^{-1}).

6.4 – Doseamento

6.4.1 – Determinação da curva padrão de quantificação por espectroscopia de absorção (uv – visível)

Dentro da rotina de desenvolvimento e preparação do sistema lipossomal de liberação desenvolveu-se um método de quantificação do fármaco ClAlPc.

A espectroscopia de absorção na faixa de luz uv-visível foi aplicada ao fármaco descrito anteriormente, devida a presença de ciclos aromáticos e ligações insaturadas na estrutura química do mesmo, fornece à molécula a propriedade de absorção de luz viabilizando a utilização do método. A partir de um espectrofotômetro de absorção (*Ultrospec 7000, GE*) fixou-se um protocolo experimental para determinação da curva de correlação entre o máximo de absorbância em função da concentração da ClAlPc ($9,5 \cdot 10^{-8}$ a $1,3 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$).

O método de quantificação foi determinado com número de repetição igual a 3. O parâmetro de aquisição dos espectros foi varredura no intervalo de 300 a 800 nm. A equação obtida por regressão linear foi calculada a partir dos valores médios para cada ponto no máximo de absorbância registrado no comprimento de onda 674 nm.

As amostras foram preparadas com auxílio de microseringas de variáveis volumes (10, 50 e 100 μL / Hamilton) a partir de diluição infinita em tetrahidrofurano (3,0 mL) diretamente em cubeta de quartzo (caminho óptico de 1,0 cm), partindo-se de três soluções iniciais independentes em dimetil-sufóxido sendo as concentrações para ClAlPc (0,19 mmol.L^{-1}).

As amostras dos lipossomas devido a dispersão dos lipídios foram preparadas conforme o protocolo descrito por Siqueira Moura (49). Inicialmente aliquotou-se 60 μL das formulações, fez-se uma diluição 1:1 em DMSO. Posteriormente as amostras foram submetidas a 15 minutos de banho ultrassônico e transferidas a uma cubeta de quartzo com THF no volume final de 2 mL.

6.4.2 – Determinação da curva padrão de quantificação da Cisplatina por espectrometria de absorção atômica

Dentro da rotina de desenvolvimento e preparação do sistema lipossomal de liberação desenvolveu-se um método de quantificação do fármaco CDDP.

A ausência de ligações insaturadas e grupos aromáticos na estrutura química da CDDP inviabilizaria a aplicação da técnica de espectroscopia de absorção de luz, desta forma devida a presença do metal Platina na molécula empregou-se a espectrometria de absorção atômica como método quantitativo da mesma. A técnica consiste na determinação de metais baseada na absorção eletromagnética de uma fonte específica por átomos livres no seu estado fundamental e gasoso. A partir de um espectrômetro de absorção atômica (*AAAnalyst 800*, *Perkin Elmer*, Estados Unidos) quantificou-se a Platina nas amostras e sequencialmente determinou-se a concentração do fármaco CDDP pelo cálculo estequiométrico da molécula.

O método de quantificação foi determinado com número de repetição igual a 3. Os parâmetros de aquisição dos espectros foram leitura em lâmpada de platina no comprimento de onda de 265,9 nm, corrente de 30 mA, análises realizadas no forno de grafite e, temperatura de pirólise e atomização a 2200 e 1300°C, respectivamente. As amostras foram preparadas em tampão PBS 1X usando fator de diluição 1:100 e 1:50 para os lipossomas LIE e LFLE, respectivamente. O programa de aquecimento empregado para as análises encontra-se na Tabela 2.

Tabela 2 - Programa de aquecimento empregado nas determinações de Pt por espectrometria de absorção atômica (AAAnalyst 800 - PerkinElmer)

Etapa	Temperatura (°C)	Rampa (s)	Permanência (s)	Vazão de Ar (mL min⁻¹)
Secagem	110	1	30	250
Secagem	130	15	30	250
Pirólise	1300	10	20	250
Atomização	2220	0	5	0
Limpeza	2500	1	5	250

6.5 – Cultura Celular

6.5.1 – Protocolo de cultivo das linhagens OSCC e U87MG

A cultura celular de ambas linhagens OSCC (*oral squamous cancer cell*) e U87MG (glioblastoma grau IV) foi estabelecida em frascos para cultura de 75 cm² (Corning), utilizando-se meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) 1X alta glicose, suplementado com L-glutamina e hidrocloreto de piridoxina, sem piruvato e bicarbonato de sódio (Gibco); suplementado com soro fetal bovino (BSA) estéril e filtrado (Sigma) a 10%; penicilina/estreptomicina a 1,0% (Gibco); solução de aminoácidos não essenciais 100X (Gibco) a 1,0%, anfotericina B a 0,5% (Gibco). Em incubadora monitorada por uma controladora digital a 37°C, com atmosfera úmida a 5,0% de CO₂. As células foram cultivadas até atingiram confluência, após este período as células foram lavadas em tampão fosfato 1X pH 7,4 (seção 3) sendo então soltas por atividade enzimática com uma solução de tripsina-EDTA 10X (Sigma Aldrich) a 0,05%. O processo foi interrompido pela adição direta de meio DMEM BSA 10%, e o meio centrifugado a 1000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet celular ressuspensionado em 10 mL de meio DMEM BSA 10%. Para os ensaios *in vitro* foram usadas células entre a 3^a e 6^a passagem com no mínimo 90% de confluência.

Figura 7 - Micrografias das células OSCC (A) e U87MG em objetiva de 10X

6.5.2 – Protocolo de cultivo das linhagens OSCC e U87MG em formato tridimensional (esferoide)

As linhagens foram cultivadas exatamente como descrito na seção (6.5.1) até confluência de 90% da garrafa de cultivo. Sequencialmente plaqueou-se 75×10^3 células/poço em placas de 96 poços modelo *Ultra-low attachment* (ULA) da Corning desenvolvidas especialmente para esferoides, após incubação a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ no período de 24 horas, ocorreu formação de pequenas esferas de células.

Os esferoides são um modelo transitivo aos *in vitro* e *in vivo*, importante para compreensão do comportamento de tumores sólidos *in vivo*. Estudos recentes indicam diferenças fisiológicas entre o crescimento celular quando comparados os formatos dimensional (monocamada) e tridimensional (esferoides) (50). Neste trabalho empregamos os esferóides para avaliar a sensibilidade das linhagens celulares OSCC e U87MG ao tratamento do fármaco CDDP incorporados em sistemas lipossomais nanoestruturados na ausência e presença do fotossensibilizante ClAlPc e, quando associado aos tratamentos com luz visível e radiação ionizante, isoladamente.

Figura 8 - Micrografias das células OSCC (A) e U87MG (B) em formato de esferóides na objetiva de 10X

6.5.3 – Micrografias das culturas celulares

Uma das formas de se monitorar o crescimento celular é através da obtenção de micrografias em microscópio óptico de alta resolução.

Imagens do crescimento das culturas foram obtidas utilizando-se o conjunto de objetivas A-Plan 10x/0,25 Ph1, adaptado com uma câmera digital Canon 7.2 Mpixels.

As imagens foram registradas diretamente nas placas de 24 poços para cultura em monocamada e, em microplacas de 96 poços modelo *Ultra-low attachment* (ULA) da Corning para formação e avaliação das culturas em esferoide ou estrutura tridimensional (3D), em meio DMEM 10%.

6.5.4 – Procedimento para contagem celular e teste de integridade de membrana (Azul de Tripán)

Este procedimento é fundamental para os estudos subsequentes os quais tem como fator determinante o número de células em suspensão.

Após centrifugação, ressuspendeu-se o pellet celular com o meio de cultura completo, aliquotou-se 25 μ L da suspensão homogênea de células, fez-se uma diluição 1:3 com uma solução de Azul de Tripán 0,4%. Este corante é específico para se testar a integridade de membrana celular, cujo mecanismo de interação é baseado na carga residual negativa do corante que atua diretamente, por afinidade iônica, na região citoplasmática intracelular de membranas alteradas, como descrito por Freshney em 1987 (74).

6.5.5 – Ensaio de citotoxicidade: avaliação da proliferação e viabilidade celular através do teste de Resazurina

6.5.5.1 – Determinação da dose do quimioterápico CDDP

A determinação de uma dose que apresente baixa toxicidade é de suma importância para o desenvolvimento de um sistema de liberação nanoestruturado, pois os mecanismos de atuação destes no organismo visam a otimização da biodisponibilidade dos fármacos ao sítio de ação e desta forma a redução da dose administrada. Neste trabalho avaliamos inicialmente a proliferação das linhagens celulares na presença da CDDP na faixa de dose de 5; 15; 25; 35 e 45 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ (51).

A citotoxicidade dos fármacos foi investigada através de curvas de dose-reposta obtidas pelo ensaio de proliferação e viabilidade celular utilizando o corante Resazurina.

O composto resazurina é um indicador redox (óxido-redução) empregado em ensaios de toxicidade, proliferação e viabilidade celular, assim como determinação do mecanismo mitocondrial (52). O corante azul e não fluorescente, em células viáveis é reduzido a um metabólito fluorescente de cor rosa, a resofurina que pode ser detectado espectrofotometricamente pela absorção em 570 nm. O mecanismo pelo qual este processo ocorre ainda não está bem esclarecido, entretanto em células viáveis a conversão do composto à redução da resazurina ocorre por diferentes sistemas de enzimas oxirredutases que usam NAD(P)H como o doador de elétron primário (53). A estratégia da técnica depende da atividade metabólica das células vivas que está diretamente relacionada à oxirredução do corante que resulta na produção do metabólito resofurina.

Após estabelecida a fase de confluência (48 horas), as células foram tripsinizadas, plaqueadas no número de 10×10^3 em placas de 24 poços e incubadas por 24 horas para adesão. Então incubou-se as células com os fármacos contendo o fármaco neoplásico por 24 horas (37°C e 5 % CO_2), avaliando-se a faixa de concentração para CDDP na faixa de 25 a 45 $\mu\text{mol/L}$.

Na sequência, adicionou-se volume adequado para concentração por poço de 25 $\mu\text{g/mL}$ de solução de Resazurina (1 mmol.L^{-1} previamente dissolvidos em tampão PBS 1X), sendo incubadas por 6 horas. Em seguida, as placas foram lidas em espectrofotômetro do tipo

ELISA (Safire² – Tekan) em 570 e 600 nm. O percentual de células viáveis foi calculado de acordo com a seguinte relação:

$$\text{células viáveis} = \frac{(\epsilon_{\text{ox}})\lambda_2 A\lambda_1 - (\epsilon_{\text{ox}})\lambda_1 A\lambda_2 \text{ tratamento}}{(\epsilon_{\text{ox}})\lambda_2 A\lambda_1 - (\epsilon_{\text{ox}})\lambda_1 A\lambda_2 \text{ controle}} \times 100$$

Sendo:

A λ_1 = absorbância referente ao comprimento de onda 570 nm.

A λ_2 = absorbância referente ao comprimento de onda 600 nm.

$(\epsilon_{\text{ox}}) \lambda_1 = 80,865$ (valor de épsilon para forma oxidada em 570 nm).

$(\epsilon_{\text{ox}}) \lambda_2 = 117,216$ (valor de épsilon para forma oxidada em 600 nm).

Os ensaios foram realizados em triplicada ($n = 3$) e as variáveis estatísticas calculadas e analisadas conforme descrito em 6.4.

6.5.5.2 – Determinação da dose de luz em TFD

Após estabelecida a fase de confluência (48 horas), as células foram tripsinizadas, plaqueadas no número de 10×10^3 em placas de 24 poços e incubadas por 24 horas para adesão. Então as células foram expostas à irradiância de um laser monocromático no comprimento de 660 nm, operando com potência de 0,18 W e dose na faixa de 250 a 1000 mJ/cm². Após o processo trocou-se o meio e, então incubou-se as células por 24 horas (37°C e 5 % CO₂). Sequencialmente utilizou-se o método de proliferação e viabilidade celular Resazurina (descrito na seção 6.5.5) para avaliação da fototoxicidade.

6.5.5.3 – Determinação da dose de radiação ionizante em AL

Após estabelecida a fase de confluência (48 horas), as células foram tripsinizadas, plaqueadas no número de 10×10^3 em placas de 24 poços e incubadas por 24 horas para adesão. Então as células foram expostas à irradiância de feixe de fótons de um acelerador linear, operando a energia de 6 MV, na dose de 2 a 4 Gy. Foi adicionado um bôlus de 1,5 cm abaixo das placas para direcionamento da região da dose máxima (*build-up*) a superfície de contato das células. O procedimento foi realizado com giro de 180° do gantry. Após o processo trocou-se o meio e, então incubou-se as células por 24 horas (37°C e 5 % CO₂).

Sequencialmente utilizou-se o método de proliferação e viabilidade celular Resazurina (descrito na seção 6.5.5) para avaliação da radiotoxicidade.

6.6 – Estudo de citotoxicidade *in vitro*

6.6.1 – Estudo de citotoxicidade *in vitro* dos fármacos CDDP e ClAlPc incorporados em lipossomas

Após estabelecida a fase de confluência (48 horas), as células foram tripsinizadas, plaqueadas no número de 25×10^3 e 75×10^3 , respectivamente para cultura monocamada e esferoides. Foram incubadas por 24 horas para adesão. Sequencialmente as células foram tratadas com os lipossomas vazios e na presença de CDDP, CDDP-ClAlPc e ClAlPc, nas respectivas concentrações: $1 \mu\text{mol.L}^{-1}$, $1 - 10 \mu\text{mol.L}^{-1}$ e $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$. Após incubação no período de 3 horas o meio foi retirado e posteriormente as células foram cuidadosamente lavadas por duas vezes com tampão PBS 1X e novamente incubadas (37°C e 5% CO_2) com meio DMEM 10%.

A viabilidade celular foi avaliada 24 horas após o tratamento, empregando-se o protocolo de viabilidade celular – Resazurina descrito na seção 6.5.5.

6.6.2 – Estudo de citotoxicidade *in vitro* dos fármacos CDDP e ClAlPc incorporados em lipossomas associada ao diodo-laser em 660 nm

Inicialmente as células foram plaqueadas e tratadas com os sistemas lipossomais conforme descrito na seção 3.3.6.2. Após incubação com os lipossomas no período de 3 horas, as células foram irradiadas em um sistema diodo-laser Eagle (Figura 9) em 660 nm na dose de 250 mJ/cm^2 . Sequencialmente as células foram cuidadosamente lavadas por duas vezes com tampão PBS 1X e novamente incubadas (37°C e 5% CO_2) com meio DMEM 10%.

A viabilidade celular foi avaliada 24 horas após a exposição à radiação, empregando-se o protocolo de viabilidade celular – Resazurina descrito na seção 6.5.5.

Figura 9 - Sistema de irradiação com fibra-óptica difusa usado nos estudos de fotoestimulação (luz monocromática $\lambda = 660 \text{ nm}$) extraído de (74)

6.6.3 – Estudo de citotoxicidade *in vitro* dos fármacos CDDP e CIAIPc incorporados em lipossomas associada à radiação ionizante

Inicialmente as células foram plaqueadas e tratadas com os sistemas lipossomais conforme descrito na seção 3.3.6.2. Após incubação com os lipossomas no período de 3 horas, as células foram irradiadas em um acelerador linear de partículas Siemens (Figura 10) de energia de 6 MV operando na geração de fótons, foi adicionado um bólus de 1,5 cm abaixo das placas para direcionamento da região da dose máxima (*build-up*) a superfície de contato das células. O procedimento foi realizado com giro de 180° do gantry. Sequencialmente as células foram cuidadosamente lavadas por duas vezes com tampão PBS 1X e novamente incubadas (37°C e 5 % CO₂) com meio DMEM 10% .

A viabilidade celular foi avaliada 24 horas após a exposição à radiação, empregando-se o protocolo de viabilidade celular – Resazurina descrito na seção 6.5.5.

Figura 10 - Acelerador Linear Siemens Primus com energia de 6 MV

6.6.4 - Identificação do tipo de morte celular (Apoptose e necrose)

A análise de detecção de morte celular por apoptose e necrose foi realizada em células tratadas (6.6.4). No entanto, somente o tempo de 24 h após o tratamento foi avaliado.

A indução de apoptose e/ou necrose foi detectada com o uso do reagente *Guava Nexin* [corantes: anexina-V-PE – que identifica externalização de fosfatidilserina (células em apoptose), e 7-AAD que identifica rupturas de membrana (células em necrose)], seguindo-se o protocolo do fabricante (Guava Technologies). Em resumo, após 24 h as células foram centrifugadas (1000 rpm, 4 °C por 5 minutos) e ressuspendidas em 150 µL de meio de cultura e incubadas com 50 µL do reagente por 20 minutos, 25 °C no escuro. Logo em seguida, o material foi analisado no citômetro de fluxo (*Guava EasyCyte 8HT*, Millipore) usando *Guava CytoSoft 4.2.1 Software Environment* – módulo *Guava Nexin*, com um total de 5.000 eventos adquiridos para cada amostra.

6.4 – Análises estatísticas e softwares

Os valores obtidos experimentalmente foram calculados empregando-se o programa *Excel Microsoft 2010* e as análises estatísticas foram realizadas no programa *Prism 7.0* através dos testes de análise de variância (*One-way Anova*) sendo *Turkey* o pós-teste aplicado. Todos os espectros obtidos nos estudos de absorção uv-vis foram *plotados* utilizando-se o software *Igor-Pro® Wavemetrics 3.16β01* (versão científica). Os gráficos e equações obtidos

para na determinação das curvas de quantificação foram *plotados* utilizando-se o software *OriginPro8.5*.

VII – Resultados e Discussões

Parte 1 – Desenvolvimento e caracterização físico química dos sistemas lipossomais

7.1. – Determinação do tamanho de partícula por espalhamento dinâmico de luz

Neste trabalho foram empregados dois métodos de preparo das vesículas lipídicas. Inicialmente empregou-se o método de injeção etanólica devido as suas vantagens tais como fácil escalonamento industrial, obtenção de partículas em tamanho médio de 100 nm, encapsulamento suscetível a drogas lipofílicas, gasto energético reduzido, aumento na estabilidade da formulação devido à ausência de forças mecânicas que poderiam resultar na degradação dos lipídios ou do fármaco e, assim como aceitabilidade do solvente orgânico etanol pelos órgãos regulamentadores devido ao baixo risco a saúde e meio ambiente (55). Entretanto a incorporação de altas concentrações dos princípios ativos se apresentou inviabilizada pelo método, a baixa energia fornecida no processo seria insuficiente para manter as vesículas lipídicas estáveis, quando aumentada a taxa dos lipídios na formulação ocorria sedimentação das partículas em poucos dias, conforme sequencialmente discutido na presente seção. Sendo assim foi necessária avaliação de outra metodologia de preparo, o método de formação de filme lipídico seguido por extrusão em membrana de policarbonato, segundo a literatura seria o mais indicado, uma vez que sua maior vantagem é a alta taxa de incorporação de substâncias lipossolúveis e hidrossolúveis devida ao aumento da concentração de lipídios empregados na formulação (55). A Tabela 3 abaixo indica os principais métodos para preparação de lipossomas.

Tabela 1 - Métodos de preparação de lipossomas e vesículas extraída de (30)

Método	Vesículas
Métodos mecânicos	
Vortex ou agitação manual para dispersão do fosfolipídio	MLV
Extrusão por membranas de policarbonato em pressão baixa ou média	OLV, LUV
Extrusão por célula <i>French press</i> pela técnica microfluidificante	Principalmente SUV
Homogeneização a alta pressão	Principalmente SUV
Ultrassonificação	SUV de tamanho mínimo

Borbulhamento de gás	BSV
<i>Método baseado substituição do solvente orgânico pelo meio aquoso</i>	
Remoção do solvente orgânico	MLV, OLV, SUV
Uso de solventes imiscíveis em água: éter e petróleo	MLV, OLV, SUV
Método de injeção etanólica	LUV
Infusão de éter (vaporização do solvente)	LUV, OLV, MLV
Evaporação da fase reversa	LUV
<i>Métodos baseados na remoção de detergente</i>	
Cromatografia de exclusão em gel	SUV
Diálise lenta	LUV, OLV, MLV
Diluição rápida	LUV, OLV
Outras técnicas relacionadas	MLV, OLV, LUV, SUV

Inicialmente os lipossomas desenvolvidos neste trabalho foram caracterizados determinando-se o tamanho de partícula (diâmetro hidrodinâmico), índice de polidispersidade (PdI) das populações e potencial Zeta na ausência e presença do fármaco antineoplásico (CDDP) e fotossensibilizantes (CIAIPc e ZnPc), assim como nas associações.

Os parâmetros acima foram determinados conforme descrito na seção experimental (6.3.1 e 6.3.2), sendo necessários para a verificação da eficiência do protocolo de preparo das formulações.

Nestas análises físico-químicas compararam-se os resultados obtidos na presença e ausência do fármaco (CDDP), assim como dos fármacos fotossensibilizantes (CIAIPc e ZnPc) e nas seguintes associações: CDDP – ZnPc (método de injeção etanólica), CDDP – CIAIPc (método de formação de filme lipídico). Demonstrando de forma direta a influência da incorporação destes nos sistemas coloidais (Tabela 4 e 5).

Tabela 2 - Valores de tamanho de partícula, PdI e potencial zeta do método de preparação lipossomal por injeção etanólica na ausência, presença e associações dos fármacos CDDP e ZnPc

	Tamanho (d.nm)	PdI	Potencial (mV)	Zeta
<i>Lipo</i>	107,6 ± 19	0,258 ± 0,08	-33,8 ± 5,4	
<i>Lipo CDDP</i>	113,4 ± 1	0,178 ± 0,01	-35,7 ± 2,9	
<i>Lipo ZnPc</i>	114,1 ± 1	0,171 ± 0,02	-33,7 ± 0,6	
<i>Lipo CDDP – ZnPc</i>	109,5 ± 6,3	0,217 ± 0,05	-13,2 ± 0,3	

*todas as amostras foram produzidas em triplicata

Os resultados apresentados na Tabela 4 indicam tamanho médio das vesículas em 107,6 nm na ausência dos fármacos e, tamanhos médios de 109,5 a 114,1 nm quando houve a incorporação das moléculas. Estes resultados indicam uma leve influência do encapsulamento dos fármacos no tamanho das vesículas coloidais. Porém o parâmetro analisado se enquadra a faixa de trabalho desejada (100 – 200 nm), apresentando baixa variação de tamanhos de partículas tendo valores de índice de polidispersidade (PdI) na ordem de 0,109 a 0,258, demonstrando heterogeneidade condizente com os parâmetros de nanotecnologia farmacêutica. Os valores de potencial zeta das vesículas apresentaram-se na ordem de -33,8 mV na ausência dos fármacos e, na faixa de – 13,2 a – 35,7 mV na presença das moléculas incorporadas. Indicando carga superficial predominantemente negativa resultado do balanço de cargas dos fosfolipídios, colesterol e estrutura química dos fármacos empregados. Segundo a literatura a faixa de estabilidade eletrostática para este parâmetro físico químico abrange resultados em módulo maiores que 30 mV (44;57). Quando associamos CDDP – ZnPc observou-se leve aumento do potencial, apresentando valores na ordem de -13,2 mV. A interação entre as moléculas estariam influenciando diretamente no equilíbrio iônico dos componentes estruturais dos lipossomas repercutindo diretamente na estabilidade do sistema, uma vez que a carga superficial das partículas predominantemente negativa ou positiva confere ao sistema forças repulsivas suficientes para retardar o processo de agregação proveniente da movimentação das mesmas. Conforme os dados apresentados, o método de produção de lipossomas por injeção etanólica (LIE) demonstrou-se adequado para formação de vesículas nanométricas, de baixa dispersão do tamanho e carga superficial condizente com os parâmetros de estabilidade eletrostática.

Tabela 3 - Valores de tamanho de partícula, PdI e potencial zeta do método de preparação lipossomal por filme lipídico na ausência, presença e associações dos fármacos CDDP e CIAIPc

	Tamanho (d.nm)	PdI	Potencial (mV)	Zeta
<i>Lipo</i>	105,3 ± 0,6	0,09 ± 0,004	-8,52 ± 1,7	
<i>Lipo CDDP</i>	106,3 ± 0,2	0,13 ± 0,007	-7,33 ± 0,7	
<i>Lipo CIAIPc</i>	107,5 ± 0,6	0,12 ± 0,016	-9,61 ± 0,3	
<i>Lipo CDDP – CIAIPc</i>	118,8 ± 2,3	0,14 ± 0,018	-8,52 ± 0,9	

*todas as amostras foram produzidas em triplicata

Os resultados apresentados na Tabela 5 indicam tamanho médio das vesículas em 105,3 nm na ausência dos fármacos e, tamanhos médios de 106,3 a 118,8 nm quando houve a incorporação das moléculas. Estes resultados indicam uma leve influência do encapsulamento dos fármacos no tamanho das vesículas coloidais quando associado CDDP - CIAIPc, entretanto sem apresentar alterações significativa, uma vez que ocasionou-se o aumento das vesículas em aproximadamente 10 nm. O parâmetro analisado se enquadra a faixa de trabalho desejada (100 – 200 nm), assim como baixa variação de tamanhos de partículas tendo valores de índice de polidispersidade (PdI) até 0,14. Segundo a literatura esta faixa de valores indicam partículas monodispersas demonstrando homogeneidade do sistema (58), este comportamento está relacionado a otimização do método de preparo. Quando adicionamos a etapa de extrusão ao processo, as vesículas maiores que 100 nm foram retidas na membrana de polycarbonato. A influência de parâmetros tais como material constituinte da membrana, temperatura do processo, ciclos de passagens, pressão empregada, fluidez das vesículas lipídicas, homogeneidade do filme lipídico e tempo de ultrassonificação repercutem diretamente na qualidade dos lipossomas obtidos. Os valores de potencial Zeta das vesículas se encontram na ordem de -8,52 mV na ausência dos fármacos e, na faixa de – 4,6 a – 9,61 mV na presença das moléculas incorporadas. Estes valores demonstraram carga superficial levemente negativa, fora da faixa de estabilidade governada por fatores eletrostáticos que abrange resultados em módulo maiores que 30 mV. Segundo Lasic, os sistemas lipossomais não são termodinamicamente estáveis, uma vez que praticamente todas as técnicas de formação destas vesículas requerem dissipação de energia durante o processo. Desta forma a estabilidade físico-química deste sistema implica em vários parâmetros tais como concentração, pureza e presença de produtos de degradação dos lipídios, assim como temperatura, tamanho de

partícula, carga e força iônica (48). Conforme os dados apresentados, o método de produção de lipossomas por formação de filme lipídico seguida por extrusão (LFLE) demonstrou-se adequado para formação de vesículas nanométricas, de dispersão homogênea, embora a carga superficial apresentar-se fora dos parâmetros descritos para estabilidade eletrostática.

Apenas os resultados sequencialmente discutidos referentes às análises do monitoramento em função do tempo da estabilidade físico-químico e estudo espectroscópico descritas nas seções (6.3.4) indicaram a melhor metodologia de preparo dos lipossomas que atendam as necessidades propostas neste trabalho.

7.1.2. – Monitoramento da estabilidade físico-química em função do tempo

Ao se trabalhar com veículos coloidais, é imprescindível a avaliação de sua estabilidade físico-química levando em consideração a interação química do sistema fármaco/veículo e as possíveis alterações resultantes de aditivos externos à formulação, em função do tempo de estocagem em condições apropriadas (74).

O monitoramento da estabilidade físico-química em função do tempo foi realizado conforme descrito na seção experimental (6.3.3), investigou-se a presença de alterações nos seguintes parâmetros: tamanho de partículas, potencial Zeta e polidispersidade das formulações LIE e LFLE durante 30 dias (Figura 11 e 12), com estocagem à 25°C e 4°C, respectivamente.

Figura 11 - Estudo de estabilidade avaliando-se o tamanho de partícula (A), índice de polidispersidade (B) e potencial zeta (C) dos LIE em função do tempo. A significância estatística das diferenças em relação ao tempo inicial foi determinada pelo teste de análise e variância *One-Way Anova* seguido do pós teste *Tukey t-test* para múltiplas comparações (* $p < 0,05$)

A Figura 11 apresenta para as vesículas LIE valores de tamanho abaixo de 150 nm, sem modificações significativas de PdI no período de 20 dias. Entretanto a vesícula contendo o fotossensibilizante ZnPc apresentou aumento de aproximadamente 2 vezes do tamanho (de 100 a 200 nm) na leitura referente a 30 dias de monitoramento, conforme indicado pelo seta em vermelho no gráfico (Figura 11-A). Este resultado indica instabilidade do sistema para a incorporação do FF, uma vez que o aumento observado é decorrente da aglomeração das vesículas, evidenciada pela sedimentação da amostra no mesmo período de análise.

As ftalocianinas são moléculas lipofílicas que quando presentes em meio aquoso tendem a se agregarem, desta forma o aumento das vesículas pode estar relacionado a ocorrência do fenômeno descrito a partir das moléculas do FF dispersas na fase aquosa do lipossoma. O aumento da taxa de lipídios da formulação representaria uma alternativa a fim

de estabilizar as moléculas na camada fosfolipídica das vesículas inibindo a interação entre as mesmas. Porém o método empregado (LIE) se limita a utilização de baixas taxas de lipídios, uma vez que a energia gerada no processo seria insuficiente para estabilizar as vesículas ao longo do tempo. Sendo assim o método de preparo por injeção etanólica seria incompatível com a proposta de incorporação da ZnPc em lipossomas nanoestruturado conforme abordado neste projeto.

Figura 12 - Estudo de estabilidade avaliando-se o tamanho de partícula (A), índice de polidispersidade (B) e potencial zeta (C) dos LFLE em função do tempo. A significância estatística das diferenças em relação ao tempo inicial foi determinada pelo teste de análise de variância *One-Way* ANOVA seguido do pós teste *Tukey t-test* para múltipla comparações ($*p < 0,05$)

A Figura 12 apresenta para as vesículas LFLE valores de tamanho abaixo de 150 nm no período de 30 dias. Entretanto quando associada CDDP-CIAIPc observa-se aumento de 40 nm do tamanho dos lipossomas a partir de 7 dias de monitoramento (Figura 12–A), resultado semelhante ocorreu nas análises referente ao PDI onde o valores migraram da faixa de sistema

monodisperso (0,1) para valores de baixa polidispersidade (0,25) (Figura 12–C) indicando a leve presença de populações de partículas de diferentes tamanhos. Tal comportamento está relacionado ao fenômeno de coalescência daquelas, valores relativamente baixos de potencial Zeta poderia justificar tal resposta devida a força iônica insuficiente para promover a estabilidade dos sistemas influenciando de forma direta na repulsão e atração das partículas, conforme mostrado no gráfico referente ao parâmetro discutido (Figura 12-B). A interação molecular dos fármacos CDDP-CIAlPc poderia estar gerando forças atrativas provenientes dos átomos metálicos platina (Pt) e alumínio (Al₃) presentes nas moléculas. Dados recentes na literatura indicam que o fotossensibilizante tende a se complexar na cabeça de grupo polar dos fosfolípidios, esta interação poderia resultar alterações na carga superficial da partícula (59).

Os resultados discutidos acima indicam os sistemas LFLE físico-quimicamente estáveis no período de 30 dias apesar das pequenas alterações encontradas na associação dos fármacos CDDP - CIAlPc. O método aplicado permitiu obter vesículas lipídicas com tamanho médio em 100 nm, assim homogeneidade do diâmetro hidrodinâmico, indicando melhorias no processo em relação aos dados obtidos pelo método LIE.

7.1.3. – Determinação do espectro de absorção dos fotossensibilizantes CIAlPc e ZnPc em uv-visível

As ftalocianinas são fármacos fotossensibilizantes amplamente aplicados em Terapia Fotodinâmica (TFD) devido a sua proeminente absorbância ($> 10^5 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) na região do vermelho (660-700 nm) no espectro de luz visível (Figura 16), enquadrando-se a faixa denominada como “janela fotodinâmica” (650-850 nm), a qual normalmente não há absorbância de luz por cromóforos endógenos tais como ácido nucléicos e proteínas, sendo considerada a região de maior transparência biológica (60). A aplicação dessa classe de compostos em TFD foi primeiramente sugerida por Ben-Hur e Rosenthal (1985) e desde então tem sido extensivamente estudados para tal proposta (61). Suas principais características são: estabilidade química, baixa toxicidade, alto rendimento quântico da espécie de oxigênio no estado singlete, baixa fotodegradação, farmacocinética favorável e afinidade pelo tecido tumoral devido a propriedade lipofílica da molécula (44;62). As ftalocianinas possuem duas bandas características quando analisadas por espectroscopia de absorção em uv-visível, sendo uma delas localizada na região do ultravioleta (300-350 nm) e outra na região do visível (600-700 nm), denominadas como banda B ou Soret e banda Q, respectivamente (49).

Figura 13 - Padrão de ZnPc (0,7 mmol.L⁻¹) em etanol analítico

A Figura 13 apresenta o conjunto característico de bandas de absorção das ftalocianinas para as transições eletrônicas ($S_0 - S_1$) do tipo $\pi \rightarrow \pi^*$ na região de 300 a 400 nm no ultravioleta (banda B) e, para as transições vibracionais ($S_0 - S_2$) na região de 600 a 700 nm na região do vermelho (banda Q). A molécula em ambiente químico em etanol analítico apresenta duas bandas principais que estão relacionadas a forma monomérica desta classe de compostos (62), desta forma o perfil obtido neste meio químico foi utilizado como referência para comparação do perfil de absorção das ftalocianinas ClAlPc e ZnPc incorporadas aos lipossomas LIE e LFLE.

Figura 14 - Perfil dos espectros de absorção dos lipossomas LIE contendo ZnPc ($5 \mu\text{mol.L}^{-1}$) (—) e na associação ZnPc - CDDP ($5 \mu\text{mol.L}^{-1}$ – $15 \mu\text{mol.L}^{-1}$) (—)

A Figura 14 apresenta os espectros de absorção da ftalocianina ZnPc incorporada ao lipossoma LIE. Comparando-se com o perfil de referência deste fármaco fotossensibilizante (Figura 13) em meio orgânico, notamos a preservação da banda Q em ambas as incorporações, esta região é responsável pela absorção seletiva da luz no processo de TFD, assim como a transferência de energia para geração das EROs. Apesar de ligeira supressão da absorbância da ZnPc quando associado ao fármaco CDDP, o pico máximo de absorção se manteve em 674 nm. A supressão da absorbância pode estar relacionada a interações intramoleculares dos fármacos e lipídios das vesículas. Estudos recentes mostram alterações nas propriedades fotofísicas da ftalocianina decorrente do aumento da taxa do lipídio de cadeia saturada DOPC na estrutura das vesículas lipídicas (59). Dos dados apresentados podemos afirmar que a incorporação dos fármacos nos lipossomas LIE não alterou o perfil espectroscópico da ftalocianina ZnPc, preservando desta forma as propriedades fotofísicas do fotossensibilizante.

Em complementação aos resultados apresentados na Figura 14, foi realizado o monitoramento do perfil espectroscópico ao longo do tempo até supressão do pico do fotossensibilizante ZnPc. A Figura 15 apresenta preservação da banda Q (650 – 700 nm) característica da ftalocianina ZnPc quando associada ao fármaco CDDP, porém observamos supressão da absorbância de 0,8 a 0,4 em apenas 3 dias. Conforme abordado na seção anterior

(4.1.2) o comportamento observado está relacionado a tendência da ftalocianina a se complexar à cabeça polar dos fosfolipídios da camada lipídica.

Figura 15 - Monitoramento do perfil dos espectros de absorção dos lipossomas LIE nas associações ZnPc-CDDP ($5\mu\text{mol.L}^{-1}$ – $15\mu\text{mol.L}^{-1}$) por 3 dias

A Figura 16 apresenta as bandas B (300 a 400 nm) e Q (600 a 700 nm) características da ftalocianina ClAlPc na sua forma monomerizada em meio etanólico (Figura 16-A). Quando comparada ao perfil espectroscópicos da mesma incorporada ao lipossoma LFLE (Figura 16-B), observa-se ligeiro deslocamento batocrômico do pico máximo de absorção (672 – 674 nm), sem alterações na propriedade fotofísica do FF. O mesmo ocorreu nas associações do fotossensibilizante ao fármaco CDDP (Figura 16-C). O pico máximo de absorbância em 674 nm se manteve estável em até 15 dias de análises.

Os dados apresentados nesta seção indicaram incorporação bem sucedida dos fármacos fotossensibilizantes ZnPc e ClAlPc nos sistemas lipossomais nanoestruturado LIE e LFLE, respectivamente. Conforme apresentado o método de preparação LFLE possibilitou a preservação das bandas características do FF assim como a intensidade de absorbância da molécula em até 15 dias. Estas características indicam o sistema apropriado para geração de espécies reativas por aplicação de TFD.

Figura 16 - Padrão de CIAIPC (1,5 mmol.L⁻¹) em etanol analítico (A). Monitoramento do perfil dos espectros de absorção dos lipossomas LFLE incorporado com CIAIPC (2,5 x 10⁻⁴mol.L⁻¹)(B) e, nas associações CIAIPC-CDDP (2,2 x 10⁻⁴e 8 x 10⁻⁶ mol.L⁻¹) (C) por 15 dias

7.1.4. – Determinação da curva padrão de quantificação da ClAlPc por espectroscopia de absorção em uv-visível

Desenvolveu-se um método analítico validado para a quantificação do fármaco fotossensibilizante ClAlPc na formulação lipossomal. A curva de calibração foi elaborada a partir da técnica de espectroscopia de absorção em uv-visível, conforme descrito na seção experimental (6.4.1).

Foram preparadas soluções estoque em triplicata ($n=3$) de ClAlPc nas concentração de $1,9 \times 10^{-4}$. Com auxílio de um conjunto de microseringas prepararam-se, por diluições sucessivas, uma série de soluções com concentrações conhecidas na faixa de $9,5 \times 10^{-8}$ a $8,6 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ em THF diretamente na cubeta de quartzo de 1,0 cm de caminho óptico. Os espectros de absorbância foram traçados em THF com grau de pureza analítica, mantendo-se constantes todos os parâmetros instrumentais, sob agitação em vortex e temperatura ambiente de 25°C.

As Figuras 17 ilustra a relação linear crescente entre os máximos de absorbância ($\lambda_{\text{máxima}}$) da ClAlPc, registrados com exatidão em 674 nm em função da concentração molar crescente das amostras.

Figura 17 - Espectro da curva padrão de calibração para quantificação do fármaco fotossensível ClAlPc em THF ($n = 3$); $\lambda_{\text{máxima}} = 674 \text{ nm}$, faixa de concentração de $9,5 \times 10^{-8}$ a $8,6 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$

A escolha do THF como solvente para elaboração da curva baseou-se na boa solubilidade dos ativos e componentes da formulação lipossomal em estudo.

Sendo assim, foi possível estabelecer uma relação linear que permitiu a determinação da inclinação e equação da reta a partir dos pontos experimentais. A curva apresentou uma linearidade dentro dos padrões necessários para se estabelecer um método analítico padrão, com desvios quadráticos médios próximos à unidade. Esta metodologia analítica de quantificação e doseamento de fármaco foi validada estatisticamente como descrito por Siqueira-Moura e colaboradores (49).

Para se determinar a concentração da CIAIPc na formulação, utilizou-se a curva padrão de calibração por espectroscopia de absorção uv-vis apresentada na Figura 18.

Figura 18 - Curva padrão de calibração para quantificação do fármaco fotossensível CIAIPc em THF (n = 3); $y = 215857x + 0,03539$, $R^2 = 0,9993$, $\lambda_{\text{máxima}} = 674 \text{ nm}$, faixa de concentração de $9,5 \times 10^{-8}$ a $8,6 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$

O rompimento das partículas foi realizado conforme descrito por Siqueira-Moura e colaboradores (49). Inicialmente adicionou-se 60 μL da formulação em 60 μL de DMSO, após homogeneização durante 30 minutos em banho ultrassônico, a amostra foi à cubeta

quartzo e volume ajustado a 2 mL em THF. Posteriormente a quantidade dos fármacos foi dosada em espectroscopia de absorção nas mesmas condições experimentais do protocolo padrão. A técnica possibilitou calcular a concentração do fármaco CIAIPc incorporados nos lipossomas, os valores obtidos estão demonstrados na Tabela 6. Este ensaio experimental é de grande importância para se validar a quantidade real dos fármacos, fator crucial para se determinar a eficiência e reprodutibilidade de todos os estudos subsequentes envolvendo a formulação.

Tabela 4 - Concentração ($\mu\text{mol.L}^{-1}$) dos fármacos CIAIPc incorporado no lipossoma LFLE

	CIAIPc	CIAIPc + CDDP
Concentração CIAIPc		
(mol.L⁻¹)	$2,5 \times 10^{-4}$	$2,2 \times 10^{-4}$

7.1.5. – Determinação da curva padrão de quantificação da CDDP por espectrometria de absorção atômica

A CDDP é um fármaco antineoplásico alquilante, sua estrutura química é composto por um átomo central de platina envolto por dois átomos de amina primária (NH_3) ligado a dois átomos de cloro (Cl) (75). A biotransformação da molécula ocorre dentro da célula, cujo ambiente apresenta baixa concentração de íons de cloreto. Nestas condições ocorre a substituição do íon cloreto por moléculas neutras de água para formar espécies reativas carregadas positivamente que atuam como agentes de metilação no material genético (DNA). Há uma forte interação com DNA nas regiões contendo unidades adjacentes de guanina formando ligações covalentes Pt-DNA na mesma fita (cross-linking intrafita) (63) (Figura 19).

Figura 19 - Ativação de mecanismo de ação da CDDP dentro das células adaptado de (76)

Para se determinar a concentração da CDDP na formulação, utilizou-se a curva padrão de calibração por espectrometria de absorção atômica apresentada na Figura 20.

Figura 20 - Curva padrão de calibração para quantificação do metal Platina em PBS ($n = 3$); $y = 0,0002x + 0,0006$, $R^2 = 0,9995$, $\lambda_{\text{máxima}} = 265,9 \text{ nm}$, faixa de concentração de 100 a 400 $\mu\text{g.L}^{-1}$

As análises foram realizadas apenas com diluição das partículas, uma vez que a alta temperatura empregada no programa de aquecimento descrito na seção experimental (6.4.2), aplicado no método de espectrometria de absorção atômica, é suficiente para eliminar

quaisquer interferentes das amostras, desta forma quantificando apenas a platina. Após diluição de 1:100 (LIE) e 1:50 (LFLE) em PBS 1X, a quantidade de Pt ($\mu\text{g.L}^{-1}$) foi dosada empregando o método nas mesmas condições experimentais do protocolo padrão. Para a determinação da quantidade da Cisplatina foi realizado o cálculo estequiométrico a partir da proporção da massa do metal Pt na molécula (65,02%). Este ensaio experimental é de grande importância para se validar a quantidade real do fármaco, fator crucial para se determinar a eficiência e reprodutibilidade de todos os estudos subsequentes envolvendo a formulação.

A técnica possibilitou calcular a concentração do fármaco CDDP incorporado nos lipossomas LIE e LFLE, os valores obtidos estão demonstrados na Tabela 7.

Tabela 5- Concentração ($\mu\text{mol.L}^{-1}$) do fármaco CDDP incorporado no lipossoma LIE e LFLE

	CDDP (LIE)	CDDP + Pc (LIE)	CDDP (LFLE)	CDDP + Pc (LFLE)
Concentração				
CDDP ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)	18	15	9,2	12

7.2 – Conclusão Parcial – Parte I

Ao término da primeira parte do trabalho de dissertação, pode-se concluir que a proposta de desenvolvimento e caracterização do sistema lipossomal nanoestruturado para veiculação dos fármacos foi realizada com sucesso. Empregando-se o método de produção lipossomal por formação de filme lipídico seguido de extrusão (LFLE) obteve-se formulações com propriedades físico-químicas estáveis no período de 30 dias condizente para o sistema proposto, de acordo com a tecnologia farmacêutica a etapa de liofilização pode ser adicionada ao método a fim de reduzir a cinética das partículas, repercutindo no aumento da estabilidade e viabilizando comercialização da formulação (55). Conforme proposto nos objetivos do projeto, o sistema possui propriedades nanotecnológicas, alta compatibilidade biológica e eficiência adequada de incorporação dos fármacos. Apesar da baixa concentração do fármaco Cisplatina ($\sim 10 \mu\text{mol.L}^{-1}$) na formulação final, os lipossomas foram empregados nos estudos sequenciais deste trabalho, uma vez que a proposta consiste em utilizar DDS para promover a liberação sustentável do fármaco.

Em acréscimo a associação CDDP ao fármaco fotossensibilizante ClAlPc não apresentou alterações no perfil espectroscópico do FF, conferindo à formulação as propriedades necessárias para utilização em ensaios *in vitro* e testes biológicos empregando-se TFD a partir do uso de laser de baixa potência.

Desenvolveu-se também um método analítico espectrofotométrico eficiente e reprodutível, para a quantificação da Ftalocianina de Cloro-Alumínio, fármaco fotossensibilizante utilizado em TFD.

Parte II – Estudos *in vitro*

7.3.1 – Determinação da dose do fármaco CDDP

Avaliou-se inicialmente a citotoxicidade do fármaco CDDP aplicado em células do tipo carcinoma epidermóide (OSCC) e glioblastoma humano (U87MG) na ausência de luz e radiação ionizante. A escolha do tipo de célula para os estudos *in vitro* baseou-se na necessidade de avaliar o efeito do fármaco em linhagens tumorais distintas tendo a U87MG como padrão de resistência e a OSCC como suscetibilidade à ação da CDDP. Além de utilizar a cultura em monocamada como método comparativo e também como etapa precursora ao protocolo de desenvolvimento do modelo de cultura tridimensional para obtenção dos esferoides.

A avaliação citotóxica é um ensaio preliminar de suma importância que demonstra diretamente a faixa de concentração adequada para administração *in vitro* do fármaco livre em um intervalo de segurança biológica e com eficácia no tratamento do alvo biológico.

Estes estudos foram realizados empregando-se o teste de viabilidade celular com Resazurina para avaliação do mecanismo mitocondrial, como descrito anteriormente na seção experimental (6.5.5). As amostras foram incubadas nas concentrações de 5,0; 15; 25; 35 e 45 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, como descrito em protocolos descritos na literatura (51;64)

Figura 21- Ensaio *in vitro* de citotoxicidade da CDDP em cultura de OSCC. C = controle; 5; 15; 25; 35 e 45 = concentração da CDDP ($\mu\text{mol.L}^{-1}$). Teste na ausência de luz e radiação ionizante. A significância estatística das diferenças entre as doses de foi determinada pelo teste de análise de variância *One-way* Anova seguido pós-teste *Tukey t-test* para múltiplas comparações ($p < 0,05$)

Os resultados da Figura 21 mostram redução da proliferação celular da linhagem OSCC para todas as concentrações administradas do fármaco CDDP após período de 24 horas de incubação, entretanto conforme análise estatística obteve-se resposta significativa a partir da dose de $15 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ($< 20\%$) em relação ao grupo controle, e entre as doses 15 e $45 \mu\text{mol.L}^{-1}$ quando comparadas os grupos referentes ao tratamento, apresentando redução da proliferação em até 40% quando administrada a dose de $45 \mu\text{mol.L}^{-1}$.

Figura 22 - Ensaio *in vitro* de citotoxicidade da CDDP em cultura de U87MG. C = controle; 5; 15; 25; 35 e 45 = concentração da CDDP ($\mu\text{mol.L}^{-1}$). Teste na ausência de luz e radiação ionizante. A significância estatística das diferenças entre as doses de foi determina pelo teste de análise de variância *One-way* ANOVA seguido pós-teste *Tukey t-test* para múltiplas comparações ($*p < 0,05$)

Os resultados da Figura 22 mostram redução da proliferação celular da linhagem U87MG para todas as concentrações administradas do fármaco CDDP após período de 24 horas de incubação, assim como apresentado para linhagem OSCC obteve-se resposta significativa a partir da dose de $15 \mu\text{mol.L}^{-1}$ em relação ao grupo controle (até 20%). Entretanto quando comparadas os grupos referentes ao tratamento não ocorreu alterações significativas entre as doses administradas, indicando maior resistência da linhagem U87MG à ação do fármaco CDDP.

A partir dos dados obtidos pelo ensaio foi determinado a dose da CDDP de $5 \mu\text{mol.L}^{-1}$ para posterior avaliação da resposta biológica do mesmo incorporado nos sistemas lipossomais desenvolvidos conforme descrito na seção experimental (6.1 e 6.2).

7.3.2 – Determinação da dose de luz em TFD

Realizaram-se neste ensaio a avaliação direta do estímulo luminoso em monocamadas de células OSCC e U87MG. Estes estudos preliminares foram de suma importância para estabelecer condições ideais do emprego do laser à baixa potência. A partir dos resultados obtidos delinear-se os experimentos subsequentes associados ao uso dos sistemas lipossomais.

As estratégias empregadas nestes ensaios *in vitro* basearam-se na avaliação da resposta a fotoestimulação em função do tempo, além de adequação de um período ideal para a aplicação do estímulo luminoso após incubação. A viabilidade celular foi determinada através do conforme descrito na seção experimental (6.5.5.2), variando-se a dose/laser de 100; 250 e 500 mJ/cm^2 . A escolha dessas doses de luz baseou-se em estudos preliminares realizados no Grupo de Fotobiologia e Fotomedicina sob orientação do Prof. Dr. Antônio Cláudio Tedesco (44;65;66).

Na Figura 23 observamos fotoestimulação do crescimento celular de ambas linhagens quando irradiadas nas doses analisadas. A análise estatística indicou aumento significativo da proliferação das células irradiadas nas doses 100; 250 e 500 mJ/cm^2 em relação ao controle, sendo na dose de 100 mJ/cm^2 a maior porcentagem de estímulo (~ 40%). Estudos recentes mostram o desenvolvimento de equivalentes dermais humanos decorrente de fotoestimulação por aplicação de processos fotodinâmicos com laser visível a baixa potência (10 a 70 mJ/cm^2) e FF veiculado em cultura de fibroblastos gengivais (67). Desta forma foi determinada a dose

de 250 mJ/cm² para os estudos sequenciais, uma vez que nesta foi observado reposta biológica próximo ao controle em ambas linhagens conforme mostrado na Figura 24.

Figura 23 - Ensaio *in vitro* de citotoxicidade do laser-diodo 660 nm em cultura de OSCC e U87MG. 1= controle; 2 = 100 mJ/cm², 3 = 250 mJ/cm² e 4 = 500 mJ/cm². A significância estatística das diferenças entre as doses de foi determinada pelo teste de análise de variância *One-way ANOVA* seguido pós-teste *Tukey t-test* para múltiplas comparações (* $p < 0,05$)

Figura 24 - Micrografias das linhagens OSCC (A) e U87MG (B) quando irradiadas em laser-diodo no comprimento de 660 nm na dose de 250 mJ/cm²

7.3.3 – Determinação da dose de radiação ionizante em RT

Realizaram-se neste ensaio a avaliação direta do estímulo luminoso em monocamadas de células OSCC e U87MG. Estes estudos preliminares foram de suma importância para estabelecer condições ideais do emprego do acelerador linear em feixe de fótons a baixa energia. A partir dos resultados obtidos delinearam-se os experimentos subsequentes associados ao uso dos sistemas lipossomais.

As estratégias empregadas nestes ensaios *in vitro* basearam-se na avaliação da resposta a estimulação em função do tempo, além de adequação de um período ideal para a aplicação do estímulo em radiação ionizante após incubação. A viabilidade celular foi determinada através do conforme descrito na seção experimental (6.5.5.3), variando-se a dose/radiação de 2; 4 e 6 Gy. A escolha dessas doses de radiação baseou-se em estudos preliminares realizados na literatura (68;69).

Na Figura 25-A observamos estímulo do crescimento celular de da linhagem OSCC quando irradiadas nas doses analisadas. A análise estatística indicou aumento significativo da proliferação das células irradiadas nas doses de 2 Gy e 6 Gy em relação ao controle, sendo na dose de 2 Gy a maior porcentagem de estímulo (~ 40%). A linhagem U87MG não apresentou alterações significativas (Figura 25-B). A relação efeito-dose resultando em danos ao DNA tem mostrado linear no tratamento com radiação ionizante na taxa de fracionamento de 1 para 7 na dose de 2 Gy por fração (50).

Na Figura 26-A observamos que comprometimento da adesão das células OSCC após o estímulo a dose de 2 Gy, porém conforme apresentado no teste colorimétrico não houve alterações na viabilidade das células. Desta forma se estabeleceu a dose de 2 Gy pra aplicação nos estudos sequenciais com sistemas nanoestruturados.

Figura 25 - Ensaio *in vitro* de citotoxicidade da radiação ionizante em cultura de OSCC e U87MG. 1= controle; 2 = 2 Gy, 3 = 4 Gy e 4 = 6 Gy. A significância estatística das diferenças entre as doses de foi determinada pelo teste de análise de variância *One-way* ANOVA seguido do pós-teste *Tukey t-test* para múltiplas comparações (* $p < 0,05$)

Figura 26 - Micrografias das linhagens OSCC (A) e U87MG (B) quando irradiadas em acelerador de 6 MV a dose de 2 Gy

7.3.4 – Estudo de citotoxicidade in vitro dos fármacos CDDP e CIAIPc incorporados em lipossomas

A avaliação citotóxica dos sistemas nanonestruturado é um ensaio fundamental para determinação da eficácia do processo empregado para desenvolvimento das partículas, uma vez que o princípio da nanotecnologia farmacêutica consiste em veicular ativos ou ingredientes buscando melhorar a performance de liberação em relação às formulações convencionais (70).

Figura 27 - Ensaio *in vitro* de citotoxicidade dos lipossomas em cultura de OSCC (A) e U87MG (B). 1 = controle; 2 = formulação vazia; 3= CDDP incorporado na concentração ($1 \mu\text{mol.L}^{-1}$); 4 = CIAIPc incorporada na concentração ($10 \mu\text{mol.L}^{-1}$); 5 = CDDP + CIAIPc incorporados nas respectivas (1 e $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$). Teste na ausência de luz e radiação ionizante. A significância estatística das diferenças foi determinada pelo teste de análise de variância *One-way ANOVA* seguido pós-teste *Tukey t-test* para múltiplas comparações ($*p < 0,05$)

Os resultados da Figura 27 apresentaram leve redução da proliferação celular para ambas linhagens OSCC e U87MG (até 10%) em lipossomas na ausência e presença dos fármacos CDDP e CIAIPc após período de 24 horas de incubação conforme descrito na seção experimental (6.6.1), entretanto a análise estatística das alterações não resultaram em valores significativos.

Na Figura 28 os resultados referentes à avaliação em esferoides não apresentou alterações significativas dos grupos tratados com os fármacos veiculados em lipossoma em relação ao crescimento celular do controle para ambas as linhagens.

Figura 28 - Ensaio *in vitro* de citotoxicidade dos lipossomas em cultura 3D de OSCC (A) e U87MG (B). 1 = controle; 2 = formulação vazia; 3 = CDDP incorporado na concentração (1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$); 4 = CIAIPc incorporada na concentração (10 $\mu\text{mol.L}^{-1}$); 5 = CDDP + CIAIPc incorporados nas respectivas (1 e 10 $\mu\text{mol.L}^{-1}$). Teste na ausência de luz e radiação ionizante. A significância estatística das diferenças foi determinada pelo teste de análise de variância *One-way ANOVA* seguido pós-teste *Tukey t-test* para múltiplas comparações ($p < 0,05$)

A biocompatibilidade aliada a uma biodistribuição adequada proporcionam resultados que favorecem o emprego destas partículas em protocolos *in vivo*. Uma baixa citotoxicidade está diretamente relacionada à redução de efeitos colaterais ocasionados após administração sistêmica, tópica ou transdérmica de formulações (74).

Portanto, verificou-se que a formulação possui uma biocompatibilidade adequada permitindo a continuidade dos estudos posteriores com aplicação de laser e radiação ionizante, descartando-se qualquer interferente quanto à morte celular na ausência dos estímulos fotofísicos.

7.3.4.1 - Estudo de citotoxicidade *in vitro* dos fármacos CDDP e CIAIPc incorporados em lipossomas associada ao diodo-laser em 660 nm

O uso da TFD é de sumo interesse clínico como modalidade terapêutica alternativa para diversas variedades de cânceres, incluindo os iniciais em cabeça e pescoço. Esta patologia oral apresenta comportamento altamente agressivo e recorrente, viabilizando a aplicação da TFD, uma vez que a terapia pode ser repetida seguramente sem toxicidade acumulativa. Além de ser clinicamente aprovada como modalidade terapêutica, a TFD apresenta vantagens como absorção seletiva do FF no tecido tumoral quando irradiada em um comprimento de onda específico e, baixos efeitos adversos tais como dor durante o procedimento, edema e fotossensibilidade (71).

Estudos *in vivo* têm mostrado inibição de migração e invasão de células cancerígenas escamosas orais (OSCC) quando aplicado tratamento sinérgico de TFD em combinação a *nimotuzumab* (71). A indução de apoptose foi reportada em estudos *in vitro* avaliando o efeito de terapia em glioblastoma maligno humano (U87MG) (72).

Os resultados referentes à exposição das células ao laser-diodo na dose de 250 mJ/cm² apresentados na Figura 29-A indicam conforme discutido na seção (7.3.2), estímulo do crescimento celular para linhagem OSCC quando exposto à luz. Embora não tenham ocorrido alterações em relação ao controle nos grupos tratados com os sistemas lipossomais na presença e ausência dos fármacos CDDP; CIAIPc e CDDP-CIAIPc, a inibição do crescimento em relação ao grupo apenas irradiado indica influência das vesículas lipossomais na proliferação da linhagem. Segundo a literatura, a expressão de receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) em células OSCC apresenta-se elevada, estudos mostram que a TFD estimula o acúmulo nuclear de EGFR (73). Desta forma análises quantitativas por western blotting da molécula completariam os dados para compreensão do efeito das vesículas lipídicas associada ao estímulo luminoso nas células.

Os resultados apresentados na Figura 29-B indicam para linhagem U87MG redução (~25%) significativa da proliferação das células tratadas com CIAIPc e CDDP-CIAIPc incorporada nos vesículas lipossomais. Este dado indica a atenuação do estímulo fotofísico devida a absorção de energia pelo FF, desta forma o efeito citotóxico está relacionado a produção de EROs provenientes dos processos de transferência de energia da CIAIPc

Figura 29 - Ensaio *in vitro* de citotoxicidade dos lipossomas em cultura de OSCC (A) e U87MG (B). 1 = controle; 2 = laser 250 mJ/ cm⁻²; 3= lipossoma vazio, 4= CDDP incorporado na concentração (1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$); 5 = CIAIPc incorporada na concentração (10 $\mu\text{mol.L}^{-1}$); 6 = CDDP + CIAIPc incorporados nas respectivas (1 e 10 $\mu\text{mol.L}^{-1}$). A significância estatística das diferenças foi determinada pelo teste de análise de variância *One-way* ANOVA seguido pós-teste *Tukey t-test* para múltiplas comparações (* $p < 0,05$)

Os resultados apresentados na Figura 30 indicam que os esferoides não apresentaram alterações entre os tratamentos e controle para ambas linhagens.

Figura 30 - Ensaio *in vitro* de citotoxicidade dos lipossomas em cultura 3D de OSCC (A) e U87MG (B). 1 = controle laser 250 mJ/ cm⁻²; 2= lipossoma vazio, 3= CDDP incorporado na concentração (1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$); 4 = CIAIPc incorporada na concentração (10 $\mu\text{mol.L}^{-1}$); 5 = CDDP + CIAIPc incorporados nas respectivas (1 e 10 $\mu\text{mol.L}^{-1}$). A significância estatística das diferenças foi determinada pelo teste de análise de variância *One-way* ANOVA seguido pós-teste *Tukey t-test* para múltiplas comparações (* $p < 0,05$)

7.3.4.2 - Estudo de citotoxicidade *in vitro* dos fármacos CDDP e CIAIPc incorporados em lipossomas associada à radiação ionizante

O uso da RT como modalidade terapêutica em tumores sólidos é bem consolidada na clínica oncológica. Embora apresente resultados satisfatórios para variedade de cânceres, seu emprego em alguns tumores de cabeça e pescoço como o glioblastoma ainda não tem mostrado a eficiência esperada. A combinação de RT e quimioterapia convencional frequentemente apresenta alta toxicidade aos tecidos normais, as técnicas aplicadas para tratamentos de tumores cerebrais tem mostrado toxicidade ao tecido cerebral normal e medula. Desta forma o uso de uma dose apropriada para preservar a viabilidade dos tecidos da medula óssea é crucial para efetividade do tratamento (50).

Estudos mostram que pacientes portadores de carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço tratados com RT associada a quimioterapia a base de platina apresentaram melhorias tratamentos loco-regional com RT e quimioterapia no controle loco-regional, preservação do órgão e sobrevida. Embora alguns pacientes tenham desenvolvido quimio e radioressistência, apenas 50 – 60% apresentaram cura da doença (74). A compreensão dos mecanismos de resistência e a busca por melhorias na eficácia das terapias são os grandes desafios dos pesquisadores que atuam na oncologia.

Os resultados apresentados na Figura 31-A indicam assim como nos experimentos empregando luz em laser-diodo, estímulo do crescimento celular (~30%) para a linhagem OSCC quando irradiada na dose de 2 Gy no acelerador linear. Embora o tratamento com as vesículas lipossomais não tenha apresentado alterações em relação o controle, a análise completar com ensaio clonogênico é indicada para avaliação dos efeitos da radiação ionizante, uma vez que se avaliaram apenas 24 horas após exposição ao estímulo.

Os resultados apresentados na Figura 31-B indicaram leve redução da proliferação celular da linhagem U87MG quando exposta a radiação ionizante, tendo alterações significativas apenas na associação dos fármacos CDDP-CIAlPc incorporados em vesículas lipossomais (~20%). A resposta biológica não pode ser atribuída a potencialização do efeito radiológico apenas a presença do FF, uma vez que não ocorreu alterações no tratamento das células com lipossomas apenas na presença de CIAlPc.

Figura 31 - Ensaio *in vitro* de citotoxicidade dos lipossomas em cultura de OSCC (A) e U87MG (B). 1 = controle; 2 = dose 2Gy no AL; 3= lipossoma vazio, 4= CDDP incorporado na concentração ($1 \mu\text{mol.L}^{-1}$); 5 = CIAIPc incorporada na concentração ($10 \mu\text{mol.L}^{-1}$); 6 = CDDP + CIAIPc nas respectivas (1 e $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$). A significância estatística das diferenças foi determinada pelo teste de análise de variância *One-way ANOVA* seguido pós-teste *Tukey t-test* para múltiplas comparações (* $p < 0,05$)

Os resultados apresentados na Figura 32 indicam leve aumento da proliferação dos esferoides de ambas linhagens quando expostas a dose de 2 Gy de radiação ionizante associada ao tratamento com lipossomas na ausência dos fármacos. Embora ligeira redução do crescimento celular tenha sido observada para radiação ionizante combinada ao tratamento com os fármacos CDDP, CIAIPc e CDDP-CIAIPc incorporados em vesículas lipossomais, estes valores não apresentaram diferenças significativas em relação ao controle.

Figura 32 - Ensaio *in vitro* de citotoxicidade dos lipossomas em cultura 3D de OSCC (A) e U87MG (B). 1 = controle dose 2 Gy -; 2= lipossoma vazio, 3= CDDP incorporado na concentração ($1 \mu\text{mol.L}^{-1}$); 4 = CIAIPc incorporada na concentração ($10 \mu\text{mol.L}^{-1}$); 5 = CDDP + CIAIPc incorporados nas respectivas (1 e $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$). A significância estatística foi determinada pelo teste de análise de variância *One-way ANOVA* seguido pós-teste *Tukey t-test* para múltiplas comparações (* $p < 0,05$)

7.3.5 – Identificação do tipo de morte celular (apoptose e necrose)

A avaliação do tipo de morte celular foi realizada empregando o método de citometria de fluxo, o uso do marcador anexina V-PE possibilitou a identificar externalização de fosfatidilserina a qual está relacionada ao processo de apoptose celular, e processos necróticos foram avaliados com emprego do corante 7-AAD o qual identifica rupturas de membrana. O protocolo do fabricante (Guava Technologies) empregado no ensaio encontra-se descrito na seção experimental (6.6.4).

Os resultados apresentados nas Figuras 33 e 34 indicam a predominância de processos apoptóticos para ambas às linhagens quando tratada a associação dos fármacos CDDP e CIAIPc (~ 55%) veiculados em lipossomas empregando TFD e radiação ionizante,

isoladamente. Embora resposta semelhante tenha sido encontrada para os lipossomas contendo apenas CIAIPc (~ 45%), observou-se diferenças da resposta biológica para as linhagens quando associado o tratamento à radiação ionizante, apresentando processos apoptóticos para U87MG (61,70%) e OSCC (30,33%) indicando maior sensibilidade ao tratamento da células de glioblastoma. Os valores dos fármacos CDDP ($1 \mu\text{mol.L}^{-1}$) livre e veiculado nos sistemas lipossomais indicaram baixa morte apoptótica (< 15%). Estes resultados indicam o tratamento lipossomal associando CDDP-Pc com melhor resposta biológica sem apresentar diferenças significativas em relações as linhagens U87MG e OSCC, assim quanto aos estímulos por laser ou radiação ionizante.

Figura 33 – Gráfico referente a análise por citometria de fluxo após tratamento lipossomal associado TFD

Figura 34 - Gráfico referente a análise por citometria de fluxo após tratamento lipossomal associado RT

7.4. Conclusão Parcial – Parte II

Ao término da segunda parte do trabalho de dissertação, conclui-se a biocompatibilidade das vesículas lipossomais na presença e ausência do fármaco radiosensibilizante Cisplatina e, associado ao fármaco fotossensibilizante Ftalocianina de Cloro Alumínio, quando avaliadas em linhagens neoplásicas OSCC e U87MG em monocamada e no formato tridimensional de esferóides. Estes resultados corroboram com os objetivos propostos inicialmente pelo projeto de pesquisa.

O tratamento das linhagens com as vesículas lipossomais associadas à terapia fotodinâmica a baixa dose de 250 mJ/cm^2 apresentou potencialização do efeito terapêutico representando redução de até 25% da proliferação das células U87MG nas partículas nanoestruturadas com o fármaco fotossensibilizante ClAlPc. Embora redução da proliferação em relação ao controle irradiado tenha sido observado para a linhagem OSCC, estudos complementares com quantificação das taxas de EGFR são necessários para melhor compreensão das respostas biológica. Os dados referentes a identificação da morte celular indicaram apoptose das células neoplásicas ($> 50\%$) quando tratadas com lipossomas associando CDDP – ClAlPc empregando laser e radiação ionizante para ambas linhagens.

VIII – Conclusão

Os resultados da Parte I demonstraram a obtenção e a caracterização físico-química de um novo material com propriedades nanotecnológicas baseado em técnicas e protocolos de tecnologia farmacêutica, o qual está disponível para a veiculação de princípios ativos fotossensíveis e radiosensibilizadores empregados em processos fotodinâmicos e radiobiológicos. Realizou-se toda a caracterização das vesículas lipossomais demonstrando o potencial terapêutico dos fármacos CDDP e CIAIPc mesmo após a incorporação nos sistemas.

Os resultados da Parte II foram obtidos a partir de ensaios biológicos em cultura de células do tipo carcinoma epidermóide e glioblastoma de origem humana. Nesta etapa desenvolveram-se os protocolos biológicos, os estudos e a compreensão dos mecanismos presentes no processo de terapêutico dos fármacos CDDP e CIAIPc veiculados nos sistemas lipossomais, assim como associados entre si e, o emprego sinérgico com processos fotobiológicos e radiobiológicos a baixa dose. Realizou-se a avaliação biológica em um modelo tridimensional simples *in vitro* de estruturação tumoral. Este sistema pode ser funcionalizado e explorado em diversas áreas da saúde, disponibilizado para testes biotecnológicos os quais necessitem avaliar o comportamento da matriz extracelular e de cultura tridimensional de células humanas. Os dados obtidos mostraram baixa citotoxicidade dos fármacos quando veiculados nos sistemas lipossomais (~10%) e potencializam das respostas quando associado principalmente a terapia fotodinâmica à baixa dose (até 25%), indicando apoptose das células neoplásicas quando combinadas terapias..

Portanto, conclui-se que os resultados finais deste trabalho científico multidisciplinar, proporcionaram o desenvolvimento de protocolos, técnicas e conhecimentos inéditos, que contribuirão diretamente para o uso dos processos fotodinâmicos/radiobiológicos e da nanotecnologia em futuros ensaios clínicos e pré-clínicos na área da saúde humana.

IX - Referências

- (1) Pecorino L. Molecular biology of cancer: mechanisms, targets, and therapeutics. Oxford university press; 2012.
- (2) Weinberg RA. Mechanisms of malignant progression. Carcinogenesis 2008 Jun;29(6):1092-5.
- (3) Devita VT, Deisseroth AB. Oncology. JAMA 1996 Jun 19;275(23):1833-4.
- (4) Alberts B. The promise of cancer research. Science 2008 Apr 4;320(5872):19.
- (5) Brown JM, Wilson WR. Exploiting tumour hypoxia in cancer treatment. Nat Rev Cancer 2004 Jun;4(6):437-47.
- (6) Zhang Q, Chen Y, Zhang B, Shi B, Weng W, Chen Z, et al. Correction: Hypoxia-Inducible Factor-1alpha Polymorphisms and Risk of Cancer Metastasis: A Meta-Analysis. PLoS One 2013;8(10).
- (7) Nowara E, Suwinski R. Time factor in radiotherapy and chemotherapy for limited disease small-cell lung cancer. Cancer Invest 2007 Apr;25(3):163-71.
- (8) Seiwert TY, Cohen EE, Haraf DJ, Stenson K, Blair EA, Mauer A, et al. A phase I trial of docetaxel based induction and concomitant chemotherapy in patients with locally advanced head and neck cancer. Cancer Invest 2007 Sep;25(6):435-44.
- (9) Steel GG, Peckham MJ. Exploitable mechanisms in combined radiotherapy-chemotherapy: the concept of additivity. Int J Radiat Oncol Biol Phys 1979 Jan;5(1):85-91.
- (10) Bentzen SM, Trotti A. Evaluation of early and late toxicities in chemoradiation trials. J Clin Oncol 2007 Sep 10;25(26):4096-103.
- (11) Katz D, Ito E, Liu FF. On the path to seeking novel radiosensitizers. Int J Radiat Oncol Biol Phys 2009 Mar 15;73(4):988-96.

- (12) Campos CS, Salvajoli JV, Novaes PE, da Silva MG. Evaluation of the overall survival rates in locally advanced cervix cancer patients treated with radiotherapy alone and chemoradiation: A Brazilian experience. 2012 p. e15509.
- (13) Boulikas T, Vougiouka M. Cisplatin and platinum drugs at the molecular level. (Review). *Oncol Rep* 2003 Nov;10(6):1663-82.
- (14) Richmond RC, Khokhar AR, Teicher BA, Douple EB. Toxic variability and radiation sensitization by Pt(II) analogs in *Salmonella typhimurium* cells. *Radiat Res* 1984 Sep;99(3):609-26.
- (15) Yang LX, Douple EB, Wang HJ. Irradiation enhances cellular uptake of carboplatin. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1995 Oct 15;33(3):641-6.
- (16) Cividalli A, Ceciarelli F, Livdi E, Altavista P, Cruciani G, Marchetti P, et al. Radiosensitization by oxaliplatin in a mouse adenocarcinoma: influence of treatment schedule. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2002 Mar 15;52(4):1092-8.
- (17) Kraker AJ, Moore CW. Accumulation of cis-diamminedichloroplatinum(II) and platinum analogues by platinum-resistant murine leukemia cells in vitro. *Cancer Res* 1988 Jan 1;48(1):9-13.
- (18) Feng S, Huang G. Effects of emulsifiers on the controlled release of paclitaxel (Taxol) from nanospheres of biodegradable polymers. *J Control Release* 2001 Mar 12;71(1):53-69.
- (19) Mu L, Feng SS. A novel controlled release formulation for the anticancer drug paclitaxel (Taxol): PLGA nanoparticles containing vitamin E TPGS. *J Control Release* 2003 Jan 9;86(1):33-48.
- (20) Baroli B, Lopez-Quintela MA, Delgado-Charro MB, Fadda AM, Blanco-Mendez J. Microemulsions for topical delivery of 8-methoxsalen. *J Control Release* 2000 Oct 3;69(1):209-18.
- (21) Crvenkova S, Krstevska V. Sequential chemoradiotherapy compared with concurrent chemoradiotherapy in locally advanced non-small cell lung cancer: our experience. *Prilozi* 2009 Dec;30(2):197-207.

- (22) Barbugli PA, Alves CP, Espreafico EM, Tedesco AC. Photodynamic therapy utilizing liposomal ClAlPc in human melanoma 3D cell cultures. *Exp Dermatol* 2015 Dec;24(12):970-2.
- (23) Barbugli PA, Siqueira-Moura MP, Espreafico EM, Tedesco AC. In vitro phototoxicity of liposomes and nanocapsules containing chloroaluminum phthalocyanine on human melanoma cell line. *J Nanosci Nanotechnol* 2010 Jan;10(1):569-73.
- (24) Lira MC, Siqueira-Moura MP, Rolim-Santos HM, Galetti FC, Simioni AR, Santos NP, et al. In vitrouptake and antimycobacterial activity of liposomal usnic acid formulation. *J Liposome Res* 2009;19(1):49-58.
- (25) Maranhão DS, de Lima RG, Primo FL, da Silva RS, Tedesco AC. Photoinduced nitric oxide and singlet oxygen release from ZnPC liposome vehicle associated with the nitrosyl ruthenium complex: synergistic effects in photodynamic therapy application. *Photochem Photobiol* 2009 May;85(3):705-13.
- (26) Simioni AR, Pelisson MM, Beltrame M, Jr., Tedesco AC. Photophysical and photobiological studies of a silicon tribenzonaphthoporphyrizinato incorporated into liposomes for photodynamic therapy use. *J Nanosci Nanotechnol* 2008 Jun;8(6):3208-15.
- (27) Boisrame-Helms J, Delabranche X, Degirmenci SE, Zobairi F, Berger A, Meyer G, et al. Pharmacological modulation of procoagulant microparticles improves haemodynamic dysfunction during septic shock in rats. *Thromb Haemost* 2013 Oct 10;111(1).
- (28) Hosseini SM, Hosseini H, Mohammadifar MA, Mortazavian AM, Mohammadi A, Khosravi-Darani K, et al. Incorporation of essential oil in alginate microparticles by multiple emulsion/ionic gelatin process. *Int J Biol Macromol* 2013 Oct 8.
- (29) Hsu PY, Yang YW. Encapsulation of poly(d,l-lactide) microparticles with polyelectrolyte multilayers for antigen delivery. *J Microencapsul* 2013 Oct 14.
- (30) Xu Q, Li M, Niu J, Xia Z. Dynamic Enhancement in Adhesion Forces of Microparticles on Substrates. *Langmuir* 2013 Oct 11.

- (31) Patri AK, Simanek E. Biological applications of dendrimers. *Mol Pharm* 2012 Mar 5;9(3):341.
- (32) Angelova A, Angelov B, Mutaftchieva R, Lesieur S, Couvreur P. Self-assembled multicompartment liquid crystalline lipid carriers for protein, peptide, and nucleic acid drug delivery. *Acc Chem Res* 2011 Feb 15;44(2):147-56.
- (33) Couvreur P. Nanoparticles in drug delivery: past, present and future. *Adv Drug Deliv Rev* 2013 Jan;65(1):21-3.
- (34) Cuong NV, Hsieh MF. Molecular targeting of liposomal nano-particles to lymphatic system. *Curr Cancer Drug Targets* 2011 Feb;11(2):147-55.
- (35) de Paula CS, Tedesco AC, Primo FL, Vilela JM, Andrade MS, Mosqueira VC. Chloroaluminium phthalocyanine polymeric nanoparticles as photosensitisers: photophysical and physicochemical characterisation, release and phototoxicity in vitro. *Eur J Pharm Sci* 2013 Jun 14;49(3):371-81.
- (36) Kremer JM, Esker MW, Pathmamanoharan C, Wiersema PH. Vesicles of variable diameter prepared by a modified injection method. *Biochemistry* 1977 Aug 23;16(17):3932-5.
- (37) Lee AL, Wang Y, Pervaiz S, Fan W, Yang YY. Synergistic anticancer effects achieved by co-delivery of TRAIL and paclitaxel using cationic polymeric micelles. *Macromol Biosci* 2011 Feb 11;11(2):296-307.
- (38) Porcel E, Liehn S, Remita H, Usami N, Kobayashi K, Furusawa Y, et al. Platinum nanoparticles: a promising material for future cancer therapy? *Nanotechnology* 2010 Feb 26;21(8):85103.
- (39) Primo FL, de Paula LB, de Siqueira-Moura MP, Tedesco AC. Photobiostimulation on wound healing treatment by ClAlPc-nanoemulsion from a multiple-wavelength portable light source on a 3D-human stem cell dermal equivalent. *Curr Med Chem* 2012;19(30):5157-63.
- (40) Siqueira-Moura MP, Primo FL, Espreafico EM, Tedesco AC. Development, characterization, and photocytotoxicity assessment on human melanoma of

- chloroaluminum phthalocyanine nanocapsules. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 2013 Apr 1;33(3):1744-52.
- (41) Agostinis P, Berg K, Cengel KA, Foster TH, Girotti AW, Gollnick SO, et al. Photodynamic therapy of cancer: an update. *CA: a cancer journal for clinicians* 2011;61(4):250-81.
 - (42) Nunes SM, Sguilla FS, Tedesco AC. Photophysical studies of zinc phthalocyanine and chloroaluminum phthalocyanine incorporated into liposomes in the presence of additives. *Braz J Med Biol Res* 2004 Feb;37(2):273-84.
 - (43) Primo FL, Rodrigues MM, Simioni AR, Lacava ZG, Morais PC, Tedesco AC. Photosensitizer-loaded magnetic nanoemulsion for use in synergic photodynamic and magnetohyperthermia therapies of neoplastic cells. *J Nanosci Nanotechnol* 2008 Nov;8(11):5873-7.
 - (44) Primo FL, Bentley MV, Tedesco AC. Photophysical studies and in vitro skin permeation/retention of Foscan/nanoemulsion (NE) applicable to photodynamic therapy skin cancer treatment. *J Nanosci Nanotechnol* 2008 Jan;8(1):340-7.
 - (45) Primo FL, Tedesco AC. Combining photobiology and nanobiotechnology: a step towards improving medical protocols based on advanced biological models. *Nanomedicine (Lond)* 2013 Apr;8(4):513-5.
 - (46) Nunes SM, Sguilla FS, Tedesco AC. Photophysical studies of zinc phthalocyanine and chloroaluminum phthalocyanine incorporated into liposomes in the presence of additives. *Braz J Med Biol Res* 2004 Feb;37(2):273-84.
 - (47) Kremer JM, Esker MW, Pathmamanoharan C, Wiersema PH. Vesicles of variable diameter prepared by a modified injection method. *Biochemistry* 1977 Aug 23;16(17):3932-5.
 - (48) Lasic DD. Kinetic and thermodynamic effect on the structure and formation of phosphatidylcholine vesicles. *Hepatology* 1991 May;13(5):1010-2.

- (49) Siqueira-Moura MP, Primo FL, Peti AP, Tedesco AC. Validated spectrophotometric and spectrofluorimetric methods for determination of chloroaluminum phthalocyanine in nanocarriers. *Pharmazie* 2010 Jan;65(1):9-14.
- (50) Neshasteh-Riz A, Rahdani R, Mostaar A. Evaluation of The Combined Effects of Hyperthermia, Cobalt-60 Gamma Rays and IUdR on Cultured Glioblastoma Spheroid Cells and Dosimetry Using TLD-100. *Cell J* 2014;16(3):335-42.
- (51) Takaoka S, Iwase M, Uchida M, Yoshiba S, Kondo G, Watanabe H, et al. Effect of combining epidermal growth factor receptor inhibitors and cisplatin on proliferation and apoptosis of oral squamous cell carcinoma cells. *Int J Oncol* 2007 Jun;30(6):1469-76.
- (52) Benere E, da Luz RA, Vermeersch M, Cos P, Maes L. A new quantitative in vitro microculture method for *Giardia duodenalis* trophozoites. *J Microbiol Methods* 2007 Nov;71(2):101-6.
- (53) O'Brien J, Wilson I, Orton T, Pognan F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur J Biochem* 2000 Sep;267(17):5421-6.
- (54) Bangham AD. Lipid bilayers and biomembranes. *Annu Rev Biochem* 1972;41:753-76.
- (55) Wagner A, Vorauer-Uhl K. Liposome technology for industrial purposes. *J Drug Deliv* 2011;2011:591325.
- (56) Evjen TJ, Nilssen EA, Fowler RA, Rognvaldsson S, Brandl M, Fossheim SL. Lipid membrane composition influences drug release from dioleoylphosphatidylethanolamine-based liposomes on exposure to ultrasound. *Int J Pharm* 2011 Mar 15;406(1-2):114-6.
- (57) Bentley MV, Marchetti JM, Ricardo N, Ali-Abi Z, Collett JH. Influence of lecithin on some physical chemical properties of poloxamer gels: rheological, microscopic and in vitro permeation studies. *Int J Pharm* 1999 Dec 20;193(1):49-55.

- (58) Camli ST, Buyukserin F, Balci O, Budak GG. Size controlled synthesis of sub-100nm monodisperse poly (methylmethacrylate) nanoparticles using surfactant-free emulsion polymerization. *Journal of colloid and interface science* 2010;344(2):528-32.
- (59) Calori IR, Tedesco AC. Lipid vesicles loading aluminum phthalocyanine chloride: Formulation properties and disaggregation upon intracellular delivery. *J Photochem Photobiol B* 2016 Jul;160:240-7.
- (60) Castano AP, Demidova TN, Hamblin MR. Mechanisms in photodynamic therapy: part one-photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 2004 Dec;1(4):279-93.
- (61) MOSER JG. OF 2nd AND 3rd GENERATION PHOTSENSITIZERS. *Photodynamic Tumor Therapy* 1998;1.
- (62) Jayme CC, Calori IR, Tedesco AC. Spectroscopic analysis of aluminum chloride phthalocyanine in binary water/ethanol systems for the design of a new drug delivery system for photodynamic therapy cancer treatment. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 2016 Jan 15;153:178-83.
- (63) Patrick GL. *An introduction to medicinal chemistry*. Oxford university press; 2013.
- (64) Nakaoka T, Ota A, Ono T, Karnan S, Konishi H, Furuhashi A, et al. Combined arsenic trioxide-cisplatin treatment enhances apoptosis in oral squamous cell carcinoma cells. *Cell Oncol (Dordr)* 2014 Apr;37(2):119-29.
- (65) Primo FL, de Paula LB, de Siqueira-Moura MP, Tedesco AC. Photobiostimulation on wound healing treatment by ClAlPc-nanoemulsion from a multiple-wavelength portable light source on a 3D-human stem cell dermal equivalent. *Curr Med Chem* 2012;19(30):5157-63.
- (66) Siqueira-Moura MP, Primo FL, Espreafico EM, Tedesco AC. Development, characterization, and photocytotoxicity assessment on human melanoma of chloroaluminum phthalocyanine nanocapsules. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 2013 Apr 1;33(3):1744-52.

- (67) Primo FL, de Paula LB, de Siqueira-Moura MP, Tedesco AC. Photobiostimulation on wound healing treatment by CIAIPc-nanoemulsion from a multiple-wavelength portable light source on a 3D-human stem cell dermal equivalent. *Curr Med Chem* 2012;19(30):5157-63.
- (68) Neshasteh-Riz A, Rahdani R, Mostaar A. Evaluation of The Combined Effects of Hyperthermia, Cobalt-60 Gamma Rays and IUdR on Cultured Glioblastoma Spheroid Cells and Dosimetry Using TLD-100. *Cell J* 2014;16(3):335-42.
- (69) Neshasteh-Riz A, Mahmoud PA, Mahdavi SR. Relative Biological Effectiveness (RBE) of (131)I Radiation Relative to (60)Co Gamma Rays. *Cell J* 2013;15(3):224-9.
- (70) Nadal JM, Gomes ML, Borsato DM, Almeida MA, Barboza FM, Zawadzki SF, et al. Spray-dried solid dispersions containing ferulic acid: comparative analysis of three carriers, in vitro dissolution, antioxidant potential and in vivo anti-platelet effect. *Drug Dev Ind Pharm* 2016 Apr 24;1-12.
- (71) Bhuvaneswari R, Ng QF, Thong PS, Soo KC. Nimotuzumab increases the anti-tumor effect of photodynamic therapy in an oral tumor model. *Oncotarget* 2015;6(15):13487.
- (72) Karmakar S, Banik NL, Patel SJ, Ray SK. 5-Aminolevulinic acid-based photodynamic therapy suppressed survival factors and activated proteases for apoptosis in human glioblastoma U87MG cells. *Neurosci Lett* 2007 Mar 30;415(3):242-7.
- (73) Edmonds C, Hagan S, Gallagher-Colombo SM, Busch TM, Cengel KA. Photodynamic therapy activated signaling from epidermal growth factor receptor and STAT3: Targeting survival pathways to increase PDT efficacy in ovarian and lung cancer. *Cancer Biol Ther* 2012 Dec;13(14):1463-70.
- (74) Sano D, Berlin JM, Pham TT, Marcano DC, Valdecanas DR, Zhou G, et al. Noncovalent assembly of targeted carbon nanovectors enables synergistic drug and radiation cancer therapy in vivo. *ACS Nano* 2012 Mar 27;6(3):2497-505.

- (74) Lucas Primo, Fernando. Processos fotodinâmicos para bioestimulação tecidual em modelo in vitro de pele humana empregando-se laser de baixa potência e cloro alumínio ftalocianina em nanoemulsão [tese]. Ribeirão Preto: , Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto; 2009 [acesso 2016-06-12]. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/60/60137/tde-11122009-170544/>.
- (75) Mendonça, Leonardo Meneghin. Avaliação genotóxica e antigenotóxica da curcumina contra a toxicidade induzida pela cisplatina em culturas de células PC12 [dissertation]. Ribeirão Preto: University of São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto; 2008 [Accessed 2016-06-07]. Available from: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/60/60134/tde-14092008-220103/>.
- (76) Oliveira, Milene Aparecida Rodrigues de. Determinação estrutural e estudo da estereoespecificidade de compostos de paládio II [tese]. São Carlos: , Instituto de Química de São Carlos; 2010 [acesso 2016-06-12]. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/75/75132/tde-19102010-101135/>
- (77) SILVA, Joel Rocha da. Nanopartículas magnéticas funcionalizadas com bicamadas de laurato/laurato e laurato/pluronic: estudo da associação anfotericina. [dissertation]. Goiânia: , Universidade Federal de Goiás, Educação em Química; 2008 [acesso 2016-05-20]. Disponível em: <http://repositorio.bc.ufg.br/tede/handle/tde/1056>
- (78) World Health Organization (WHO). Cancer. [acesso 2016-07-03]. Disponível em: <http://www.who.int/cancer/en/>
- (79) Instituto Nacional do Câncer (INCA). Estimativa no Brasil 2016 [acesso 2016-07-03]. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/>
- (80) American Type Culture Collection (ATCC). Advanced Search. [acesso 2016-07-03]. Disponível em: http://www.atcc.org/Search_Results.aspx?dsNav=Ntk:PrimarySearch%7cu87mg%7c3%7c,Ny:True,Ro:0,N:1000552&searchTerms=u87mg&redir=1

X – Anexos

Tabela 1 - Classificação das vesículas lipídicas conforme sua estrutura, composição e metodologia de preparo extraída de (30)

Identificação	Definição
Arqueosomas	Vesículas constituídas de lipídios provenientes da arqueobactéria, os quais são quimicamente distintos de espécies procarioto e eucarioto. Possuem menor sensibilidade ao estresse oxidativo, alta temperatura e pH alcalino.
Coquelatos	Derivados de lipossomas suspensos em solução polimérica constituídas de duas fases aquosas, permitindo a partição lógica de moléculas polares pela fase de separação. A solução polimérica é tratada com moléculas carregadas positivamente como Ca^{2+} ou Zn^{2+} formando um precipitado coquelato com dimensão de partícula menor que 1 μm .
Dendrossomas	Representa um grupo de nanopartícula esferoidais classificadas como: atóxicas, neutras, biodegradáveis, covalentes ou autoformável, hiper-ramificadas. A preparação é simples, de baixo custo, altamente estável assim como manuseio e aplicação, quando comparado a outras vesículas sintéticas para liberação genética.
Vesículas reconstituídas a seco (DRV)	Esta técnica produz vesículas unilamelares “vazias” e pequenas, contendo diferentes lipídios ou misturas destes. Após mistura de SUVs com o fármaco solubilizado é realizada desidratação da solução. A adição de água leva a formação de grandes quantidades de vesículas multilamelares heterogêneas, as quais necessitam de processamento posterior.
Etossomas	Vesículas mais eficientes que lipossomas convencionais ou soluções hidroalcolicas na liberação cutânea em termo de quantidade e profundidade, a permeação do fármaco pela pele utilizando etossomas foi demonstrada por experimentos em células de difusão. As vesículas são compostas por fosfatidilcolina de soja e aproximadamente 30% de etanol, contém vesículas multilamelares

	como mostrado em microscopia eletrônica.
Imunolipossomas	Lipossomas modificados com anticorpos ou estruturas peptídicas na superfície da bicamada foram estabelecidos para aplicações <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> .
Imunossomas	Preparados por ancoragem de molécula glicoproteica a lipossomas pré-formados, imagens de microscopia eletrônica mostram vesículas esféricas homogêneas (50-60 nm) revestidas uniformemente por “espinhos”. Imunossomas possuem características imunogênicas e estruturais mais próximas à vírus purificados e inativos que alguma outra forma de associação lipídios – glicoproteínas.
Complexo imunoestimulante (ISCOM)	Associação de micelas e esferas com partícula de aproximadamente 40 nm. ISCOM são constituídos de Quil A saponina, colesterol e fosfatidilcolina, contêm antígenos anfifílicos como proteínas na membrana. A saponina adjuvantemente incorporada é parte estrutural do veículo.
Lipoplexos	Complexos catiônicos de lipídio-DNA, são eficientes carreadores para transfecção celular com certa limitação devida a sua toxicidade. Estes efeitos podem ser ocasionados pelos lipídios catiônicos ou ácidos nucleicos.
LUVETs	Vesículas unilamelares grandes preparadas pela técnica de extrusão, principalmente processados por sistemas de alta pressão.
Niossomas	Vesículas unilamelares pequenas preparadas com surfactante aniônico <i>Novasomes®</i> , sua estabilidade química é comparada ao sistema de arqueossomas.
Lipossomas sensíveis ao pH	Descritos em 4 classes básica. 1) Combinação entre lipídios polimórficos, fosfatidiletalona e anfifílicos levemente ácidos que mantém o pH neutro, esta classe tem sido intensivamente estudada. 2) Inclui lipossomas compostos por derivados de lipídios resultando no aumento de permeabilidade para o soluto encapsulado. 3) Utiliza peptídeos sensíveis ao pH ou fusão de proteínas reconstituídas para desestabilizar a membrana em pH baixo. 4) Usa titulação do pH com polímeros para desestabilizar a membrana seguida por mudança na

	conformação do polímero em pH baixo.
Lipossomas polimerizados	Vesículas de fosfatidilcolina polimerizadas (35 – 140 nm) têm sido sintetizadas de lipídios que possuem um ou dois grupos metacrilatos por monômero. Comparado aos análogos não poliméricos, estas vesículas apresentam aumento na estabilidade e propriedades de tempo de liberação controlada.
Prolipossomas	Partículas secas por liofilização que formam uma dispersão lipossomal espontaneamente em contato com água.
Proteossomas	Vesículas de origem bacteriana são solubilizadas, seguida por precipitação em sulfato de amônio e diálise contra tampão detergente. Proteínas e peptídeos são complexados não covalentemente à membrana, tornando o sistema altamente imunogênico.
Vesículas de evaporação de fase reversa (REV)	Vesículas formadas por evaporação de emulsões óleo/água, resultando em lipossomas unilamelares grandes.
Lipossomas furtivos	No início da década de 90, este processo de engenharia lipossomal culminado a observação de melhorias na estabilidade e prolongamento da meia vida da partícula em circulação, devido ao revestimento dos lipossomas com PEG (polímero hidrofílico sintético), tornou obsoleto o uso de glicolipídios. O revestimento de PEG inibe adsorção e opsonização dos lipossomas, desta forma evitando ou retardando o reconhecimento do mesmo pelo sistema retículoendotelial (RES). Estes lipossomas PEG são também referidos como lipossomas estericamente estabilizados ou furtivos, o efeito estabilizante resulta da concentração superficial de grupos altamente hidratados que inibe tanto interações hidrofóbicas ou eletrostáticas de uma variedade de componentes sanguíneos quanto à superfície da partícula.
Lipossomas termosensíveis	Considerados ferramentas promissoras para entrega sítio-específica de fármacos. Os lipossomas têm sido preparados usando lipídios que sofrem uma transição de fase cristalina líquida para gel, a poucos

	graus acima da temperatura fisiológica. No entanto, termos sensibilização dos lipossomas têm sido estudada utilizando polímeros termossensíveis. Até o momento, lipossomas funcionais têm sido desenvolvidos conforme a estratégia de liberação do conteúdo. Comportamento, propriedades da superfície e afinidade das partículas pela superfície das células podem ser modificados dependendo da temperatura.
Transferossomas	Constituídos de fosfatidilcolina e colato, são vesículas ultradeformadas que possuem melhores propriedades de penetração cutânea.
Virossomas	Vesículas unilamelares pequenas contendo hemaglutinina gripal, tornando as vesículas fusogênicas as membranas endocíticas. A Coincorporação de outros antígenos à membrana induz melhores respostas imunes.