Universidade de São Paulo
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

“Atividade de nanocápsulas contendo ftalocianina de cloro alumínio associada a fármacos leishmanicidas baseado na terapia fotodinâmica”

Maryanne Trafani de Melo

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências, Área: **Química**

Ribeirão Preto-SP

2015

Universidade de São Paulo
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

“Atividade de nanocápsulas contendo ftalocianina de cloro alumínio associada a fármacos leishmanicidas baseado na terapia fotodinâmica”

Maryanne Trafani de Melo

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências, Área: **Química**

Orientador: Prof. Dr. Antonio Claudio Tedesco

Ribeirão Preto-SP

2015

Ficha catalográfica

De Melo, Maryanne Trafani

Atividade de nanocápsulas contendo ftalocianina de cloro alumínio associada a fármacos leishmanicidas baseado na terapia fotodinâmica, Ribeirão Preto, 2015.

p.105 : il. ; 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Química.

Orientador: Tedesco, Antonio Claudio.

1. Terapia Fotodinâmica. 2. Nanocápsulas. 3. Ftalocianina de cloro alumínio. 4. Resveratrol. 5. Anfotericina B. 6. Chalcona CH8.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Maryanne Trafani de Melo

Atividade de nanocápsulas contendo ftalocianina de cloro alumínio associada a fármacos leishmanicidas baseado na terapia fotodinâmica.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química para obtenção do título de Mestre

Área de concentração: Química

Orientador: Prof. Dr. Antonio Claudio Tedesco

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

À minha dedicada e amada mãe, pelo amor, ensinamentos, educação e incentivos
constantes em minha vida.

À todos que acreditam e torcem por mim.

Agradecimentos

À Deus, autor da infinita sabedoria que transcende todo entendimento humano.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Antonio Cláudio Tedesco, pela oportunidade e confiança de desenvolver esta pesquisa, bem como pelo grande apoio e aprendizado científico.

À minha mãe, Érica, por seu amor incondicional e sem limites; por toda atenção, afeto e suporte sem os quais eu jamais teria conseguido chegar até aqui.

Ao meu querido e amado vô, Valdemar, pelo amor, carinho, apoio e toda sabedoria.

Ao meu amor, amigo, companheiro e namorado, Rodrigo, por me ajudar a superar os desafios, com muita paciência e amor, tornando os meus dias mais felizes e leves e principalmente por estar sempre ao meu lado e à sua família pelo apoio e carinho.

À toda a minha família, por serem meu alicerce e meu porto seguro.

Aos amigos do Laboratório de Fotobiologia e Fotomedicina, pelo dia-a-dia de trabalho e por partilharem seus conhecimentos. Em especial à Paty pela paciência, ensinamentos, incentivo, companheirismo e amizade. Ao meu amigo Leo pelos bons conselhos e longas conversas. Às minhas queridas Naty, Nayara e Gra por tornarem meus dias mais felizes e pela amizade sincera. À Olimpia, por toda dedicação, preocupação e disposição em ajudar.

À minha querida amiga Laís, à você um agradecimento especial, por toda sua atenção, pelos conselhos, apoio, conversas e desabafos, companheirismo e exemplo de dedicação.

Às minhas amigas Maju, Raíssa e Maísa, pelos ótimos momentos de descontração depois de um longo dia de trabalho, pelas risadas, apoio e amizade.

Aos amigos de São João da Boa Vista, Aline, Marília, Camila e Renato pela amizade duradoura e sincera, por compreenderem muitas vezes minha ausência e pelo apoio incondicional.

À Universidade de São Paulo e aos docentes e funcionários da FFCLRP-USP.

À CnPQ pela concessão da bolsa de mestrado e pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

Resumo

Trafani-de Melo, M. **Atividade de nanocápsulas contendo ftalocianina de cloro alumínio (AlClPc) associada a fármacos leishmanicidas baseado na terapia fotodinâmica**. 2015.105f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

A leishmaniose é uma doença tropical negligenciada causada pelo protozoário *Leishmania*, que afeta 98 países. Aproximadamente 1,2 milhões de casos de leishmaniose cutânea acontecem todo ano. Os fármacos convencionais utilizados para seu tratamento são tóxicos, caros e requerem longos períodos de terapia, por isso neste trabalho propôs-se o uso da terapia fotodinâmica (TFD) com ftalocianina de cloro alumínio (AlClPc) associada a fármacos leishmanicidas (resveratrol, anfotericina B e chalcona CH8) encapsulados em nanocápsulas poliméricas. A TFD vem sendo apresentada como uma alternativa promissora para o tratamento da leishmaniose cutânea e outras doenças de pele. Sendo assim, avaliou-se sua ação fototóxica em linhagem celular de macrófago RAW 264.7. As nanocápsulas carregadas foram preparadas pelo método de nanoprecipitação e caracterizadas pelo tamanho de partícula, índice de polidispersão, potencial zeta, eficiência de encapsulação, estudos espectroscópicos e estabilidade física. As nanocápsulas apresentaram um diâmetro médio de 230 nm, baixa polidispersividade (0,3 de índice de polidispersão) e potencial zeta negativo (cerca de -30 mV). A análise morfológica foi realizada através de microscopia de força atômica, pela qual se comprovou o formato esférico das nanopartículas. A formulação apresentou uma boa eficiência de encapsulação, da ordem de 75%, como esperado para fármacos hidrofóbicos. As nanocápsulas exibiram boa estabilidade física ao longo de um período de 3 meses o que foi comprovado pelos estudos de estabilidade acelerada com um tempo de vida de prateleira de 3-6 meses. O comportamento reológico das formulações foi determinado a partir de medidas de variação de velocidade de rotação. Os estudos de toxicidade na ausência de luz demonstraram o caráter biocompatível das nanocápsulas desenvolvidas. Sob irradiação de luz visível em uma dose máxima de $1,0 \text{ J.cm}^{-2}$, o efeito fototóxico provocado pelas nanocápsulas contendo AlClPc (5 μM) e AlClPc (5 μM) associada ao Resveratrol (50 μM), reduziu a viabilidade celular a 30%, já as nanocápsulas contendo AlClPc (5 μM) associada a AmB (4 μM) e AlClPc (5 μM) associada a chalcona (10 μM) reduziram a

sobrevivência celular a uma taxa de 50 % e 10%, respectivamente. AlClPc permaneceu na região citoplasmática das células 24 h após a administração comprovada através de estudos de microscopia de fluorescência. Os resultados obtidos neste trabalho indicam que as nanocápsulas poliméricas se apresentam com potenciais sistemas de administração deste fármaco fotossensibilizador hidrofóbico (AlClPc) associado aos demais fármacos leishmanicidas para tratamento de leishmaniose caracterizado uso de baixas concentrações dos ativos e de baixa dose de luz visível, que levam a respostas biológicas muito boas, incentivando-se assim estudos *in vivo* posteriores.

Palavras chave: Leishmaniose, Terapia fotodinâmica, Ftalocianina de cloro alumínio (AlClPc), resveratrol, anfotericina B e chalcona CH8.

Abstract

Trafani - de Melo, M. **Activity nanocapsules containing aluminum chloride phthalocyanine (AlClPc) associated with leishmanicidal drugs based on photodynamic therapy.** 2015.105f. Dissertation (Master). Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

Leishmaniasis is a neglected tropical disease caused by the protozoan *Leishmania*, which affects 98 countries. Approximately 1.2 million cases of cutaneous leishmaniasis occur every year. Conventional drugs used for its treatment are toxic, expensive, and require long periods of therapy, so this work suggested the use of photodynamic therapy (PDT) with aluminum phthalocyanine chloride (AlClPc) associated with leishmanicidal drugs (resveratrol, amphotericin B and chalcone CH8) encapsulated in polymeric nanocapsules. PDT has been shown as a promising alternative for the treatment of cutaneous leishmaniasis and other skin diseases. Therefore, it evaluated its phototoxic effects in cell line RAW 264.7 macrophages. The loaded nanocapsules were prepared by nanoprecipitation method and characterized by particle size, polydispersity index, zeta potential, encapsulation efficiency, spectroscopic data and physical stability. The nanocapsules had an average diameter of 230 nm, low polydispersity (0,3 polydispersity index) and a negative zeta potential (approximately -30 mV). Morphological analysis was performed using atomic force microscopy, in which proved the spherical shape of the nanoparticles. The formulation exhibited good encapsulation efficiency of approximately 75%, as expected for hydrophobic drugs. Nanocapsules exhibited good physical stability over a 3 month period which was confirmed by the accelerated stability studies with a shelf life of 3-6 months. The rheological behavior of the formulations was determined by rotational speed variation. Toxicity studies in the absence of light showed the biocompatible character of the developed nanocapsules. Under visible light irradiation at a maximum dose of 1.0 J.cm^{-2} , the phototoxic effect caused by nanocapsules containing AlClPc (5 μM) and AlClPc (5 μM) associated with resveratrol (50 μM), reduced cell viability to 30%, as nanocapsules containing AlClPc (5 μM) associated AmB (4 μM) and AlClPc (5 μM) associated with chalcone (10 μM) reduced a cell survival rate of 50% and 10%, respectively. AlClPc remained in the cytoplasmic region of cells 24 h after administration observed by fluorescence

microscopy studies. The results of this study indicate that polymeric nanocapsules are potential delivery systems of this hydrophobic photosensitizer (AlClPc) drug associated with other leishmanicidal drugs for leishmaniasis treatment with the use of low concentration of assets and low-dose of visible light, encouraging further studies in vivo.

Keywords: Leishmaniasis, photodynamic therapy, aluminum chloride phthalocyanine (AlClPc), resveratrol, amphotericin B and chalcone CH8.

Lista de figuras

Figura 1. Ciclo de Vida da <i>Leishmania</i>	3
Figura 2. Diagrama de Jablonski simplificado, ilustrando as transições eletrônicas que dão origem aos mecanismos fotodinâmicos de fotossensibilização molecular. FS-Estado fundamental; ¹ FS*- estado singlete excitado; ³ FS*- estado triplete excitado.....	6
Figura 3. Estrutura química da ftalocianina de cloro alumínio.....	9
Figura 4. Estrutura química dos fármacos encapsulados A) anfotericina B B) chalcona CH8 C) resveratrol.....	10
Figura 5. Perfil de liberação dos fármacos: — convencional x — controlada.....	12
Figura 6. Esquema de nanocápsulas e nanoesferas poliméricas: (a) fármaco dissolvido no núcleo oleoso das nanocápsulas; b) fármaco adsorvido à parede polimérica das nanocápsulas; c) fármaco retido na matriz polimérica das nanoesferas; d) fármaco adsorvido ou disperso molecularmente na matriz polimérica das nanoesferas.....	14
Figura 7. Característica estrutural do núcleo de nanoesfera e nanocápsula.....	14
Figura 8. Representação de uma nanocápsula contendo ftalocianina no núcleo oleoso.....	15
Figura 9. Representação esquemática da técnica emulsificação e evaporação do solvente.....	16
Figura 10. Representação esquemática da técnica emulsificação e difusão do solvente.....	16
Figura 11. Representação esquemática da técnica nanoprecipitação.....	17
Figura 12. Esquema de preparo de nanocápsulas poliméricas.....	21
Figura 13. Equipamento utilizado para realizar as medidas de tamanho de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta.....	23
Figura 14. Ilustração do Lumisizer utilizado para fazer as medidas de estabilidade acelerada das formulações.....	25

Figura 15. Sistema de irradiação com fibra-óptica difusa usado nos estudos de fotoestimulação (luz monocromática $\lambda = 675$ nm).....	33
Figura 16. Resultados de diâmetro médio ($\pm$ DP, colunas) (A), Índice de polidispersão (IPd) ($\pm$ DP, linhas)(B) e os valores médios do potencial zeta (ζ) ($\pm$ DP) (C) das formulações não associadas NCAICIPc, NCAmB, NCRSV, NCCH8 para o estudo de estabilidade de 1, 15,30,60, 90 e 120 dias.....	39
Figura 17. Resultados de diâmetro médio ($\pm$ DP, colunas) (A), Índice de polidispersão (IPd) ($\pm$ DP, linhas) (B) e os valores médios do potencial zeta (ζ) ($\pm$ DP) (C) das formulações associadas NCAICIPcCH8, NCAICIPCRSV e NCAICIPcAmB para o estudo de estabilidade de 1, 15,30,60, 90 e 120 dias.....	40
Figura 18. Resultados de diâmetro médio ($\pm$ DP, colunas) (A) e Índice de polidispersão (IPd) ($\pm$ DP, linhas) (B) e os valores médios do potencial zeta (ζ) ($\pm$ DP) (C) das formulações NCAICIPc, NCAICIPcAmB, NCAICIPcRSV, NCAICIPcCH8 para o estudo de estabilidade em meio de cultura RPMI 3% de soro fetal bovina durante o período de 3 horas.....	42
Figura 19. Resultados de diâmetro médio ($\pm$ DP, colunas) (A) e Índice de polidispersão (IPd) ($\pm$ DP, linhas) (B) e os valores médios do potencial zeta (ζ) ($\pm$ DP) (C) das formulações NCAICIPc, NCAICIPcAmB, NCAICIPcRSV, NCAICIPcCH8 armazenadas em câmara climática e de fotodegradação a 25°C para o estudo de estabilidade de 1, 15,30,60 e 90 e 120 dias.....	43
Figura 20. Princípios da tecnologia STEP (Space and Time Resolved Extinction Profiles).....	46
Figura 21. Evolução dos perfis de transmissão das formulações NCVazia, NCAICIPc, NCRSV, NCAmB e NCCH8, associações e NC gelificadas, centrifugadas a 3000 rpm por 3,5 h. Primeiro registro inferior, último perfis superior direito. A abscissa mostra posição (nm) e a ordenada a transmissão de luz.....	47
Figura 22. Integral da Transmissão na dependência de tempo (s) para (A)NCAICIPc, NCAmB,NCRSV e NCCH8 (B) NCAICIPc+AmB; NCAICIPc+RSV e NCAICIPc+CH8 (C)NCVazia e NCAICIPc gelificadas (D) NCAICIPcCH8 e	

NCAICIPcRSV gelificadas e (E) NCAICIPcAmB usando LUMiSizer1 a 3000 rpm e 3,5 h.....50

Figura 23. Fotomicrografias tridimensionais e bidimensionais obtidas das formulações (A) NCAICIPc (B) NCAICIPcAmB (C)NCAICIPcRSV e (D) NCAICIPcCH8 por microscopia de força atômica.....53

Figura 24. Fotomicrografia bidimensional e perfil topográfico dados pela análise do *software* mostrando medições do diâmetro e altura nanocápsulas A)NCAICIPc B)NCAICIPcAmB C)NCAICIPcRSV e D)NCAICIPcCH8.....55

Figura 25. Reogramas de taxa de cisalhamento por tensão de cisalhamento composto por curva ascendente — e descendente — das formulações (A) NCAICIPcRSV (B) NCAICIPcCH8 (C)NCAICIPcAmB (D) NC AICIPc.....60

Figura 26.Reogramas de taxa de cisalhamento por tensão de cisalhamento da formulação NCAICIPcCH8 gelificada; (A) curva ascendente (B) curva descendente (C) curva ascendente e descendente.....62

Figura 27. Reogramas de taxa de cisalhamento por tensão de cisalhamento (curva ascendente — e descente — das formulações gelificadas (A) NCAICIPcRSV (B) NCAICIPcCH8 (C)NCAICIPc (D) NC AICIPcAmB.....64

Figura 28. Reograma de temperatura versus viscosidade das formulações gelificadas (— GELNCAICIPcRSV; — GelNCAICIPcAmB; — GelNCAICIPcCH8; — GelNCAICIPc) 65

Figura 29. Espectros de absorção UV-VIS da CH8 em solução de acetonitrila e curva padrão relacionando a concentração de CH8 (5,00-22,00 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) versus absorbância ($y = 0,6969x - 0,0089$ $r = 0,9998$).....66

Figura 30. Espectros de absorção UV-VIS da AmB em Acetonitrila e curva padrão relacionando a concentração de AmB (5,00-22,00 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) versus absorbância ($y = 0,052x - 0,022$; $r = 0,99916$).....67

Figura 31. Espectros de absorção UV-VIS do RSV em solução de acetonitrila e curva padrão relacionando a concentração de RSV (1,5-10,00 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) versus absorbância ($y = 0,1322x + 0,004$ $r = 0,99996$).....67

- Figura 32.** Espectros de absorção (A e B) de soluções de AlClPc livre em acetonitrila (A) e co-encapsulada com fármacos leishmanicidas (B).....71
- Figura 33.** Espectros de fluorescência (A e B) de soluções de AlClPc livre em acetonitrila (A) e co-encapsulada com fármacos leishmanicidas (B).— NCAIClPc;— NCAIClPcRSV; — NCAIClPcCH8;—NCAIClPcAmB.....72
- Figura 34.** Cultura de células de macrófagos de murinho RAW 264.7 confluentes.....74
- Figura 35.** Fotografias tiradas com um microscópio de contraste de fase invertida 24 h após a aplicação da TFD. Os grupos de controle negativo (A, C, E e G) consistiram de células incubadas com meio de cultura, sem irradiação com luz ou tratamento com NC, já (B,D,F e H) foram incubação por 3 horas com NCAIClPc (5 μM), NCAIClPc+RSV (5 μM +50 μM), NCAIClPc+CH8 (5 μM + 10 μM) e NCAIClPc+AmB (5 μM + 4 μM), respectivamente submetidos a irradiação de 1 J.cm⁻². Lentes usadas de 10x e 20 x.....75
- Figura 36.** Ensaio de citotoxicidade celular em linhagem de macrófagos RAW 264.7 incubados durante 3 h com formulações de (A) NCAIClPc; (B) NCAmB; (C)NCRSV e (D)NCCH8, sem ação de luz, as células foram incubadas com nas seguintes concentração NCAIClPc 0,5;1,0; 5,0 e 10 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, NCRSV 25,0;50,0;75,0 e 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$,NCAmB 1,0;2,0; 4,0 e 8,0 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ e NCCH8 1,0; 5,0; 10,0 e 15,0 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. Com significância estatística *p<0,05 em relação ao controle de 100%.....78
- Figura 37.** Citotoxicidade celular utilizando o ensaio de MTT clássico em linhagem de células de murinos de macrófagos RAW 264-7 sem ação de luz, as células foram incubadas com AlClPc livre na concentração de 5,0 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ e com nanocápsulas contendo AlClPc na concentração de 5,0 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, nanocápsulas contendo AlClPc na concentração de 5,0 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ associada ao RSV na concentração de 50,0 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, nanocápsulas contendo AlClPc na concentração de 5,0 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ associada a AmB na concentração de 4,0 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ e nanocápsulas contendo AlClPc na concentração de 5,0 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ associada a CH8 na concentração de 10,0 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ 80
- Figura 38.** Citotoxicidade celular usando o teste colorimétrico MTT em linhagem de macrófago RAW 264.7, sem utilização de luz, incubadas com ativos livre associados nas concentrações de 5 μM para AlClPc, 50 μM para RSV, 4 μM para AmB e 10 μM para CH8.....81

Figura 39. Avaliação do efeito citotóxico dos ativos livres associados, nas concentrações de trabalho determinadas, AlClPc 5 μ M, RSV 50 μ M, AmB 4 μ M e CH8 10 μ M em linhagem de macrófago RAW 264.7 utilizando o teste vermelho neutro. Como controle utilizou-se células saudáveis.....82

Figura 40. Ensaio de fotocitotoxicidade usando o teste de viabilidade MTT após incubação com as formulações de NCAIcPc, NCAIcPc+AmB, NCAIcPc+RSV e NCAIcPc+CH8 sobre células RAW 264.7 e posterior irradiação com diferentes doses (40,70,150,300,500 mJ.cm^{-2} e 1J.cm^{-2}). Neste ensaio usou-se um controle negativo apenas com células, indicado na figura como 0 de irradiação e um controle do laser, ou seja, apenas células e irradiação (* $p < 0,05$ comparado ao controle de 100%).....84

Figura 41. Mapeamento da AlClPc veiculada em NCAIcPc, NCAIcPc+AmB, NCAIcPc+CH8 e NCAIcPc+RSV em microscopia confocal de fluorescência nas células RAW 264.7 após 24 h de incubação. Na primeira coluna, a coloração azul mostra o núcleo celular, corado com DAPI; a coloração verde o citoesqueleto corado com faloidina; na segunda coluna a coloração rosa é resultado da emissão de fluorescência da AlClPc intracelular e na terceira coluna as imagens estão sobrepostas.....86

Lista de tabelas

Tabela 1. Resultado da caracterização físico química das nanocápsulas antes e depois de passarem pelo processo de gelificação com 23% de Pluronic F-127.....	37
Tabela 2. Taxa de separação representada pela inclinação e calculado pelo <i>software</i> SEPView 5.1, depois de integrar os arquivos de transmissão.....	52
Tabela 3. Resultado dos tempos de vida de prateleira (<i>shelf life</i>) de cada amostra.....	52
Tabela 4. Resultados da ANOVA unilateral para o modelo linear do método espectrofotométrico da AmB.....	69
Tabela 5. Resultados da ANOVA unilateral para o modelo linear do método espectrofotométrico da CH8.....	69
Tabela 6. Resultados da ANOVA unilateral para o modelo linear do método espectrofotométrico do RSV.....	70
Tabela 7. Taxa de eficiência de encapsulação (E.E. %) da AlClPc em diversas formulações de NC.....	74

Lista de abreviaturas e siglas

AA	Aminoácidos essenciais
AlClPc	Ftalocianina de cloro-alumínio
AmB	Anfotericina B
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC®	American Type Culture Collection
CH8	Chalcona CH8
CT	Controle
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DDS	Drug delivery systems
DMSO	Dimetilsulfóxido
E.E.	Eficiência de encapsulação
EMP	Erro médio padrão
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FS	Fármaco fotossensibilizante
¹ FS	Estado fundamental
¹ FS*	Estado singlete excitado
³ FS*	Estado triplete excitado
GelNCV	Gel preparado a partir da nanocápsula vazia
GelNCAIClPc	Gel preparado a partir da nanocápsula de ftalocianina de cloro alumínio
GelNCAIClPcCH8	Gel preparado a partir da nanocápsula de ftalocianina de cloro alumínio associada a chalcona CH8

GelNCAICIPcAmB Gel preparado a partir da nanocápsula de ftalocianina de cloro alumínio associada a Anfotericina B

GelNCAICIPcRSV Gel preparado a partir da nanocápsula de ftalocianina de cloro alumínio associada ao Resveratrol

IPd	Índice de polidispersão
LD	Limite de detecção
LED	Light Emitting Diode
LPG	Lipofosfoglicano
LQ	Limite de quantificação
MFA	Microscopia de força atômica
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolio
m/m	massa/massa
m/v	massa/volume
NC	Nanocápsula
NCV	Nanocápsulas vazia
NCAICIPc	Nanocápsula contendo ftalocianina de cloro alumínio
NCAmB	Nanocápsula contendo anfoterina B
NCCH8	Nanocápsula contendo chalcona CH8
NCRSV	Nanocápsula contendo resveratrol
NCAICIPcRSV	Nanocápsula contendo ftalocianina de cloro alumínio e resveratrol
NCAICIPcAmB	Nanocápsula contendo ftalocianina de cloro alumínio e anfotericina B
NCAICIPcCH8	Nanocápsula contendo ftalocianina de cloro alumínio e chalcona CH8

$^1\text{O}_2$	Oxigênio singlete
$^3\text{O}_2$	Oxigênio molecular
PCL	Policaprolactona
PLA	Poli-ácido láctico
PGA	Poli-ácido glicólico
PLGA	Copolímero poli-láctico- <i>co</i> -glicólico
PDT	Photodynamic Therapy
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
RSV	Resveratrol
SFB	Soro fetal bovino
TFD	Terapia Fotodinâmica
v/v/v	volume/volume/volume
WHO	World Health Organization
ζ	Potencial zeta

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
LISTA DE FIGURAS.....	iii
LISTA DE TABELAS.....	vii
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS	viii
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Leishmaniose.....	1
1.2 Fotoprocessos Dinâmicos.....	4
1.3 Ftalocianinas.....	7
1.4 Fármacos leishmanicidas.....	9
1.5 Nanotecnologia farmacêutica.....	11
1.6 Nanocápsulas poliméricas.....	13
2. OBJETIVOS.....	19
2.1 Objetivos gerais.....	19
2.2 Objetivos específicos.....	19
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	20
3.1 Materiais.....	20
3.2 Método.....	20
3.2 Preparo de nanocápsulas poliméricas contendo AIClPc e associações.....	20
3.3 Processo de gelificação de nanocápsulas previamente preparadas.....	21
3.4 Caracterização físico química das nanopartículas.....	22
3.4.1 Análise de tamanho de partícula e índice de polidispersividade.....	22
3.4.2 Medida de potencial zeta.....	22
3.4.3 Estudo de estabilidade ao longo do tempo em condições adversas.....	23
3.4.4 Estudo de estabilidade acelerada.....	23
3.4.5 Análise morfológica por microscopia de força atômica (MFA).....	25
3.4.6 Determinação do comportamento reológico.....	26
3.4.7 Quantificação dos fármacos em nanocápsulas.....	27

3.4.8 Validação de método analítico espectrofotométrico para quantificação de fármacos nas nanopartículas.....	27
3.4.8.1 Linearidade.....	28
3.4.8.2 Limite de detecção e quantificação.....	28
3.4.9 Espectroscopia de absorção e emissão de fluorescência.....	28
3.4.10 Determinação de eficiência de encapsulação.....	29
3.5 Ensaios <i>in vitro</i>	29
3.5.1 Cultivo e expansão de macrófagos RAW 264.7.....	29
3.5.2 Micrografias de culturas celulares.....	30
3.5.3 Ensaios de citotoxicidade.....	30
3.5.3.1 Ensaios <i>in vitro</i> de toxicidade (ausência do estímulo luminoso).....	31
3.5.4 Ensaio <i>in vitro</i> de fototoxicidade (aplicação TFD).....	32
3.5.5 Ensaio de viabilidade celular: avaliação da atividade mitocondrial através do teste de MTT.....	33
3.5.6 Ensaio de viabilidade celular utilizando o corante vermelho neutro.....	33
3.6 Análise estatística.....	35
3.7 Microscopia confocal.....	35
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36
4.1 Preparo de nanocápsulas poliméricas contendo AICIPc e associações.....	36
4.2. Processo de gelificação de nanocápsulas previamente preparadas.....	36
4.3 Caracterização físico química das nanopartículas.....	38
4.3.1 Análise de tamanho de partícula, índice de polidispersividade e potencial zeta....	39
4.3.2 Estudo de estabilidade ao longo do tempo em condições adversas.....	41
4.3.3 Estudo de estabilidade acelerada.....	44
4.3.4 Análise morfológica por microscopia de força atômica (MFA).....	53
4.3.5 Determinação do comportamento reológico.....	57
4.4. Validação de método analítico espectrofotométrico para quantificação de fármacos nas nanopartículas.....	65
4.4.1 Linearidade.....	65
4.4.2 Limite de detecção e limite de quantificação.....	70
4.4.3 Espectroscopia de absorção e emissão de fluorescência.....	70
4.4.4 Determinação de eficiência de encapsulação.....	73

4.5 Ensaio <i>in vivo</i>	74
4.5.1 Cultivo e expansão de macrófagos RAW 264.7.....	74
4.5.2 Micrografias de culturas celulares.....	75
4.5.3 Ensaio de citotoxicidade.....	78
4.5.4 Ensaio de viabilidade celular utilizando corante vermelho neutro.....	81
4.5.5 Ensaio <i>in vitro</i> de fototoxicidade (aplicação TFD).....	82
4.6 Microscopia confocal.....	85
5. CONCLUSÃO.....	88
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	90

1. Introdução

1.1 Leishmaniose

A leishmaniose é um problema de saúde pública mundial devido a sua alta incidência e ampla distribuição geográfica associada à possibilidade de assumir formas que podem levar a lesões destrutivas, desfigurantes e incapacitantes. É causada por protozoários intra-macrófagos das espécies *Leishmania* e transmitida ao homem por diferentes insetos vetores da família Psychodidae, subfamília Phlebotaminae e do gênero *Phlebotomus*, no velho mundo, e *Lutzomyia*, na América. As manifestações clínicas da leishmaniose são variáveis e dependem da associação entre as características de virulência da espécie de *Leishmania* infectante e da resposta imunológica do hospedeiro (PEARSON e SOUSA, 1996). Essas manifestações podem ser classificadas em três formas: visceral, cutânea e mucocutânea (DE MUYLDER et al., 2011). A leishmaniose mucocutânea é a mais temida forma de leishmaniose cutânea porque produz lesões destrutivas, desfigurando várias partes do corpo, inclusive a face. É causada frequentemente pela espécie *L. braziliensis*, mas há relatos de infecções causadas por *L. aethiopic*. A visceral, também conhecida como kala-azar e “febre negra”, é a forma mais severa de leishmaniose. O parasito migra aos órgãos viscerais como fígado, baço e medula óssea e a falta de tratamento quase sempre resulta na morte do paciente. A leishmaniose cutânea é causada principalmente pela *Leishmania major* no velho continente (Europa, Ásia, África e ilhas dos Açores e Madeira) e por *Leishmania amazonensis* ou *Leishmania braziliensis* nas Américas (YAMASAKI et al., 1994). Na leishmaniose cutânea (LC), o paciente apresenta geralmente uma ou várias úlceras ou nódulos sobre a pele que causam dano aos vasos sanguíneos e nervos, com formação de cicatriz grosseira e infecções secundárias. A maior parte dos doze milhões de pessoas infectadas com *Leishmania* em todo o mundo são casos LC e cerca de 1,3 milhões de novos casos e de 20.000 a 30.000 mortes ocorrem anualmente, além disso, 310 milhões de pessoas vivem em áreas endêmicas e correm o risco de contrair a doença (WHO, 2015). No Brasil, segundo Ministério da Saúde estima-se que cerca de 3 mil pessoas são contaminadas pela doença anualmente. O país respondeu por 90% das 600 mil ocorrências registradas em toda a América Latina entre 1992 e 2011. Há casos de leishmaniose nos 27 estados da federação. Foram mais de 2,7 mil

mortes entre 2000 e 2011. Dados de 2011 apontam ainda que a leishmaniose tegumentar americana atingiu 7,3 mil pessoas na Região Norte, 5,2 mil no Nordeste e 986 no Sudeste.

O ciclo de vida do parasita é composto por duas formas morfológicas principais: as promastigotas e as amastigotas (Figura 1). Na primeira forma o parasita é flagelado e móvel (promastigota procíclico). Em casos de *Leishmania major*, o parasita adere-se às células epiteliais do trato digestivo do inseto hospedeiro através da interação de um glicoconjugado de superfície, o lipofosfoglicano (LPG), com os receptores dessas células (NEVES et al., 2005). Nesse estágio ocorre a multiplicação do protozoário e a diferenciação da forma promastigota procíclica (não infectiva) para a forma promastigota metacíclica (infectiva). Este processo também conhecido como metaciclogênese, resulta no desligamento dos parasitas às células epiteliais e na migração para a extremidade anterior do trato digestivo, seguindo para o aparelho sugador do inseto vetor (SACKS , BRODIN e TURCO, 1990). A transmissão dos protozoários dos vetores para os hospedeiros vertebrados ocorre a partir da picada da fêmea do flebotomíneo infectada, no momento do repasto sanguíneo para a maturação dos ovos (BATES, 2008; PACE, 2014).

Ao picar o hospedeiro vertebrado, o vetor inocula as formas promastigotas metacíclicas infectantes do parasita, juntamente com a saliva, que possui papel modulador de resposta imunológica do hospedeiro o que facilita o sucesso da infecção e a sobrevivência do parasita no hospedeiro vertebrado. (NEVES et al., 2005). Os parasitas assumem a forma amastigota, com flagelo recolhido no interior das células do sistema mononuclear fagocitário, principalmente macrófagos nos hospedeiros mamíferos. A forma amastigota do protozoário adere-se através do LPG e da metaloprotease gp63 interagindo com os receptores CR3 dos macrófagos atraídos para o local (CHANG , CHAUDHURI e FONG, 1990). A diferenciação e proliferação da forma amastigota nas condições hostis da célula é possível devido à fusão do fagossomo e do lisossomo, seguida da lise e liberação das formas diferenciadas que infectam outros macrófagos (DOSTALOVA e VOLF, 2012; KAMHAWI, 2006). Durante o repasto sanguíneo do inseto vetor em um vertebrado infectado, ocorre ingestão das formas amastigotas e em seu intestino ocorre a diferenciação em formas promastigotas,

fechando o ciclo de vida do parasito (BATES e ROGERS, 2004; HANDMAN, 2001; KILLICKKENDRICK, 1990; SACKS, 1989).

Adaptado <http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html> (acessado em 21/06/2015)

Figura 1. Ciclo de Vida da *Leishmania*.

O tratamento de primeira escolha para essa endemia foi durante muito tempo medicamentos a base de antimoniais pentavalentes e seus derivados. Porém, a cardio, nefro e hepatotoxicidade destes medicamentos constituíram uma limitação à sua utilização frequente. Por serem abortivos, não podem ser administrados a gestantes. Além disso, foi confirmado à resistência parasitária e co-infecções em pacientes soropositivos (HIV⁺) que utilizaram este medicamento. A Anfotericina B (AmB), antibiótico poliênico e de ação reconhecida como excelente leishmanicida, passou a ser a droga de segunda escolha, considerada mais eficaz que os antimoniais no tratamento das lesões mucosas. Porém, a cardio e nefrotoxicidade da AmB, além do uso endovenoso impedem seu uso fora do ambiente hospitalar. Em tentativas de diminuir a toxicidade da AmB,

formulações nanoestruturadas foram desenvolvidos e aprovadas para tratamento de leishmaniose visceral e /ou mucocutânea (trata-se de uma formulação lipossomal (AmBisome) (BURZA et al., 2014a; BURZA et al., 2014b; HANDMAN, 2001; ROCIO et al., 2014; SALIH et al., 2014), ou um complexo lipídico (Abelcet), ou ainda uma dispersão coloidal (Amphocil)). Porém seu alto custo e dificuldades para fabricação representam limitações para seu uso generalizado. A eficácia da pentamidina, droga de terceira escolha, é pouco conhecida (MCGWIRE e SATOSKAR, 2014). Sua toxicidade cardíaca, nefrotoxicidade, além da possibilidade de desenvolvimento de diabetes mellitus, hipotensão, hipoglicemia, são fatores limitantes ao seu uso clínico (PIMENTEL et al., 2011). A aplicação tópica de paromomicina demonstrou ser útil em *L major* e, em menor grau, em *L mexicana*, mas os resultados ainda são inconsistentes. Miltefosine, fármaco inicialmente usado como anti-neoplásico na década de 80, foi o primeiro medicamento aprovado para o tratamento oral de leishmaniose (PEREZ-VICTORIA et al., 2006) e vem sendo usado para a leishmaniose visceral na Índia, com uma alta taxa de cura. No entanto, a baixa eficácia contra a leishmaniose cutânea e por ser teratogênico, limitam o seu uso (BUSTOS et al., 2014; SINDERMAN e ENGEL, 2006; SOTO e BERMAN, 2006). Outras alternativas incluem crioterapia, hipertermia, excisão, curetagem, porém todas carregam um risco elevado de recorrência e são cosmeticamente insatisfatórias.

Nota-se que do ponto de vista histórico evolutivo, poucos compostos novos foram introduzidos para o tratamento da leishmaniose cutânea nos últimos anos, embora este seja um dos maiores problemas de saúde pública da América Latina (ALMEIDA e SANTOS, 2011). Muitos casos ocorrem em áreas remotas onde a administração parentérica de medicamentos e que necessitam de monitorização de seus efeitos secundários, sobre os pacientes, é muito difícil. Por isso novas abordagens terapêuticas são tão relevantes.

1.2 Fotoprocessos dinâmicos

A terapia fotodinâmica (TFD) vem sendo apresentada como uma alternativa promissora para o tratamento de patologias dermatológicas, neoplasias e inclusive

leishmaniose cutânea (HERNANDEZ et al., 2012a; BARBUGLI et al., 2010a; DE PAULA et al., 2013; DE PAULA et al., 2015; PRIMO et al., 2008; SOUZA et al., 2009), pois além de apresentar bons resultados *in vitro e in vivo*, é uma técnica simples, que não requer uma tecnologia de alto custo, é seletiva e não invasiva (não cirúrgica), sendo assim conveniente para implantação em países em desenvolvimento (AKILOV et al., 2007) e de dimensões continentais.

A TFD é um procedimento clinicamente aprovado desde 1993 no Canadá, quando uma formulação contendo derivados diméricos e oligoméricos de hematoporfirina (Photofrin®) foi usada clinicamente para tratamento de câncer de bexiga. Em 1994, o governo Japonês autorizou o emprego dessa droga na terapia de câncer de pulmão. Em 1995, o governo Norte-Americano autorizou seu emprego para o tratamento de câncer do esôfago e em 1996, foi a vez do governo Francês. O Photofrin® foi aprovado pela FDA/EUA (Food and Drug Administration) para o tratamento do câncer com a técnica de TFD em 22 de dezembro de 1998 (KAWASE e ISEKI, 2013; ORMOND e FREEMAN, 2013). Desde então, um aumento no interesse na ação fotodinâmica de porfirinas surgiu em todo o mundo (ETHIRAJAN et al., 2011).

A TFD em suma envolve a administração de um pigmento não-tóxico conhecido como fármaco fotossensibilizante (FS), seguida por irradiação da lesão com luz visível (oriunda de uma fonte luminosa do tipo Laser ou LED), em comprimentos de onda adequados capaz de excitar a molécula fotoativa aos seus estados mais energéticos singlete e triplete (AGOSTINIS et al., 2011). Na presença de oxigênio molecular, a interação das espécies excitadas como $^3\text{O}_2$ levam a geração de espécies citotóxicas e outros radicais livres denominados espécies reativas de oxigênio (EROs) (peróxidos, radicais hidroxilas, superóxidos, óxidos nítricos, oxigênio singlete, etc) que podem danificar os constituintes celulares, culminando na morte celular e destruição dos tecidos (SHARMAN, ALLEN e VAN LIER, 1999).

A interação entre a luz monocromática e fármaco fotossensível induz a uma série de processos fotoquímicos e fotofísicos em níveis quânticos, decorrente da interação da radiação eletromagnética com a matéria, os quais são ilustrados no diagrama de Jablonski (Figura 2).

Figura 2. Diagrama de Jablonski simplificado, ilustrando as transições eletrônicas que dão origem aos mecanismos fotodinâmicos de fotossensibilização molecular. FS-Estado fundamental;¹ FS*- estado singleto excitado; ³FS*- estado tripleto excitado. Adaptado(KONAN , GURNY e ALLEMANN, 2002) .

Após administração sistêmica, transdêmica ou tópica do fármaco fotossensível e decorrido o tempo de absorção do mesmo pelo tecido celular a ativação com luz monocromática em comprimento de onda adequado para excitar o FS (DE ROSA e BENTLEY, 2000; SHARMAN , ALLEN e VAN LIER, 1999), induz diversas reações fotoquímicas clássicas que levam à produção em última análise de espécies reativas de oxigênio e outras espécies ativas no processo fotodinâmico acontecem (NUNES , SGUILLA e TEDESCO, 2004; SOBOLEV , JANS e ROSENKRANZ, 2000; TURCHIELLO et al., 2003). Mais precisamente temos que o fármaco fotossensível passa a popular um estado eletrônico singleto excitado mais energético (FS*), sem mudança vetorial do *spin*, assim que absorve um fóton de luz, podendo retornar ao seu estado fundamental (FS) via processo de relaxação física conhecida como conversão interna ou através de processos radiativos de emissão de fluorescência.

Uma alta população do estado singleto excitado pode dar origem ao estado excitado tripleto (³FS*), com inversão da orientação vetorial do *spin* eletrônico, com conformação eletrônica e energia discretamente menor que o estado excitado singleto e um tempo de vida da espécie mais longo (10^{-6} à 10^{-3} segundos). A ação fotodinâmica é dependente deste processo de cruzamento inter-sistemas, responsável pela formação do

estado triplete excitado a partir do estado singlete excitado, pois é a partir do $^3\text{FS}^*$ que tem se a reação com $^3\text{O}_2$ e produção de EROs e outras espécies.

Como demonstrado na Figura 2, o FS no estado excitado triplete, pode retornar ao estado fundamental pelo processo de conversão interna ou através do processo radiativo de emissão de fosforescência, ou ainda, o FS pode desencadear reações fotoquímicas que se processam por dois mecanismos básicos (tipo I e tipo II), o que tornam possível seu uso para TFD (FOOTE, 1991).

O **mecanismo do Tipo I** envolve a abstração de prótons ou transferência de elétrons entre o fármaco fotossensível no estado triplete excitado e diferentes macromoléculas biológicas, levando à formação de radicais livres e/ou íons radicais. As espécies reduzidas podem transferir um elétron ao oxigênio molecular presente no meio (em sua configuração triplete), formando espécies reativas de oxigênio, que causam danos aos tecidos, conhecidos como danos provocados por EROs.

No **mecanismo do tipo II** há transferência de energia direta para o oxigênio molecular a partir da configuração eletrônica triplete do fármaco, induzindo a formação do oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$). O oxigênio singlete é uma espécie altamente reativa que interage de forma a oxidar vários substratos biológicos. Acredita-se que o oxigênio singlete seja o principal mediador dos efeitos fotodinâmicos nos sistemas biológicos, isso porque causa danos às várias estruturas celulares, induzindo quebra do DNA genômico, destruição da membrana plasmática e de organelas como lisossomos e mitocôndrias (DE PAULA et al., 2013; BARBUGLI et al., 2010a), que em conjunto ou separadamente induzem a morte da célula doente.

1.3 Ftalocianinas

Ainda não existem fármacos fotossensibilizantes (FS) ideais, porém algumas características essenciais desejadas desta molécula são condições básicas na escolha da mesma, destacando-se: (i) ser quimicamente puro e facilmente sintetizado; (ii) ter baixa toxicidade e ser eliminado rápido do organismo; (iii) ter alta seletividade pelos tecidos doentes e não pelos tecidos saudáveis; (iv) causar a menor quantidade possível de reações adversas; (v) não mutagênico ou carcinogênico; (vi) ter maior absorção de luz na região do vermelho (ou na janela terapêutica, que vai de 600 a 800 nm) onde ocorre

maior penetração nos tecidos; (vii) ser estável e fácil de se dissolver nos fluidos corporais ou em solventes biocompatíveis (ALLISON et al., 2004; ROSSETTI, 2010); (viii) possuir um longo tempo de vida no estado excitado, na ordem de micro segundos, dando tempo para que ocorra a transferência de energia e/ou elétrons do FS para o oxigênio molecular.

As ftalocianinas são pigmentos sintéticos, consideradas de segunda geração, semelhantes às porfirinas naturais, em seu macrociclo central, o qual consiste de uma unidade cíclica tetrapirrólica (Figura 3). Entretanto, nas ftalocianinas, as subunidades pirrólicas são unidas por átomos de nitrogênio, enquanto nas porfirinas as subunidades são unidas via ponte de metileno. A conjugação do macrociclo da ftalocianina é estendida por anéis benzênicos sobre quatro unidades pirrólicas e contém um íon metálico diamagnético. São altamente eficientes no tratamento com TFD, pois possuem efeitos fototóxicos adversos reduzidos e absorvem na região do vermelho (610-640 nm do espectro eletromagnético). Além disso, são muito estáveis. (DE ROSA e BENTLEY, 2000; OCHSNER, 1997; GALLEGO-GOMEZ et al., 2009). Neste contexto, merece destaque a ftalocianina de cloro-alumínio (AlClPc) (Figura 2 A), muito útil em TFD (SILVA, SIMIONI e TEDESCO, 2011; LONGO et al., 2013; MAFTOUM-COSTA et al., 2008; ROCHA et al., 2012; TEDESCO, ROTTA e LUNARDI, 2003). A AlClPc apresenta propriedades fotofísicas muito favoráveis, com estado singlete excitado de vida relativamente curta (na ordem de ns) e bom rendimento quântico de estado tripleto excitado (Φ_T) (BARBUGLI et al., 2010b). No entanto, AlClPc se caracteriza por sua elevada hidrofobicidade que resulta na formação de agregados fotoquimicamente inativos quando em solução aquosa, devido a interações eletrônicas entre os anéis benzênicos de duas ou mais moléculas. Infelizmente, a AlClPc possui uma forte tendência em formar dímeros ou mesmo agregados superiores em água como resultado do grande esqueleto hidrofóbico evitando assim o contato com o meio aquoso e afetando as suas propriedades fotofísicas e de fotossensibilização. A auto-agregação reduz a capacidade de sensibilização da ftalocianina em reações de transferência de elétrons ou energia e a fotoprodução de 1O_2 (BONNETT, 1995; BONNETT, 1999; NUNES, SGUILLA e TEDESCO, 2004). Portanto, a baixa solubilidade da AlClPc impede sua aplicação direta no tecido biológico alvo (ROCHA et al., 2012). Uma maneira de solucionar esse problema é com a utilização de sistemas de veiculação de fármacos (*Drug delivery system-DDS*). Além disso, sua estrutura pode ser modificada

quimicamente inserindo outros metais entre os quatro nitrogênios ou substituintes axiais que mudam sua solubilidade (ZHENG et al., 2013b; ZHENG et al., 2013a).

Figura 3. Estrutura química da ftalocianina de cloro alumínio.

1.4 Os fármacos leishmanicidas

A anfotericina (Figura 4 A) é um antibiótico antifúngico, da família polieno que foi isolado a mais de 50 anos a partir do *Streptomyces nodosus* (GANI+RE MONTEIL et al., 1998). Ela existe em duas formas, A e B, sendo esta última, mais ativa e utilizada clinicamente. É uma molécula ativa contra uma ampla gama de fungos, incluindo espécies como: *Candida*, *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis*, *Blastomyces*, *Purucoccidioides brasiliensis*, *Sporotrichum schenckii*, *Aspergillus*, *Mucor*, entre outros. A anfotericina é sensível a luz, calor, ar e pH inferior a 6 e superior a 9 (GOLAS et al., 1983; KLEIMBERG, 2006). A molécula tem polaridade facial devido à presença heptaeno, de domínio altamente hidrofóbico de um lado e de grupos hidroxilos hidrofílicos, por outro lado, lhe configurando um caráter anfótero. Esta polaridade facial lhe permite associar com surfactante baseados no sistema de entrega de drogas (TORRADO et al., 2008; BRAJTBURG e BOLARD, 1996; KLEINBERG, 2006).

Já o resveratrol (3, 4, 5-trihidroxiestilbeno) é um polifenol, que contém em sua estrutura básica dois ou mais anéis fenólicos ligados (Figura 4 B), de origem natural,

encontrado nas sementes e casca da uva, casca de amendoim, nos vinhos tinto e nas plantas incluindo Kojo-kon (*Polygonum cuspidatum*), Kashuwu (*Polygonum multiflorum*) e eucalipto (*Eucalyptus Sideroxylon*). Descrito como uma substância anti-inflamatória (POULSEN et al., 2015), antioxidante (fator crítico em uma variedade de infecções cutâneas) é um fármaco muito interessante para ser incorporado em produtos dérmicos (CADDEO et al., 2013)), antivirais, antibacteriana, moduladora do sistema imune, cardioprotetora, anticancerígena (SINGH , NDIAYE e AHMAD, 2015), além de aumentar a resistência ao stress celular, o que confere longevidade (PERVAIZ e HOLME, 2009), de possuir propriedades leishmanicidas (FERREIRA et al., 2014; LUCAS e KOLODZIEJ, 2013) e redutoras de gorduras (DE LIGT , TIMMERS e SCHRAUWEN, 2015; BAILE et al., 2011). Diversos estudos comprovam ainda sua atividade imunomodulatória *in vitro* e *in vivo*, estimulando ou diminuindo a secreção de citocinas (Santos, 2010) (GAO et al., 2001). Pode ser usado em vacinas como adjuvantes e aplicado na profilaxia e tratamento de doenças imunodegenerativas (BASTIANETTO , MENARD e QUIRION, 2015). Apesar de muitas evidências sobre as atividades farmacológicas, não está claro como a droga atinge os tecidos alvo.

A chalcona do tipo CH8 (Figura 4 C) (3-nitro-2'-hidroxi-4,6'-dimetoxichalcona) obtida por rota sintética (ROSSI-BERGMANN et al., 2002) é um composto com propriedades leishmanicidas promissoras. As chalconas são compostos simples da família dos flavonóides, presentes em diversas espécies de plantas com atividade antibacteriana e antifúngica (BOECK et al., 2006). Possuem também propriedades antioxidantes, antiangiogénicas, antiprotozoários, protetor gástrico, anti-tumorigénicas, anti-inflamatórias, entre outras.

A

Figura 4. Estrutura química dos fármacos encapsulados A) anfotericina B) chalcona CH8 C) resveratrol.

1.5 Nanotecnologia

A nanotecnologia baseia-se no fato de que os materiais na escala nanométrica (igual ou inferior a um bilionésimo de metro) podem apresentar propriedades físico-químicas, químicas e comportamentais diferentes daquelas apresentadas em escalas maiores (ROSSI-BERGMANN, 2008).

A descoberta de novos medicamentos é apenas uma das muitas áreas da saúde que a nanotecnologia vem beneficiando. Existem aplicações promissoras na nanomedicina baseada no uso de sistemas veiculadores de fármacos (DDS), para diagnóstico *in vitro*, imagem *in vivo*, protocolo de terapêutico para várias patologias, produção de biomateriais, engenharia de tecidos, entre outros (SHI et al., 2010).

As propriedades chave de qualquer nanomaterial utilizado na entrega veicular dos ativos são a sua biodegradabilidade e biocompatibilidade, de modo que o DDS nanométrico possa ser metabolizado ou degradado em componentes não tóxicos (MALAM, LOIZIDOU, SEIFALIAN, 2009). Ter o mínimo de imunogenicidade e incorporar o ativo no organismo sem perda ou alteração em sua atividade é conclusivo e necessário para o sistema escolhido, possibilitando assim que o mesmo possa ser administrado em sua forma monomérica. Deve também promover o acúmulo seletivo

em células alvo, estando ausente em células saudáveis (KONAN , GURNY e ALLEMANN, 2002).

As vantagens de incorporar fármacos em nanosistemas comparado aos sistemas convencionais, em suma são: transporte eficiente do fármaco, biocompatibilidade, liberação controlada impedindo doses tóxicas ou subterapêuticas e ausência de efeitos adversos inerentes a fármaco, bem como poder ser administrado por diferentes vias como oral, transdérmica, ocular, nasal, subcutânea, intraperitoneal e intramuscular. Deve permitir que sejam injetados diretamente na circulação sistêmica sem o risco de bloqueio dos vasos sanguíneos(FATTAL et al., 1998; LETCHFORD e BURT, 2007; PRIMO, 2009).

Nas formas de administração convencionais (injeção ou pílula) a concentração do fármaco na corrente sanguínea apresenta um aumento, após um tempo pré-determinado, atinge um pico máximo, que pode muitas vezes ultrapassar os limites tóxicos. Este então declina rapidamente, portando os níveis plasmáticos do fármaco são dependentes das dosagens administradas (Figura 5).

Já os nanosistemas de liberação controlada têm como objetivo manter as concentrações do fármaco constante com uma única dosagem, diminuindo os picos e vales de concentração plasmática. Logo, este tipo de liberação além de ser eficiente possui vantagens econômicas (PRIMO, 2009; DE AZEVEDO,2005).

Figura 5. Perfil de liberação dos fármacos: —convencional x — controlada (DE AZEVEDO, 2005).

Notamos também, maior tempo de permanência do fármaco na circulação, com diminuição da toxicidade e decomposição do fármaco (degradação biológica, por enzimas, pH). Tais características, portanto, conduzem a uma administração segura, sem causar reações inflamatórias locais com maior conveniência ao paciente (menor número de doses). A possibilidade de direcionamento a alvos específicos na escolha e design destes sistemas surge como mais uma vantagem adicional. A capacidade de associação tanto de substâncias hidrofílicas quanto hidrofóbicas, também aparece como outro ponto chave para o desenvolvimento desta área da ciência (COUVREUR , DUBERNET e PUISIEUX, 1995; GUINEBRETIERE et al., 2002a; SIMIONI et al., 2007; SWARNALATHA et al., 2008; WANG , CHEN e XU, 2008; AMARAL et al., 2009; CUNHA-AZEVEDO et al., 2011; SOUZA et al., 2015).

Dentre os principais carreadores coloidais de fármacos conhecidos hoje, merecem destaque as nanopartículas poliméricas (nanoesferas e nanocápsulas), lipossomas, nanoemulsão, micelas poliméricas e dendrímeros (CHATTERJEE , FONG e ZHANG, 2008; HAMIDI , AZADI e RAFIEI, 2008; KIRILOV et al., 2008; KONAN , GURNY e ALLEMANN, 2002).

1.6 Nanocápsulas poliméricas

Nanopartículas poliméricas se apresentam como uma classe de DDS. Designadas como nanoesferas ou nanocápsulas, estes sistemas diferem entre si segundo a sua organização estrutural e sua composição. As nanocápsulas (NC) são constituídas por um núcleo geralmente oleoso envolvido por uma membrana polimérica caracterizando se como um sistema nanovesicular do tipo reservatório (QUINTANAR-GUERRERO et al., 1998; SCHAFFAZICK et al., 2003a; ANTON , BENOIT e SAULNIER, 2008a; LETCHFORD e BURT, 2007) (Figura 6 , 7 e 8). O fármaco a ele associado será liberado gradualmente da nanopartícula por difusão ou erosão. A vantagem das nanopartículas poliméricas em relação aos sistemas lipossomais, por exemplo, é que além do menor custo dos polímeros usados na sua fabricação em relação aos fosfolipídios, o sistema é mais estável, o que pode facilitar a estocagem à temperatura ambiente e aumentar o tempo de prateleira do medicamento (ROSSI-

BERGMANN, 2008). Já as nanoesferas são constituídas unicamente por uma matriz polimérica, não apresentam núcleo e o fármaco a ela associado pode ficar adsorvido a superfície ou retido no interior da matriz (QUINTANAR-GUERRERO et al., 1998; ANTON, BENOIT e SAULNIER, 2008a; LETCHFORD e BURT, 2007).

Figura 6. Esquema de nanocápsulas e nanoesferas poliméricas: (a) fármaco dissolvido no núcleo oleoso das nanocápsulas; (b) fármaco adsorvido à parede polimérica das nanocápsulas; (c) fármaco retido na matriz polimérica das nanoesferas; (d) fármaco adsorvido ou disperso molecularmente na matriz polimérica das nanoesferas (SCHAFFAZICK et al., 2003b).

Figura 7. Característica estrutural do núcleo de nanoesfera e nanocápsula (SCHAFFAZICK et al., 2003b).

Figura 8. Representação de uma nanocápsula contendo ftalocianina no núcleo oleoso (Extraída e adaptada de PRIMO et al., 2008).

São descritos na literatura três metodologias farmacêuticas para obtenção de nanocápsulas (RAO e GECKELER, 2011): I) polimerização *in situ* de monômeros dispersos (AL KHOURI FALLOUH et al., 1986) II) deposição interfacial de polímero pré-formado ou deslocamento de solvente (FESSI et al., 1989) III) e técnica de emulsificação-difusão (QUINTANAR-GUERRERO et al., 1998).

Dentre estes três métodos, o de deposição interfacial do polímero pré-formado é o mais simples, não requerendo equipamentos e gastos dispendiosos, apresentando as vantagens de resultar em dispersões coloidais homogêneas, com tamanho médio da partícula entre 20 e 500 nm. Baseia-se na dispersão de um polímero biodegradável, como por exemplo, policaprolactona (PCL), poli-ácido láctico (PLA), poli-ácido glicólico (PGA) ou seu copolímero poli-láctico-*co*-glicólico (PLGA), natural ou sintético, de forma a obter um produto de tamanho inferior a 1µm. Este método está descrito na literatura utilizando as seguintes técnicas (MORA-HUERTAS, FESSI e ELAISSARI, 2010a; REIS et al., 2006)

a) Emulsificação e evaporação do solvente: uma fase lipofílica, composta por um solvente orgânico volátil (imiscível com água) contendo polímero e o fármaco dissolvidos, é emulsificada com a fase aquosa na presença de um tensoativo adicionado a esta fase, dependendo da solubilidade. A redução do tamanho das partículas é atingida com o uso de um homogeneizador de alta pressão. Logo após a formação da emulsão, o solvente orgânico é removido por evaporação, com aumento de temperatura e pressão, quando ocorre a precipitação do polímero e formação da nanocápsulas (Figura 9).

Figura 9. Representação esquemática da técnica emulsificação e evaporação do solvente ((REIS et al., 2006)).

b) A emulsificação espontânea e difusão do solvente. Tem-se neste método a difusão do solvente uma vez que a da fase orgânica é formada por uma mistura de dois solventes orgânicos, sendo um deles miscível em água e o outro imiscível. Quando ocorre mistura dessa fase orgânica mista com a água, o solvente miscível e água sofrem difusão espontânea de uma fase para outra, conduzindo a uma turbulência interfacial, levando a formação de partículas de tamanho reduzido. Neste momento ocorre a emulsificação que na presença de um estabilizante e forma as nanopartículas (Figura 10). Não existindo a necessidade de um equipamento de alta energia. Porém uma das desvantagens deste método é o uso de solventes orgânicos e grande quantidade de água.

Figura 10. Representação esquemática da técnica emulsificação e difusão do solvente (Adaptado (REIS et al., 2006)).

c) Método de nanoprecipitação ou deslocamento de solvente necessita de uma fase orgânica que consiste essencialmente de um solvente ou uma mistura de solventes miscível em água (por exemplo, etanol, acetona, hexano, metileno cloreto ou dioxano) e de uma substância para a formação de uma película como um polímero (que pode ser sintético, semi-sintético ou um polímero de ocorrência natural). Os principais polímeros

utilizados para a produção de nanopartículas por este método são policaprolactona (PCL), poli-ácido láctico (PLA), poli-ácido glicólico (PGA) e seu copolímero poli-láctico-*co*-glicólico (PLGA)(MORA-HUERTAS , FESSI e ELAISSARI, 2010a). Além destes componentes tem se o uso dos ativos, emulsificante, tensoativo e substâncias lipofílicas. O polímero e o ativo são dissolvidos no solvente miscível em água e então, vertidos sobre a fase aquosa, contendo o tensoativo. As nanopartículas se formam por difusão do solvente, deposição do polímero nas gotículas e posterior eliminação do solvente sob pressão reduzida (Figura 11). A adição da solução orgânica resulta na emulsificação espontânea na forma de nanogotículas recobertas pelo polímero. Este fenômeno ocorre devido à instabilidade na interface óleo/água resultante da rápida difusão do solvente orgânico na fase aquosa, e intensa diminuição na tensão interfacial. Portanto, a formação da nanocápsulas pode ser explicada pela turbulência interfacial ou agitação espontânea gerada na interface dos dois líquidos envolvendo fluxo, difusão e processos de superfície conhecidos como efeito Gibbs-Marangoni (DERAKHSHANDEH , ERFAN e DADASHZADEH, 2007; FESSI et al., 1989; MORA-HUERTAS , FESSI e ELAISSARI, 2010b). É o método mais utilizado pelas pesquisas, devido a sua simplicidade de procedimento, baixo custo, reprodutibilidade, tamanho de partícula reduzido e alta eficiência de encapsulação de fármacos hidrofóbicos devido a sua cavidade central oleosa.

Figura 11. Representação esquemática da técnica nanoprecipitação (Adaptado de (REIS et al., 2006)).

d) Na secagem por aspersão ou *spray-drying* o polímero e o ativo são solubilizados em um solvente volátil. Em seguida, a mistura é aspergida no aparelho *spray-dryer*, onde uma corrente de ar aquecido evapora o solvente, resultando em partículas secas de tamanho reduzido. Uma das desvantagens desse método é a

agregação de partículas ou adesão das mesmas ao equipamento e modificação da estrutura cristalina das substâncias devido à rápida evaporação do solvente.

e) Na separação de fase prepara-se uma solução de polímero onde o ativo é solubilizado ou disperso, na qual é adicionado um não solvente. Ocorre então uma separação de fases líquido-líquido, onde o polímero é separado para uma das fases. Porém pode ocorrer formação de agregados.

f) Na técnica de *salting-out* há uma modificação do método de emulsificação com difusão do solvente, na qual a fase orgânica é emulsificada em um gel aquoso contendo um agente de *salting-out*. Excesso de água é adicionado à emulsão para que ocorra a difusão do solvente, induzindo a deposição do polímero e formação das nanopartículas. Tanto o solvente quanto o agente *salting-out* são eliminados por filtração.

Tendo em vista que existem diferentes alternativas para a síntese de nanocápsulas utilizando polímeros pré-formados, a escolha do método sempre vai depender de uma série de fatores como características físico-químicas do fármaco, particularmente a sua solubilidade, escolha da via de administração e do perfil de libertação do fármaco, a estabilidade substância do ativo sob as condições operacionais, particularmente agitação, eficiência de encapsulamento, a geração de resíduos, a natureza do solvente, o volume de água requerido e consumo de tempo. Porém em todos os métodos citados há um aumento da eficácia terapêutica do ativo porque sua biodistribuição segue a do transportador. Além disso, tem uma absorção intracelular relativamente mais elevada em comparação com micropartículas, este comportamento pode ser modificado dependendo das cargas de superfície e da natureza hidrófila ou hidrofóbica do polímero utilizado na formação da casca. Demonstrou-se que estratégias, tais como a modificação do polímero, a fim de se obter superfícies mais hidrofílicas ou revestimentos de polímero para obter superfícies carregadas positivamente pode proporcionar um melhor desempenho *in vivo*. Além disso, alguns estudos têm verificado comportamento favorável sobre a estabilidade da substância ativa quando encapsulada (BALA , HARIHARAN e KUMAR, 2004; GRABNAR e KRISTL, 2011; MORA-HUERTAS , FESSI e ELAISSARI, 2010a; OWENS e PEPPAS, 2006).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Desenvolver e caracterizar nanocápsulas poliméricas contendo diferentes fármacos: ftalocianina de cloro-alumínio, chalcona CH8, anfotericina B e resveratrol, e avaliar o efeito citotóxico e fototóxico *in vitro* em linhagem de macrófago RAW 264.7

2.2 Objetivos específicos

- Desenvolver formulações de nanocápsulas contendo AlClPc, CH8, AmB e RSV e acompanhar sua estabilidade ao longo do tempo;
- Desenvolver formulações de nanocápsulas com associação de fármacos: AlClPc associada a CH8, AlClPc associada ao RSV e AlClPc associada a AmB, e avaliar um possível efeito potencializador do FS frente aos fármacos leishmanicidas associados a doença em questão;
- Caracterizar as formulações de nanocápsulas através de suas propriedades características fotofísicas como estabilidade, tamanho das partículas e homogeneidade da formulação e propriedades fotoquímicas;
- Avaliar o efeito citotóxico AlClPc, CH8, AmB e RSV e fototóxico da AlClPc, AlClPc associada a chalcona CH8, AlClPc associada a anfotericina B e AlClPc associada ao resveratrol nanoencapsulados *in vitro*, utilizando linhagens de células de macrófagos RAW 264.7.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

Ftalocianina de cloro alumínio (85% pura), anfotericina B (80% pura), resveratrol, Poli (D, L-lactideco-glicolido) (PLGA) (50:50), copolímero bloco-poli-(óxido de etileno) poli-(óxido de propileno) EO76-PO29-EO76 (Pluronic F-68®), Pluronic F-127®, 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difenil tetrazólio (MTT), 3-Amino-7-dimethylamino-2-methylphenazine (Vermelho neutro), corante azul de tripan (~40%), óleo de soja foram adquiridos pela Sigma (Sigma-Aldrich co., St. Louis, MO, EUA). Chalcona CH8 (3-nitro-2'hidroxi-4 ', 6' dimetoxichalcone) sintetizada pela Professora Doutora Bartira Rossi Bergmann do Laboratório de Imunofarmacologia Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho-Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), parceira deste projeto. Lecitina de soja (Lipoid S 100®) foi adquirida de Lipoid GmbH (Ludwigshafen, Alemanha). Todos os outros produtos químicos apresentaram grau analítico.

A linhagem celular de macrófago RAW 264,7, foi obtida da *American Type Culture Collection*, ([ATCC® TIB-71™](#)). Para os estudos biológicos foram utilizados os meios de cultura celular RPMI (Gibco), tampão Hank's (Cultilab), antibiótico—penicilina/estreptomicina (Cultilab), soro fetal bovino (SFB estéril) e aminoácidos essenciais (AA) (Gibco).

3.2 Preparo de nanocápsulas contendo AlClPc e fármacos leishmanicidas associados

As nanocápsulas carregadas foram preparadas usando o método de nanoprecipitação ou deposição interfacial do polímero pré-formado como descrito por Fessi em 1989, com algumas modificações. Este método permite a formação espontânea de gotículas nanométricas oleosas rodeadas por uma membrana polimérica. Uma quantidade exata de polímero PLGA 50:50 (0,75% m/v) e lecitina de soja (fosfatidilcolina de soja) (1,75% m/v) foram pesados e dissolvidos em 15 ml de acetona a 40 ° C. O fármaco fotossensível e os demais fármacos leishmanicidas foram dissolvidos diretamente em óleo de soja (2,5% v/v) sob agitação vigorosa em vortex e ultra-som

Branson 1510 de banho (10 minutos) para uma concentração final de $0,05 \text{ mg.mL}^{-1}$ de AlClPc, $0,06 \text{ mg.mL}^{-1}$ de CH8, $0,3 \text{ mg.mL}^{-1}$ de RSV e $0,09 \text{ mg.mL}^{-1}$ de AmB respectivamente nas formulações. Esta solução foi incorporada na etapa 1 (fase orgânica) como representado esquematicamente na Figura 12 do preparo das nanocápsulas. A fase orgânica foi gotejada lentamente em solução aquosa (30 ml) contendo Pluronic F-68 (1,25% m/v) sob agitação moderada e constante (250 rpm) a 40°C . Após um intervalo de tempo determinado houve a remoção do solvente orgânico do meio por evaporação sob pressão reduzida (BUCHI Switzerland-Rotavapor R-215-Vacuum Controller V-855-Vacuum Pump V-700) a 40°C e rotação de 125 rpm e subsequente concentração da amostra à um volume final de 10 ml. As formulações foram então armazenadas a $4^\circ\text{C} \pm 2$ em frascos de vidro fechados hermeticamente e protegidos da luz.

Figura 12. Esquema de preparo de nanocápsulas poliméricas.

3.3 Processo de gelificação das nanocápsulas poliméricas

O uso de nanosistemas por via tópica visa aumentar a estabilidade dos produtos ativos, sobretudo contra a fotodegradação e oxidação, além de a fluidez característica dessas suspensões de nanopartículas contribuir para melhor espalhabilidade sobre a pele.

A gelificação térmica e reversível das nanocápsulas são propriedades que fazem do Pluronic F-127 um material útil para formar sistemas matriciais na forma de gel *in situ* usada como sistemas de liberação controlada e sustentada de fármacos (KIM et al., 2009; SELLERS et al., 2014). A solução aquosa de Pluronic F-127 a uma concentração na faixa de 20 a 30% (m/m) gelifica de forma reversível com a temperatura o sistema

DDS obtido, ou seja, apresenta-se na forma líquida a baixas temperaturas (4-5°C), gelificando à temperatura ambiente (ESCOBAR-CHAVEZ et al., 2006). Adicionou-se lentamente uma quantidade de 23% de Pluronic F-127 (m/m) a 10 ml de formulação de nanocápsulas previamente preparadas como descrito na seção 3.2 a uma temperatura de 4°C, com agitação magnética moderada constante obtida em uma Placa Corning Stirrer/Hot plate a uma velocidade de 250 rpm seguida por vórtex durante 1 minuto ao final da adição. Os géis foram armazenados a armazenadas a $4^{\circ}\text{C} \pm 2$, na geladeira, em frascos de vidro fechados hermeticamente e protegidos da luz.

3.4 Caracterização físico química das nanopartículas

3.4.1 Análise de tamanho das partículas e índice de polidispersidade

O diâmetro médio das nanocápsulas e o índice de polidispersidade (IPd) das formulações coloidais foram determinados por espectroscopia de correlação de fóton (LDS) a 25°C e o ângulo de dispersão de 173° (Zetasizer® Nano ZS, Malvern PCS Instruments, UK). As amostras foram obtidas por diluição de 30 μl de nanocápsulas em 3 ml de água ultrapura. Os valores relatados são a média $\pm$ erro médio padrão (EMP) de três lotes diferentes de cada dispersão coloidal.

3.4.2 Medida de potencial Zeta

O potencial ζ das nanocápsulas foi medida por mobilidade eletroforética utilizando um aparelho Zetasizer® Nano ZS (Malvern PCS Instruments, UK)(Figura 13). As análises foram conduzidas a 25°C , e as amostras foram diluídas conforme necessário (1/100) com solução KCl 0,1 M. Os valores apresentados são a média $\pm$ EMP de três lotes diferentes de cada dispersão coloidal.

Figura 13. Equipamento utilizado para realizar as medidas de tamanho de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta.

3.4.3 Estudos de estabilidade ao longo do tempo das formulações em condições adversas

Foi acompanhada a estabilidade das formulações de NC durante quatro meses, período que elas permaneceram estocadas em frascos de vidros selados, protegidos da luz e armazenados a 4°C e a 25° C em câmara climática (Panasonic). Foi realizado também um estudo de estabilidade das formulações em meio RPMI 3% durante 3 horas, com análises em intervalos de 1 hora. Nestes períodos descritos foram feitas análises de tamanho de partícula, IPd e potencial zeta. A estabilidade física das NC foi avaliada também quanto suas alterações macroscópicas, como presença ou não de precipitado, mudança de coloração e/ou sinais de instabilidade por coalescência ou cremeação.

3.4.4 Caracterização de estabilidade acelerada das formulações com uso do Lumisizer

Os estudos de estabilidade acelerada foram realizados em uma centrífuga analítica multi amostra LUMiSizer® (LUM GmbH, Alemanha). O instrumento emprega o STEP™ -Tecnologia (Extinção de Perfis resolvido no tempo e no espaço), o que permite medir a intensidade da luz transmitida durante a centrifugação, como uma função de tempo e de posição, ao longo de todo o comprimento da amostra. Na faixa de 880 nm referente à infravermelha próximo (NIR) ilumina toda a célula de amostra e a luz transmitida que é detectada por sensores dispostos linearmente através da amostra (acima e abaixo do suporte de detecção). A transmissão é convertida no coeficiente de

extinção pela relação por $\log I / I_0$ e a concentração das partículas podem ser calculadas. A progressão dos perfis de transmissão obtidos contém a informação completa sobre a cinética de estabilidade das formulações identificando quaisquer alterações na amostra devido à formação de natas, sedimentação, floculação, coalescência ou separação de fases.

Com base nestes perfis de extinção, processos de separação de fase foram quantificados em relação à velocidade de clarificação, sedimentação e velocidade de flutuação de partículas, turvação residual, volume de fase separada (líquido ou sólido).

A análise foi realizada como se segue: 400 µl das amostras, sem diluição anterior, foram colocadas em cubetas retangulares adequadas para o tipo de amostra com posição radial máxima de 129,5 mm (10 mm de percurso óptico) e exposto a uma força centrífuga sob 3000 rpm durante 3,5 horas 25 ° C, com base nos perfis de transmissão registrados a cada 50 segundos. A integração dos perfis de transmissão e inclinação foram fornecidos pelo *software* original SEPView 5.1 (LUM GmbH, Alemanha). Estes estudos permitiram a diferenciação entre os vários mecanismos de instabilidade, em um ritmo acelerado de aproximadamente 2300 vezes mais rápido comparado aos testes convencionais realizados. A extrapolação do comportamento para tempos mais longos foi utilizada para estimar o tempo de vida de prateleira (*shelf life*) dos diferentes tipos de formulações estudadas contendo os ativos de interesse.

Para calcular o tempo de *shelf life*, utilizou-se a Equação 1:

$$shelf\ life\ (segundos) = (t_m\ requerido \times RCF) \quad (1)$$

Onde, t_m requerido é o tempo total de coleta de dados de cada experimento, em segundos e RCF é a força centrífuga relativa (valor tabelado de acordo com a Lei de Stokes). Para converter o *shelf life* de segundos para meses, dividiu-se o tempo encontrado em segundos por 3.600 (1 h) x 24 (1 dia) x 30 (1 mês).

Figura 14. Ilustração do Lumisizer utilizado para fazer as medidas de estabilidade acelerada das formulações.

3.4.5 Análise morfológica por microscopia de força atômica (MFA)

A MFA possui a capacidade de fornecer imagens tridimensionais da superfície topográfica das formulações manométricas independentes da condutividade da amostra (REGGENTE et al., 2015).

As imagens das formulações em estudo foram adquiridas a temperatura ambiente, sem a necessidade de cobertura da amostra, utilizando o equipamento Scanning Probe Microscope modelo SPM-9600, da Shimadzu e *software* SPM Online, fornecido pela Shimadzu do Laboratório de Microscopia de Força Atômica do Departamento de Química da FFCLRP. Em uma superfície de mica foi depositada, espalhada e seca em jato de argônico uma gota (5,0 μL) das formulações NCAICIPc, NCAICIPc+RSV, NCAICIPc + AmB e NCAICIPc+CH8. As imagens foram obtidas pelo modo de contato intermitente, com cantilever de 124 μm de comprimento, operando em uma frequência de ressonância no intervalo de 324-369 KHz, rigidez de 34-51 N/m e força constante. Os resultados dimensionais foram processados usando o próprio *software* do programa. No mínimo dez imagens de cada amostra foram analisadas para garantir resultados reprodutíveis.

3.4.6 Determinação do comportamento reológico

Para determinar o perfil reológico e a viscosidade das formulações de NC e GelNC foi utilizado o Reômetro Modular Compact MCR 52 (Anton-Paar GmbH, Graz, Áustria) acoplado ao *software* START RHEOPLUS. As análises foram realizadas utilizando o *spindle* tipo cone/placa CP50-1, 50 mm, ângulo 1° e 0,6 ml de amostras a $25^\circ \pm 3$. As velocidades de rotação variaram no intervalo de 150 a 250 rpm e as leituras foram feitas em intervalos de 20 rpm, mantendo a rotação por 30 segundos, para se obter uma curva ascendente. O procedimento foi repetido no sentido inverso, com velocidades progressivamente decrescentes (250-150 rpm), para se obter uma curva descendente. Para os géis ainda foram realizadas medidas com uma velocidade de rotação constante de 150 rpm, variação de temperatura de 25-40°C com uma rampa de 0,03°C/s e leituras realizadas no intervalo de 112 segundos.

Após coletar e analisar as curvas, podemos classificar os fluidos e obter os parâmetros reológicos: índice de consistência (K); índice de fluxo (E); área de histerese e viscosidade aparente. Os cálculos deverão ser realizados para testar quatro modelos diferentes para as formulações. O modelo mais adequado para cada fluido depende da resposta à deformação e quão bem os dados experimentais se ajustarem ao modelo. Os dados deverão ser tratados como estimativa de função não linear de acordo com as seguintes Equações (2,3, 4 e 5) para os modelos de Bingham, Casson, Lei da Potência ou Ostwald e Herschley-Bultley, respectivamente:

$$\rho = \rho_0 + K D \quad (2)$$

$$\rho^{0,5} = \rho_0^{0,5} + K^{0,5} D^{0,5} \quad (3)$$

$$\rho = K D^E \quad (4)$$

$$\rho = \rho_0 + K D^E \quad (5)$$

Onde, ρ_0 é a tensão de cedência, ρ a tensão de cisalhamento, K a índice de consistência, D a taxa de cisalhamento e E o índice de fluxo.

3.4.7 Quantificação de AlClPc e dos fármacos leishmanicidas em nanocápsulas

A AlClPc presente nas formulações foi quantificada seguindo o método de quantificação da ftalocianina de cloro-alumínio em nanocarreadores, descrito e validado por Siqueira-Moura colaboradores (SIQUEIRA-MOURA et al., 2010). Para todos demais fármacos CH8, AmB e RSV, foram utilizadas as curvas validadas como descrito na seção 3.4.7.

Para isso foi necessário o rompimento das nanocápsulas evitando assim interferência da camada polimérica e bicamada lipídica nos estudos espectroscópicos. Inicialmente, uma alíquota de nanocápsulas (60 μ L) foi apropriadamente dissolvida em dimetil sulfóxido (DMSO) (1:1, v/v) e sonicada por 10 min (Ultrassom Branson 1510), i garantindo assim total liberação do analito da formulação no solvente. Depois disto, as amostras foram diluídas a um volume final de 3 mL com Acetonitrila grau analítico usado como solvente padrão e filtrada através de filtro 0,45 μ m (Millipore, EUA) antes de ser analisada por medidas no espectrofluorímetro ou espectrofotômetro como descrito na seção 3.4.9.

3.4.8 Validação de método analítico espectrofotométrico para quantificação de fármacos nas nanopartículas

Os estudos de validação foram realizados de acordo com os parâmetros estabelecidos pela Conferência Internacional de Harmonização (International Conference on Harmonisation, ICH) para registro de produtos farmacêuticos, visando o seu uso em humanos, com base no guia de validação da ICH intitulado Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1) (ICH, 2005), o qual é similar ao estabelecido pela The United States Pharmacopeia USP 30 NF 25 (USP, 2007) e por Siqueira-Moura e colaboradores (2010).

Em toda a validação analítica foi utilizado um espectrofotômetro de feixe duplo Perkin-Elmer Lambda 20. As análises foram realizadas em uma cubeta de quartzo de 10 mm de caminho óptico e os espectros foram obtidos com 2 nm de abertura do feixe e velocidade de varredura de 1200 nm min⁻¹. As absorbâncias foram medidas na faixa espectral de 250 a 800 nm.

3.4.8.1 Linearidade

Para estabelecer as linearidades dos métodos propostos foram construídas cinco curvas de calibração em sete níveis diferentes de concentrações variando de 5,00 a 22,00 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para a AmB, de 1,5-15,0 para o RSV e de 5,0-22,0 para a CH8, obedecendo a Lei de Lambert-Beer. A análise estatística de regressão ou ajuste por mínimos quadrados foi feita para todos os dados obtidos, a Análise de Variância (ANOVA) Unilateral e o Teste de Falta de Ajuste.

3.4.8.2 Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)

Os limites de detecção (LD) e limites de quantificação (LQ) para os métodos desenvolvidos foram estimados a partir da curva de calibração resultante do parâmetro da Linearidade. Os LD e LQ foram calculados de acordo com as Equações 6 e 7, respectivamente:

$$LD = (DP/b) \times 3,3 \quad (6)$$

$$LQ = (DP/b) \times 10 \quad (7)$$

Onde, DP é o desvio padrão do intercepto com relação ao eixo dos Y e b o valor da inclinação da curva analítica.

3.4.9 Espectroscopia de absorção e emissão de fluorescência

Após a extração com DMSO como descrito na seção 3.4.3, as medidas de absorção foram realizadas em meio de acetonitrila em um espectrofotômetro modelo Perkin-Elmer Lambda 20 na faixa de comprimentos de onda de 250 a 800 nm. Os espectros de emissão de fluorescência foram realizados apenas para o FS, pois os demais fármacos leishmanicidas não emitem fluorescência, num espectrofluorímetro Horiba Jobin Ivon-Spex Fluorolog-3 (New Jersey, USA), ajustado com uma excitação fixa em 615 nm e emissão de fluorescência na faixa de 650 e 750 nm.

3.4.10 Determinação da eficiência de encapsulação

Eficiência de encapsulação (E.E.%) de AlClPc nas nanocápsulas foi determinada pelo método de fluorescência previamente validado para este ativo conforme descrito por Siqueira-Moura e colaboradores em 2010. O conteúdo de AlClPc foi analisado com excitação fixa a 615 nm (Fluorolog-3 Espectrofluorímetro, Horiba, New Jersey, EUA) e emissão fixa em 674 nm. O conteúdo AlClPc livre foi determinado através da avaliação do fármaco não incorporado presente em um ultrafiltrado límpido obtido através de separação da fase aquosa, utilizando um procedimento de ultrafiltração / ultracentrifugação (Ultracel Microcon YM-100, Millipore, Irlanda) a $12.857 \times g$ durante 1 h, a 4°C (Eppendorf, Centrífuga 5810 R, Hamburgo, Alemanha). A eficiência de encapsulação de AlClPc em nanocápsulas foi calculada como segue Equação 8:

$$E.E.\% = \frac{TPc - LPc}{TPct} \times 100 \quad (8)$$

Onde, TPc representa a concentração total de ftalocianina na formulação de NC, LPc a concentração de ftalocianina livre presente no sobrenadante da amostra de NC submetida à ultracentrifugação/ultrafiltração para total separação da fase aquosa e TPct a concentração teórica de ftalocianina.

3.5 Ensaios *in vitro*

3.5.1 Cultivo e expansão de macrófagos RAW 264.7

As células de macrófago do tipo RAW 264.7 ([ATCC® TIB-71™](#)) foram cultivadas em estufa com 5% de CO_2 , a 37°C . Para os macrófagos o cultivo foi feito usando meio RPMI 1640 (enriquecido com 25 mM de HEPES e L-glutamina) suplementado com 10% de soro fetal bovino inativo, 100 U.mL^{-1} de estreptomicina e $2,3 \text{ g.L}^{-1}$ de bicarbonato de sódio. As culturas foram repicadas a cada 3 dias por ação mecânica, utilizando um raspador, para desadesão das garrafas, conforme procedimento padrão descrito por Freshney em 1994.

Toda a manipulação foi realizada em capela de fluxo laminar, modelo Pachane PA400 (Pachane Equipamentos de Laboratório Ltda), esterilizada com luz germicida UVA e UVB e fluxo contínuo de ar. Para manutenção da linhagem celular foi realizado

o congelamento das células com meio crioprotetor, composto por soro fetal bovino e 10% de DMSO em um processo de resfriamento realizado em freezer -80°C (Forma-Thermo Scientific TM) Os tubos criogênicos contendo as células foram mantidos em nitrogênio líquido a aproximadamente -196°C .

3.5.2 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 de macrófagos foram obtidas utilizando-se o conjunto de objetivas A-Plan 10x/0,25 Ph1, adaptado com uma câmera digital Canon 7.2 Mpixels, acoplada a um microscópio óptico Axiovert 40 CFL (Carl Zeiss, Göttingen, Alemanha).

As imagens foram registradas diretamente nos frascos como descrito na seção 3.5 a partir da cultura primária ou diretamente nas placas de 24 poços com meio RPMI 10% de soro fetal bovino e após tratamento com nanocápsulas e posterior irradiação com luz laser.

3.5.3 Ensaios de citotoxicidade

As células foram cultivadas até atingirem a confluência, e então, retiradas dos frascos de cultura utilizando o raspador, com subsequente centrifugação a $200 \times g$ por 10 minutos. Em seguida, as células foram ressuspensas em meio RPMI 1640 contendo 10% de soro fetal bovino. Os testes de contagens das células na câmara de Neubauer foram feitos com alíquotas de $100 \mu\text{L}$ desta suspensão ao qual foram adicionados $100 \mu\text{L}$ de solução de Azul de Tripán 0,4%, como descrito por Freshney em 1994. A contagem dentro da câmara foi realizada em um microscópio óptico Axiovert 40 CFL (Carl Zeiss, Göttingen, Alemanha) no campo claro com uma objetiva de aumento de 10 X. Foram contadas apenas as células viáveis (não coradas em azul). Para os ensaios *in vitro* de toxicidade foi padronizada uma concentração celular de 1×10^4 células/poço, as quais foram semeadas em placas de cultura de 96 poços. Já para os testes de fotocitotoxicidade e microscopia confocal foi padronizada uma concentração de 2×10^4 células/poço, em placas de cultura de 24 poços.

3.5.3.1 Ensaio *in vitro* de toxicidade (ausência do estímulo luminoso)

A citotoxicidade dos fármacos livres e nanoestruturados foram investigadas através de curvas de dose-reposta obtidas pelo ensaio de viabilidade celular de MTT.

Após contagem e plaqueamento das células como descrito na seção 3.6, as placas foram incubadas à 37°C e 5% de CO₂ por 12 horas. O ensaio de toxicidade na ausência de luz foi realizado com NCAICIPc nas concentrações de 10µM, 5 µM e 1µM e 0,5µM, NCAmB nas concentrações de 8 µM, 4µM, 2 µM e 1µM, NCRSV nas concentrações de 100 µM, 75 µM, 50 µM e 25 µM e NCCH8 nas concentrações de 15 µM, 10 µM, 5µM e 1µM. Estas concentrações também foram usadas para os fármacos livres. Após escolhida a concentração ideal de trabalho realizou-se o mesmo procedimento para as formulações combinados NCAICIPc(5µM)+AmB(4µM), NCAICIPc(5µM)+RSV e NCAICIPc(5µM)+CH8 (10µM).

Foram feito também estudos para os fármacos livres associados: AICIPc(5µM)+AmB(4µM), AICIPc (5µM)+RSV(50 µM), AICIPc(5µM)+CH8(10 µM). A toxicidade da AICIPc, AmB, RSV e CH8 livres foram avaliadas após adequada diluição de uma solução estoque em DMSO nos dois primeiros casos e acetona nos últimos em meio RPMI 1640, esta diluição foi realizada de forma que a concentração final de DMSO ou acetona no meio de cultura nunca excedesse 0,5% (v/v), evitando assim, citotoxicidade induzida pelo solvente orgânico. Inicialmente, foram adicionados meio RPMI 1640 3% de soro fetal bovino contendo NC ou fármacos livres. As células foram incubadas com as amostras por um período de 3 h protegidos da luz. Posteriormente, os meios foram retirados e substituídos por meio RPMI 1640 contendo 10% soro fetal bovino. Após 24 horas, realizou-se o ensaio colorimétrico padrão de viabilidade celular usando brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolio-MTT como descrito na seção 3.6.3 (DENIZOT e LANG, 1986; TWENTYMAN e LUSCOMBE, 1987). Como controle utilizou-se um conjunto de 16 poços contendo células saudáveis e sem adição da formulação de NC. Já para o controle positivo foram utilizados 16 poços contendo células e NC vazias. Os resultados obtidos

foram os valores médios da viabilidade celular $\pm$ erro padrão médio (EPM) de experimentos realizados em triplicata.

3.5.4 Ensaio *in vitro* de fototoxicidade (aplicação da TFD)

Em todo o experimento com aplicação de estímulo luminoso a concentração de AlClPc utilizada foi de $5 \mu\text{mol.L}^{-1}$, a de AmB foi de $4 \mu\text{mol.L}^{-1}$, a de RSV de $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$ e a de CH8 foi de $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$, concentração estas estabelecidas a partir do ensaio anterior descrito na seção 3.6.1. Após as células atingirem a confluência e serem plaqueadas em placa de 24 poços, o meio RPMI 10% de soro fetal bovino foi substituído por meio RPMI 1640 3% de soro fetal bovino, contendo AlClPc nanoencapsulada bem como as formulações associadas estudadas, permanecendo em incubação por 3 h em estufa a 37°C , 5% de CO_2 e protegidos da luz. Em seguida, o meio foi retirado e adicionado meio RPMI 1640 sem vermelho de fenol para aplicação da luz monocromática laser a 675 nm. As células foram irradiadas usando um laser *Eagle 2W-630 nm* (Quantum Tech) operando em uma potência de 80 mW com tempos de irradiação ajustados de maneira a obter densidades de energias de 40,0; 70,0; 150,0; 300,0; 500,0 mJ.cm^{-2} e 1,0 J.cm^{-2} para as linhagens de macrófagos RAW 264.7. Após irradiação, o meio sem vermelho de fenol foi substituído por meio RPMI 1640 10% de soro fetal bovino e as células foram novamente incubadas (5% de CO_2 e 37°C) por um tempo adicional de 24 h. Em seguida, foi realizado o ensaio de viabilidade celular padrão MTT. Neste experimento o controle foi estabelecido como poços contendo células sem fotossensibilizante e não irradiadas. Os resultados obtidos foram valores médios da viabilidade celular $\pm$ erro padrão médio (EPM) de experimentos em triplicata.

Figura 15. Sistema de irradiação com fibra-óptica difusa usado nos estudos de fotoestimulação (luz monocromática $\lambda = 675$ nm).

3.5.5 Ensaio de viabilidade celular: avaliação da atividade mitocondrial através do teste de MTT

O ensaio de viabilidade celular MTT foi realizado conforme protocolos descritos por Denizot e Lang e Twentyman e Luscombe. Após 24 h do tratamento das células com as formulações em estudo adicionou-se 420 μL de meio RPMI 1640 sem vermelho de fenol e livre soro fetal bovino bem como 80 μL de solução de MTT (5 mg.mL^{-1}) a cada poço. As células foram re-incubadas por 4 h em estufa a 37°C e 5% de CO_2 , sendo por fim retirado o meio contendo MTT e adicionado 500 μL de 2-propanol para solubilizar o produto formazam obtido. As leituras espectrofotométricas dos poços foram realizadas em 560 nm com correção de absorção basal em 690 nm em leitor do tipo ELISA *Safire2* (TECAN Group Ltd., Grödig, Austria). Os resultados foram apresentados como porcentagem em relação ao controle calculados segundo a Equação 9:

$$\text{Células viáveis(\%)} = (\text{Absorbância}_{\text{amostra}} / \text{Absorbância}_{\text{controle}}) \times 100 \quad (9)$$

3.5.6 Ensaio de viabilidade celular utilizando o corante vermelho neutro

O protocolo do ensaio de viabilidade foi seguido conforme descrito por Borenfreund e Puerner em 1984. O corante Vermelho Neutro caracteriza-se por acumular-se preferencialmente nos lisossomas de células viáveis (FOTAKIS e

TIMBRELL, 2006a) que incorporam esse corante vital, ligeiramente catiônico, através da membrana celular por difusão passiva não-iônica e se concentram nos lisossomas, onde são fixados através de ligações eletrostáticas aos grupos aniônicos como os fosfatos hidrofóbicos da matriz lisossomal (KAKANJ et al., 2015; REPETTO, DEL PESO e ZURITA, 2008).

As células foram plaqueadas em placas de 96 poços como descrito na seção 3.5.2. O ensaio de toxicidade do Vermelho Neutro foi realizado para avaliar a citotoxicidade dos fármacos livres e associados, como descrito para os estudos com MTT.

As células foram incubadas com fármacos livres associados nas concentrações de AlClPc(5μM)+AmB(4μM), AlClPc (5μM)+RSV(50 μM), AlClPc(5μM)+CH8(10 μM), a partir de diluições dos estoques em meio RPMI 3% de soro fetal bovino. As placas ficaram incubadas em estufa umidificada com 5% de CO₂ a 37 °C por 24 horas. Decorrido esse tempo, o sobrenadante foi retirado e 200 μL de solução de Vermelho Neutro (40 μg/mL) foi adicionado e a placa foi incubada novamente em estufa umidificada nas condições descritas acima por mais 3 horas. Em seguida, retirou-se o sobrenadante e adicionou-se 200 μL de tampão PBS (1X) para o procedimento de lavagem. Logo após este procedimento, retirou-se o sobrenadante e adicionou-se 100 μL de solução de ácido acético glacial/água/álcool na proporção molar de 1:49:50 v/v/v/ (BABICH e BORENFREUND, 1991; MOHAMMADI-BARDBORI et al., 2008). Medidas de absorção em 540 nm foram lidas no leitor de placas tipo ELISA *Safire2* (TECAN Group Ltd., Grödig, Austria). O cálculo utilizado para avaliar a percentagem de viabilidade celular segue a Equação (10):

$$\text{Células viáveis (\%)} = (\text{Absorbância}_{\text{células tratadas}} / \text{absorbância}_{\text{controle}}) \times 100 \quad (10)$$

A percentagem total de citotoxicidade foi calculada segundo a equação (11):

$$\text{Citotoxicidade(\%)} = 100 - \text{percentagem de viabilidade} \quad (11)$$

Ao controle atribuiu-se 100% de viabilidade.

3.6 Análise estatística

A análise estatística dos dados foi realizada utilizando ANOVA seguido pelo teste de Tukey. Todos os dados são expressos como a média $\pm$ EMP de três experiências independentes. A probabilidade de $p < 0,05$ foi considerada significativa neste estudo.

3.7 Microscopia confocal

As células RAW 264.7 foram cultivadas em frascos de cultura de célula a 37 °C, com 5% de CO₂, até que estivessem confluentes. Para as experiências de localização subcelular, cerca de $2,0 \times 10^4$ células foram cuidadosamente adicionadas a placas de 24 poços sob lamelas de vidro (13 mm). As células permaneceram em cultura durante 24 h, 37 ° C, sob 5% de CO₂. Em seguida, foram tratadas com NCAIClPc e demais associações de estudo nas concentrações determinadas previamente no ensaio 3.6.1 de toxicidade (AlClPc sempre na concentração de 5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, AmB 4 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, RSV 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ e CH8 10 $\mu\text{mol.L}^{-1}$), durante 3 h. As células não tratadas com nanocápsulas foram usadas como controle negativo. Após o tratamento, as células foram lavadas duas vezes com PBS (1X) e fixadas com paraformaldeído a 2% diluído em tampão PBS (1X) durante 20 minutos em gelo. Subsequentemente, as células foram lavadas cinco vezes com PBS (1x) contendo glicina 100 mM (Sigma) e permeabilizadas com Triton X-100 a 0,1% (Sigma) diluída em PBS (1X) durante 10 minutos à temperatura ambiente. As células foram então lavadas duas vezes com PBS (1X) e incubadas com o marcador Alexa Fluor 488 Faloidina (Life technologies) na diluição de 1:20 em PBS (1X) durante 15 minutos. Em seguida, as lâminas foram lavadas cinco vezes com PBS (1X), água destilada, e montada em lâminas de vidro, utilizando o reagente antifade ProLong® ou montagem médias (Life Technologies) contendo DAPI (4', 6-diamidino-2-fenilindole). As lâminas foram observadas em TCS-SP5 laser de microscopia confocal (Leica Microsystems, Mannheim, Alemanha). Uma emissão/excitação (641/780 nm) foi utilizada para detectar a AlClPc; Faloidina foi detectada em 495/518 nm; e DAPI foi detectada em 358/461 nm.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Preparação das nanocápsulas

As nanocápsulas poliméricas de PLGA foram preparadas pelo método de nanoprecipitação (FESSI et al., 1989) com algumas modificações, citado por Siqueira-Moura e colaboradores (SIQUEIRA-MOURA et al., 2013), que fizeram um planejamento fatorial eficiente indicando os principais efeitos de cada uma dos fatores testados sobre a formulação e ofereceram uma direção promissora para a produção das nanopartículas em bancada e em escala piloto, com características adequadas para futuras aplicações terapêuticas. Esta técnica oferece vantagens consideráveis na preparação de nanosistemas para a entrega de fármacos devido à utilização de excipientes de baixa toxicidade, biocompatíveis e solventes não clorados que podem ser removidos da preparação (FESSI et al., 1989; SIQUEIRA-MOURA et al., 2013). Nanopartículas de polímeros biodegradáveis vem sendo exploradas devido às suas vantagens, tais como uma maior estabilidade do fármaco encapsulado e aumento da solubilidade dos compostos lipofílicos (ANTON , BENOIT e SAULNIER, 2008b; COUVREUR , DUBERNET e PUISIEUX, 1995; LETCHFORD e BURT, 2007; MISHRA , PATEL e TIWARI, 2010).

Este método baseia-se na obtenção de um sistema nanoemulsificado através de um processo de emulsificação do óleo (contendo os ativos de interesse) quando a fase orgânica é adicionada a fase aquosa, formando-se assim nanogotículas cercados por uma fina película polimérica (ANTON , BENOIT e SAULNIER, 2008b; LETCHFORD e BURT, 2007; ANTON , BENOIT e SAULNIER, 2008b; LETCHFORD e BURT, 2007; MISHRA , PATEL e TIWARI, 2010). A formação de partículas por meio dessa técnica tem sido atribuída a uma rápida difusão do solvente orgânico na fase aquosa que resulta em turbulência interfacial hidrodinâmica conhecido como o efeito de Marangoni (FESSI et al., 1989; MORA-HUERTAS , FESSI e ELAISSARI, 2010b).

4.2 Gelificação das nanopartículas

A gelificação térmica, reversível e de baixa toxicidade de formulações são propriedades que fazem da classe dos copolímeros, como os poloxamers, no caso o Pluronic F-127 um material útil para o preparo de sistemas de liberação controlada e

sustentada de fármacos, atuando como formador de uma matriz para gel *in situ* (KIM et al., 2009; SELLERS et al., 2014). O tipo de polímero utilizado é um fator muito importante na formação do gel, pois influencia diretamente as propriedades reológicas da formulação bem como a sua estabilidade física.

Otimizou-se a técnica de gelificação em nossos estudos usando o ultra turrax ou agitação magnética com concentrações variadas de Pluronic F-127. Nas condições citadas na seção 3.2, obteve-se géis estáveis e com propriedades físico químicas como diâmetro médio na faixa de 300 nm, IPd de 0,4 e potencial zeta negativo da ordem de -20. Os valores anteriores ao processo de gelificação e após este processo são representados na Tabela 1. O aumento do tamanho médio observado se deve ao fato de que as nanopartículas foram envolvidas por uma rede polimérica, conferindo um aumento de estabilidade do sistema, como será mostrado no estudo de estabilidade acelerada da seção 3.5. Este processo indicou ser ótimo para obtenção de uma formulação farmacêutica para uso tópico com a vantagem de ser um processo reversível, ou seja, armazenando-o a 4°C temos uma solução, já em temperatura ambiente temos um gel.

Tabela 1. Resultado da caracterização físico química das nanocápsulas antes e depois de passarem pelo processo de gelificação com 23% de Pluronic F-127

Formulações	Diâmetro médio (nm) ^a	IPd ^a	Potencial ζ (mV) ^a
NCAICIPc	210,8±1,0	0,25	-19,0±0,20
NCAICIPcAmB	208,0±2,0	0,25	-22,5±0,20
NCAICIPcCH8	211,0±0,7	0,24	-18,7±0,15
NCAICIPcRSV	200,1±0,7	0,20	-15,0±0,12
GelNcAlCIPc	292,0±2,0	0,28	-10,0 ±0,20
GelNcAlCIPcAmB	286,0±2,8	0,38	-14,0±0,20
GelNcAlCIPcCH8	255,0±4,4	0,15	-14,0±0,12
GelNcAlCIPcRSV	258,5±0,7	0,22	-15,1±0,25

^a Mean ± EMP (n=3)

4.3 Caracterização das nanocápsulas

4.3.1 Estudo de estabilidade das nanocápsulas ao longo do tempo: Análises de tamanho, IPd e potencial zeta

Tanto o tamanho médio de partícula quanto o potencial zeta em função de tempo foram utilizados como indicadores de estabilidade desses sistemas coloidais durante esta avaliação. Estes parâmetros estruturais das partículas estão intimamente associados com o início da perda de estabilidade dos sistemas que podem resultar nos processos de instabilidade como floculação, formação de creme ou coalescência.

As nanocápsulas poliméricas contendo ALCIPc, AmB, CH8 e RSV apresentaram-se estáveis durante o período de 120 dias armazenadas a 4°C, protegidas da luz. O diâmetro médio das formulações citadas acima variou de 222 a 340 nm (Figura 16 A). O índice de polidispersão (IPd) é um indicativo da distribuição de tamanho de uma formulação. Todas as formulações apresentaram um IPd abaixo de 0,4, confirmando a obtenção de NC com baixa polidispersividade. Formulações com $IPd \leq 0,3$ podem ser consideradas como sistemas com baixa polidispersividade (Figura 16 B). Com relação ao potencial zeta, todas as cargas da superfície foram negativas, com valores em módulo da ordem de 30 mV (Figura 16 C), concordando com os descritos na literatura. A fosfatidilcolina e o óleo de soja são os componentes que mais contribuem para o incremento do valor negativo do potencial da superfície, independente da concentração de polimérica (PLGA) utilizada. É amplamente conhecido que a lecitina possui fosfolipídios carregados negativamente, e que a ionização dos grupos fosfato e colina da fosfatidilcolina contribuiriam ainda mais para o valor negativo do potencial zeta das NC. Além disso, os ácidos graxos presentes no óleo de soja também influenciam através da ionização dos mesmos (CAUCHETIER et al., 2003; PEREIRA et al., 2008a; SIQUEIRA-MOURA et al., 2013; TEIXEIRA et al., 2005).

Figura 16. Resultados de diâmetro médio ($\pm$ DP, colunas) (A), Índice de polidispersão (IPd) ($\pm$ DP, linhas)(B) e os valores médios do potencial zeta (ζ) ($\pm$ DP) (C) das formulações não associadas NCAICIPc, NCAmB, NCRSV, NCCH8 para o estudo de estabilidade de 1, 15,30,60, 90 e 120 dias.

As NCAICIPc em associações com os ativos leishmanicidas tiveram variações muito pequenas ($p < 0,05$) entre si e ao longo dos 120 dias de análise no diâmetro médio da ordem de 196 a 250 nm, índice de polidispersão de 0,16 a 0,33 e potencial zeta de -10 a -31,5 mV (Figura 17 A,B e C). Como já mencionado acima estes resultados estão dentro do esperado conforme descrito na literatura e foram confirmados pelo teste de estabilidade acelerada. Os potenciais de superfície aumentam em módulo com adição de AICIPc devido a interações do FS com a parede das nanopartículas este fato pode reduzir o valor absoluto do potencial zeta significativo. Conforme associou-se outros ativos a NC seu diâmetro tende a diminuir, na ordem de $NCAICIPc < NCAICIPc + Resv < NCAICIPc + CH8 < NCAICIPc + AmB$. Uma possível explicação seria que a adição de ativos pode diminuir a tensão superficial das NC, podendo estar inseridos na interface e não somente no núcleo oleoso, dependendo da hidrofobicidade destes fármacos, podemos concluir que aumentos na concentração de fármaco produz uma redução no tamanho uma vez que se observa um aumento da associação da droga com o nanocarreador. Uma possível explicação para isso se baseia na interação dos fármacos com a parede polimérica produzindo-se complexos ativos.

A

Figura 17. Resultados de diâmetro médio ($\pm$ DP, colunas) (A), Índice de polidispersão (IPd) ($\pm$ DP, linhas) (B) e os valores médios do potencial zeta (ζ) ($\pm$ DP) (C) das formulações associadas NCAICIPcCH8, NCAICIPcRSV e NCAICIPcAmB para o estudo de estabilidade de 1, 15, 30, 60, 90 e 120 dias.

4.3.2 Estudos de estabilidade ao longo do tempo das formulações em condições adversas

Durante os quatro meses de armazenamento em geladeira à 4 °C e protegidos da luz, as formulações permaneceram estáveis e com as suas características macroscópicas preservadas: fluidas, homogêneas, azuladas para as formulações com o FS, esbranquiçada para as formulações vazia e com resveratrol e amareladas para as formulações contendo AmB e CH8, sem sinais de instabilidade. O pH permaneceu em torno de 6,0. Por isso, as amostras de nanocápsulas associadas foram submetidas à diferentes condições de armazenamento. Análises de diâmetro, potencial zeta e IPd em meio de cultura RPMI 3% de soro fetal bovino foram feitas durante 3 horas, período

este de incubação padrão das células com as formulações para os testes *in vitro*. Durante este período as formulações permaneceram com as mesmas características iniciais, ou seja, tamanho nanométrico, baixa polidispersividade e potencial zeta negativo, sem variações significativas ($p < 0,05$), representado na Figura 18.

A

B

Figura 18. Resultados de diâmetro médio ($\pm$ DP, colunas) (A) e Índice de polidispersão (IPd) ($\pm$ DP, linhas) (B) e os valores médios do potencial zeta (ζ) ($\pm$ DP) (C) das formulações NCAICIPc, NCAICIPcAmB, NCAICIPcRSV, NCAICIPcCH8 para o estudo de estabilidade em meio de cultura RPMI 3% de soro fetal bovina durante o período de 3 horas.

A fim de confrontar os dados obtidos pela estabilidade acelerada feita com o uso do Lumisizer, as formulações foram armazenadas em câmara climática com temperatura controlada de 25°C e protegidas da luz. Análises de tamanho, IPd e potencial zeta foram feitas de 15 em 15 dias. Após quatro meses de análises notou-se diferenças significativas no tamanho e IPd de todas as formulações associadas, chegando a valores na ordem de 400 nm e IPd de 0,6 para a formulação de NCAICIPc (Figura 19).

Figura 19. Resultados de diâmetro médio ($\pm$ DP, colunas) (A) e Índice de polidispersão (IPd) ($\pm$ DP, linhas) (B) e os valores médios do potencial zeta (ζ) ($\pm$ DP) (C) das formulações NCAICIPc, NCAICIPcAmB, NCAICIPcRSV, NCAICIPcCH8 armazenadas em câmara climática e de fotodegradação a 25°C para o estudo de estabilidade de 1, 15, 30, 60 e 90 e 120 dias.

4.3.3 Estudo de estabilidade acelerada

A estabilidade de um produto pode se definida como o intervalo de tempo entre o momento de sua fabricação até aquele em que sua atividade não foi reduzida a um valor superior a 10%, desde que os produtos de alteração ou degradação estejam todos seguramente identificados (ANTON , BENOIT e SAULNIER, 2008b; COUVREUR , DUBERNET e PUISIEUX, 1995; MORA-HUERTAS , FESSI e ELAISSARI, 2010a;

VEHABOVIC et al., 2003). Os procedimentos de ensaios de estabilidade realizados no Brasil, um país de zona climática IV, ($30 \pm 2^\circ\text{C}$ / $75 \pm 5\%$) nas indústrias farmacêuticas seguem a RE nº 1/2005 citados pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) que define três estudos básicos: I) estabilidade acelerada onde se projeta para acelerar a degradação química e/ou mudanças físicas de um produto farmacêutico em condições forçadas de armazenamento; II) estudo de estabilidade de longa duração para verificação das características físicas, químicas, biológicas e microbiológicas de um produto farmacêutico durante e depois do prazo de validade esperado e III) estudo de estabilidade de acompanhamento, estudo este realizado para verificar se o produto farmacêutico mantém suas características físicas, químicas, biológicas, e microbiológicas em conformidade com os resultados obtidos nos estudos de estabilidade de longa duração.

O LUMiSizer® é uma centrífuga analítica multi amostra que analisa dispersões coloidais e possui ampla aplicação na previsão da estabilidade a longo prazo (*shelf life*) de produtos dispersos como suspensões e emulsões. Sua técnica emprega a tecnologia STEP™ (Space and Time Resolved Extinction Profiles) (Figura 20) que permite medir a intensidade da transmitância da luz em função do tempo e posição sobre todo o material acondicionado no receptor de amostra simultaneamente (CHIU et al., 2012; LERCHE e SOBISCH, 2014a). Com esse sistema pode-se observar uma eventual separação e sedimentação, em até aproximadamente 2300 vezes mais rápido do que nos testes convencionais (LERCHE, 2002; LERCHE e SOBISCH, 2014a; PETZOLD et al., 2009).

Figura 20. Princípios da tecnologia STEP (Space and Time Resolved Extinction Profiles).

Portanto com esta técnica, consegue-se estudar a estabilidade acelerada e determinar o tempo de vida de prateleira para as formulações obtidas (NCVazia, NCAmB, NCCH8, NCRSV, NCAICIPc, NCAICIPc+AmB, NCAICIPc+RSV, NCAICIPc+CH8 e géis de NCVazia, NCAICIPc, NCAICIPcCH8, NCAICIPcAmB e NCAICIPcRSV) onde os dados quantitativos são disponíveis pela integração dos perfis de transmissão (cinética da evolução das zonas de clarificação). A inclinação de tais gráficos está diretamente relacionada com a estabilidade. A inclinação zero significa que não há mudança da concentração das partículas ao longo do tempo de medição, ou seja, alta estabilidade. Por conseguinte, quanto maior for a inclinação da reta mais instável é a amostra. O processo de separação dos sistemas de nanopartículas foi avaliado através do acompanhamento das mudanças nos perfis causados pela cremosidade, sedimentação ou floculação (LERCHE e SOBISCH, 2014b). Como pode ser observado na Figura 21, a separação das amostras se torna mais pronunciada após os primeiros 2000 segundos a partir do início. Nota-se pelos perfis de transmissão que as formulações de NCAICIPc associadas e os géis são mais estáveis, ou seja, o primeiro perfil de transmissão traçado em vermelho e o último perfil em verde estão praticamente sobrepostos, enquanto que nas formulações, vazia e não associadas a diferença entre os perfis de transmissão ao longo da medida é grande. Para a formulação NCVazia e

NCCH8, as mais instáveis do grupo, os perfis de transmissão ao longo do tempo são muito diferentes, ou seja, o primeiro perfil e o último perfil estão distantes. A amostra NCAICIPcCH8 apresentou menor estabilidade no mesmo período de tempo que outras nanopartículas associadas; NCAICIPc associada com anfotericina B ou resveratrol demonstrou um perfil de transmissão praticamente com todas as curvas sobrepostas. Já os géis apresentaram perfis sobrepostos, indicando alta estabilidade.

NCVazia

GELNCVazia

NCAICIPc

NCRSV

NCAmB

NCCH8

NCAICIPcAmB

NCAICIPcCH8

NCAICIPcRSV

GelNCAICIPc

GelNCAICIPc+RSV

GelNCAICIPc+CH8

Figura 21. Evolução dos perfis de transmissão das formulações NCVazia, NCAICIPc, NCRSV, NCAmB e NCCH8, associações e NC gelificadas, centrifugadas a 3000 rpm por 3,5 h. Primeiro registro inferior, último perfis superior direito. A abscissa mostra a posição (nm) e a ordenada a transmissão de luz.

Pela análise dos gráficos das integrais representados pela Figura 22 e pelos dados de inclinação (% de instabilidade por hora) obtidos na Tabela 2, notou-se que a associação do FS com os demais ativos fez com que o coeficiente angular da reta se aproximasse de zero chegando a este valor para os géis. Isso quer dizer que tanto a associação quanto a gelificação tornam as formulações mais estáveis ao longo do tempo. As taxas de separação mostraram uma grande variação entre as formulações (Tabela 2). As nanopartículas de AICIPC associados com AmB ou RSV foram as mais estáveis dentre as formulações em solução com uma taxa de separação de cerca de 3,7% / h do ensaio. O período de vida útil, que corresponde à medição do tempo de ensaio é de 6 meses. Assim, durante 6 meses, é possível prever cerca de 12% da instabilidade destas amostras, durante um prazo de validade de 6 meses. A NCAICIPc apresentou menor estabilidade com uma inclinação de 6,3% / hora e a associação de AICIPC com CH8 é duas vezes mais instável do que as outras associações. Considerando então que uma formulação é estável dispondo de até 10% de instabilidade ou redução de sua potência, temos uma estimativa de tempo de vida de prateleira de 5 meses aproximadamente para NCAICIPc+RSV e NCAICIPc+AmB, de aproximadamente 3 meses para NCAICIPc+CH8 e NCAICIPc e de 6 meses para todos os géis (Tabela 3).

Tanto a associação quanto a gelificação são processos que aumentam a estabilidade destas formulações.

Figura 22. Integral da Transmissão na dependência de tempo (s) para (A)NCAICIPc, NCAmB,NCRSV e NCCH8 (B) NCAICIPc+AmB; NCAICIPc+RSV e NCAICIPc+CH8 (C)NCVazia e NCAICIPc gelificadas (D) NCAICIPcCH8 e NCAICIPcRSV gelificadas e (E) NCAICIPcAmB usando LUMiSizer1 a 3000 rpm e 3,5 h.

Tabela 2. Taxa de separação representada pela inclinação e calculado pelo *software* SEPView 5.1, depois de integrar os arquivos de transmissão.

Nome das amostras	Inclinação (%/hora)	Desvio padrão(%/hora)	Coefficiente de correlação	Força relativa centrífuga (RCF)
NCVazia	5,69	0,13	0,94	1780
NCPcAlCl	6,30	0,01	0,99	1780
NCAmB	5,07	0,03	0,99	1780
NCRSV	6,49	0,07	0,99	1780
NCCH8	5,89	0,21	0,86	1780
NcPcAlCl Amb	3,80	0,02	0,99	1780
NcPcAlClCH8	5,25	0,09	0,96	1780
NcPcAlClRSV	3,70	0,02	0,99	1780
GelNCVazia	0,06	0,09	0,99	1780
GelNCAICIPc	0,10	0,09	0,99	1780
GelNCAICIPcAmB	0,20	0,06	0,91	1780
GelNCAICIPcCH8	0,76	0,09	0,99	1780
GelNCAICIPcRSV	0,12	0,02	0,97	1780

Tabela 3. Resultado dos tempos de vida de prateleira (*shelf life*) de cada amostra

Formulações	<i>Shelf life</i> (meses)
NCVazia	3
NCPcAlCl	3
NCAmB	3
NCRSV	3
NCCH8	3
NCAICIPcAmB	5
NCAICIPcCH8	3
NCAICIPcRSV	5
GelNCVazia	6
GelNCAICIPc	6
GelNCAICIPcAmB	6
GelNCAICIPcCH8	6
GelNCAICIPcRSV	6

4.3.4 Estudos de microscopia de força atômica (MFA)

Microscopia de força atômica é uma técnica com resolução de 1 a 100 Å, que permite visualizar partículas sem manipulação da amostra. Através desta técnica é possível caracterizar a partícula quanto à forma e a estrutura (PEREIRA et al., 2008b; PREETZ et al., 2010).

Na análise bidimensional e tridimensional mostrada na Figura 23 as nanocápsulas poliméricas de AlClPc, AlClPc+RSV, AlClPc+CH8 e AlClPc+AmB, demonstram o formato esférico e baixa polidispersividade, ou seja, maioria das partículas se encontravam em um mesmo tamanho.

Figura 23. Fotomicrografias tridimensionais e bidimensionais obtidas das formulações (A) NCAICIPc (B) NCAICIPcAmB (C)NCAICIPcRSV e (D) NCAICIPcCH8 por microscopia de força atômica.

O diâmetro médio obtido pelas imagens de perfil topográfico das formulações NCAICIPc, NCAICIPcAmB, NCAICIPcRSV e NCAICIPcCH8 feito pelo MFA apresentados na Figura 24, são próximos ou menores do que aqueles obtidos por espectroscopia de correlação de fótons (LDS), mostrados na seção 3.3. Isso porque o polímero presente na superfície da nanocápsula está mais condensado em decorrência do processo de secagem sob fluxo de argônio, reduzindo assim o tamanho da partícula. Além disso, após este procedimento e em meio não aquoso, as nanopartículas sofrem um achatamento, por se tratar de uma vesícula com um invólucro polimérico e núcleo fluido. Este processo de achatamento também está relacionado com a homogeneidade de deposição do polímero e espessura da parede formada. Quando mais espessa a parede

polimérica, maior a dureza e menor a possibilidade da nanocápsula aplainar no suporte de mica usado para o teste (GOTO et al., 2013; PEREIRA et al., 2008b).

B

C

D

Figura 24. Fotomicrografia bidimensional e perfil topográfico dada pela análise do *software* mostrando medições do diâmetro e altura das nanocápsulas A)NCAICIPC B)NCAICIPcAmB C)NCAICIPcRSV e D)NCAICIPcCH8.

4.3.5 Análise do comportamento reológico

A reologia investiga as propriedades e o comportamento mecânico de corpos que sofrem um escoamento (fluido-líquido ou gás) ou uma deformação (sólidos elásticos) devido à ação de uma tensão de cisalhamento. Seu objetivo é descrever através de leis constitutivas ou de comportamento de fluxo das relações entre tensões, forças aplicadas sobre o material e deformações. A reologia tem sido assunto de crescente importância para as indústrias cosmética e farmacêutica, tendo em vista que a consistência e o espalhamento dos produtos devem ser reproduzidos de lote para lote, assegurando a qualidade tecnológica do produto (MASSON et al., 2005).

Neste contexto, géis hidrofílicos são muito usados em produtos cosméticos e como base dermatológica, pois apresentam fácil espalhamento, não são gordurosos e podem veicular princípios ativos diversos (ALVES, POHLMANN e GUTERRES, 2005). Geralmente, as substâncias formadoras de géis são polímeros que quando

dispersos em meio aquoso assumem conformação doadora de viscosidade à preparação, como por exemplo, o Pluronic F-127 usado neste trabalho e o Carbopol 940, ambos da família dos polímeros hidrossolúveis.

A viscosidade é uma das propriedades reológicas chave na estabilidade física dessas formulações, principalmente dos géis (BATHEJA et al., 2011), já que pode contribuir para evitar os fenômenos físicos de instabilidade, como cremeação, floculação, sedimentação ou coalescência, devido à resistência física proporcionada pelo meio.

A análise do comportamento reológico possibilita a identificação de dois tipos de comportamento de acordo com as características de fluxo: Newtoniano e não Newtoniano. No fluxo Newtoniano, os valores da viscosidade são constantes, independente da força aplicada, ou seja, o gradiente é diretamente proporcional à tensão de cisalhamento. A água e a glicerina são exemplos de fluidos com este comportamento. Já os fluidos não Newtonianos não apresentam essa relação proporcional, pois a alteração da força aplicada resulta em alteração da viscosidade inicial, podendo aumentar (fluidos dilatantes) ou diminuir (fluidos plásticos ou pseudoplásticos).

As formulações que possuem partículas assimétricas, como a maioria dos produtos cosméticos e farmacêuticos apresenta fluxo não Newtoniano. Esses materiais têm sua viscosidade aparente diminuída gradualmente, à medida que aumenta a tensão de cisalhamento e, portanto sua viscosidade não pode ser expressa por um único valor.

As causas mais comuns desse comportamento em suspensões coloidais são o fracionamento de agregados de partículas e a orientação de partículas assimétricas provocadas pelo aumento da taxa de cisalhamento.

Então as características reológicas são propriedades importantes a serem consideradas na fabricação, estocagem e desenvolvimento de produtos de uso tópico.

Existem modelos, que podem ser utilizados para estabelecer parâmetros reológicos como índice de fluxo (n) e consistência em diferentes sistemas não-Newtonianos (KIM et al., 2003). O modelo mais adequado para um fluido pseudoplástico depende da resposta à deformação e quão bem os dados experimentais se

ajustarem ao modelo (ALVES , POHLMANN e GUTERRES, 2005). O que será feito em estudos futuros para o artigo.

As formulações deverão ser analisadas utilizando diferentes modelos: Bingham (Equação (12)), Casson (Equação (13)), Ostwald (Equação (14)) e de Herschel-Bulkley (Equação (15)).

$$\rho = \rho_0 + K D \quad (12)$$

$$\rho^{0,5} = \rho_0^{0,5} + K^{0,5} D^{0,5} \quad (13)$$

$$\rho = K D^{\epsilon} \quad (14)$$

$$\rho = \rho_0 + K D^{\epsilon} \quad (15)$$

Onde, ρ_0 é a tensão de cedência, ρ é a tensão de cisalhamento, K índice de consistência, D taxa de cisalhamento e ϵ o índice de fluxo.

E após cada análise, o modelo que apresentar um melhor ajuste (maior r) será escolhido para o cálculo dos parâmetros.

Através da análise dos reogramas (MILAO et al., 2003) da Figuras 25 foi possível verificar que as curvas de escoamento das formulações de nanocápsulas em solução apresentaram comportamento não-newtoniano, isso porque suas viscosidades não eram constantes e diminuíam com o aumento da tensão de cisalhamento, o que caracteriza fluidos pseudolásticos (SHAWESH et al., 2003). Observou-se também nestas imagens que as curvas ascendentes e descendentes praticamente se sobrepõem.

Figura 25. Reogramas de taxa de cisalhamento por tensão de cisalhamento (curva ascendente — e descendente —) das formulações (A) NCAICIPcRSV (B) NCAICIPcCH8 (C) NCAICIPcAmB (D) NC AICIPc

Já os reogramas correspondentes aos géis representado na Figura 26 mostraram também que as curvas de escoamento apresentaram comportamento não-newtoniano, isso porque suas viscosidades não eram constantes ao longo do período de análise e diminuíam com o aumento da tensão de cisalhamento. (SHAWESH et al., 2003).

Figura 26. Reogramas de taxa de cisalhamento por tensão de cisalhamento (curva ascendente — e descendente — das formulações gelificadas (A) NCAICIPcRSV (B) NCAICIPcCH8 (C)NCAICIPc (D) NC AICIPcAmB

Notou-se pelo reograma da Figura 27, onde o comportamento reológico de todos os géis foi plotado em um mesmo gráfico, uma área definida entre as curvas ascendentes e descendentes chamada de área de histerese. O gráfico descendente foi maior que o gráfico ascendente em todos os casos, ou seja, para uma mesma taxa de

cisalhamento tem-se uma tensão de cisalhamento maior na volta do que na ida, a recuperação do material não é imediata, sendo assim dependente do tempo.

Figura 27. Reograma de taxa de cisalhamento versus tensão de cisalhamento (ida e volta) das formulações gelificadas.

Concluiu-se que nosso material possui uma característica própria, se reorganizando após um determinado momento e oferecendo uma maior resistência, ao contrário dos polímeros naturais que quanto maior a tensão de cisalhamento menor a resistência.

Figura 28. Reograma de temperatura versus viscosidade das formulações gelificadas (— GELNCAICIPcRSV; — GelNCAICIPcAmB; — GelNCAICIPcCH8; — GelNCAICIPc)

Pela análise do gráfico de variação de temperatura por viscosidade apresentado na Figura 28, observou-se que quanto maior a temperatura maior a viscosidade do material, corroborando com os resultados citados acima e com a característica do nosso material, um gel termoreversível, que torna-se gel a temperaturas mais altas e acondicionados em geladeira (4°C) mantem-se em solução.

Portanto, no caso de formulações para administração dermatológica, propriedades plásticas são muito importantes porque a resistência ao escoamento da formulação é baixo quando é aplicado condições de cisalhamento médio a alto.

4.4 Validação de métodos espectroscópicos

4.4.1 Linearidade

As chalconas do tipo CH8 em meio orgânico de Acetonitrila e em baixas concentrações apresentam um espectro na região do UV, com um conjunto de bandas características. Uma de maior intensidade localizada nas faixas de 335 a 375 nm e outra

de menor intensidade na faixa de 200 a 250 nm (Figura 29). Estes resultados confirmam o comprimento de onda máximo referenciado em literatura (BOECK et al., 2006).

Já para o fármaco anfotericina B (Figura 30) em meio orgânico e em baixas concentrações, apresenta um coeficiente de absorvidade molar alto e observa-se um espectro na região do UV-VIS com 4 bandas características entre 420 e 320 (pico máximo em 412 nm), para a AmB na sua forma monomérica. Com a elevação da concentração, o espectro modifica-se progressivamente até o aparecimento de uma nova banda intensa e achatada de absorção próximo de 340 nm, indicando a presença de dímeros ou de espécies agregadas (BOLARD , SEIGNEURET e BOUDET, 1980; DOEGITO et al., 1996).

Já o trans-resveratrol possui um espectro de absorção na região UV, caracterizado por uma banda larga com pico máximo em 305 nm (Figura 31), permitindo a utilização do método espectrofotométrico para quantificação deste ativo em formulações nanométricas (DZEBA , PEDZINSKI e MIHALJEVIC, 2015).

Figura 29. Espectros de absorção UV-VIS da CH8 em solução de acetonitrila e curva padrão relacionando a concentração de CH8 (5,00-22,00 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) versus absorbância ($y= 0,6969x-0,0089$ $r=0,9998$)

Figura 30. Espectros de absorção UV-VIS da AmB em Acetonitrila e curva padrão relacionando a concentração de AmB (5,00-22,00 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) versus absorbância ($y=0,052x - 0,022$; $r= 0,99916$)

Figura 31. Espectros de absorção UV-VIS do RSV em solução de acetonitrila e curva padrão relacionando a concentração de RSV (1,5-10,00 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) versus absorbância ($y= 0,1322x + 0,004$ $r = 0,99996$)

A linearidade de um método analítico pode ser definida como a capacidade de obter resultados experimentais de absorção diretamente proporcionais à concentração do analito.

As análises de regressão linear foram realizadas plotando absorbância versus concentração dos ativos AmB, CH8 ou RSV em $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Uma linearidade satisfatória foi detectada para os métodos espectrofotométricos nos intervalos de concentração de 1,5 a 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de RSV e de 5 a 22 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para a CH8 e AmB, pois o ajuste por mínimos quadrados revelou um excelente coeficiente de correlação para todos os ativos (da ordem de 0,999) e as equações lineares para os ativos apresentam-se:

- Absorbância = $0,052 \times [\text{AmB em } \mu\text{g.mL}^{-1}] + 0,022$
- Absorbância = $0,1322 \times [\text{RSV em } \mu\text{g.mL}^{-1}] + 0,004$
- Absorbância = $0,6969 \times [\text{CH8 em } \mu\text{g.mL}^{-1}] + 0,008$

Contudo, um valor de coeficiente de correlação muito próximo da unidade (por exemplo, $r > 0,99$) não é necessariamente o resultado de uma relação linear e, conseqüentemente, um Teste de Falta de ajuste deve ser empregado (AMC, 1994; (GONZALEZ et al., 2006).

O teste para falta de ajuste foi realizado com o teste F da relação entre a média quadrada para a falta de ajuste (soma quadrática da falta de ajuste dividida pelo grau de liberdade) e a média quadrada do erro puro (soma quadrática do erro puro dividido pelo grau de liberdade, como visto na Tabela VI) (DESCHEPPER, THAS e OTTOY, 2006; XU et al., 2003).

As Tabelas 4,5 e 6 lista os resultados da Análise de Variância (ANOVA) unilateral para os ativos AmB, CH8 e RSV. Os valores de F calculados (9494,80; 22291,21; 13286,42) para o modelo linear foram maiores do que o valor crítico $F(4,1392; 4,1392; 4,4940)$ indicando que as equações da regressão linear são estatisticamente significativas dentro do intervalo de confiança de 95%. Além disso, o ajuste adequado das equações lineares foi confirmado pelos valores de F calculados

(2,48; 0,81; 0,20). A partir do teste de falta de ajuste, que apresentou valores menores do que o valor de F tabelado (2,558128; 2,558128; 3,2591667), confirmando que os modelos lineares resultantes são completamente adequados. Portanto, o modelo de calibração é significativamente linear e, conseqüentemente, o modelo linear descreve completamente os dados experimentais.

Tabela 4. Resultados da ANOVA unilateral para o modelo linear do método espectrofotométrico da AmB

Análises	Soma Quadrática	Graus de liberdade ^{a,b} (gl)	Média Quadrática	F-relação
Modelo linear	3,19	1	3,19	9494,80(4,14)
Residual	0,0111	33	0,0003	
Falta de ajuste	0,0054	5	0,0011	2,48 (2,56 ^b)
Erro puro	0,0057	28	0,0002	
Total	3,206	34		

^{a,b} Valores teóricos de $F(1,33)$ e $F(5,28)$, respectivamente, baseado no teste ANOVA unilateral em nível de significância $p = 0,05$.

Tabela 5. Resultados da ANOVA unilateral para o modelo linear do método espectrofotométrico da CH8

Análises	Soma Quadrática	Graus de liberdade ^{a,b} (gl)	Média Quadrática	F-relação
Modelo linear	5,74	1	5,74	22291,21(4,14 ^a)
Residual	0,0085	33	0,0003	
Falta de ajuste	0,0011	5	0,0002	0,81 (2,56 ^b)
Erro puro	0,0074	28	0,0003	
Total	5,7493	34		

^{a,b} Valores teóricos de $F(1,33)$ e $F(5,28)$, respectivamente, baseado no teste ANOVA unilateral em nível de significância $p = 0,05$.

Tabela 6. Resultados da ANOVA unilateral para o modelo linear do método espectrofotométrico do RSV

Análises	Soma Quadrática	Graus de liberdade ^{a,b} (gl)	Média Quadrática	F-relação
Modelo linear	2,98	1	2,98	13286,42 (4,49 ^a)
Residual	0,0036	16	0,0002	
Falta de ajuste	0,0002	4	0,0001	0,2 (3,26 ^b)
Erro puro	0,0034	12	0,0003	
Total	2,9884	17		

^{a,b} Valores teóricos de $F(1,16)$ e $F(4,12)$, respectivamente, baseado no teste ANOVA unilateral em nível de significância $p = 0,05$.

4.4.2 Limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ)

O método espectroscópico para quantificação do ativo AmB demonstrou ser sensível para LD de $0,75 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e LQ de $2,27 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

Já para a chalcona do tipo CH8 mostrou ser sensível em LD de $0,91 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e LQ de $2,77 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

Os resultados obtidos para o Resveratrol foi de um LD de 0,12 e de LQ de $0,36 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

4.4.3 Estudos espectroscópicos

As propriedades espectroscópicas da AlClPc na ausência ou em associação com as drogas testadas apresentaram o mesmo comportamento deste ativo quando na sua forma livre (não encapsulado). O perfil de absorção permaneceu o mesmo com um máximo em torno de 674 nm para AlClPc encapsulada e 670 nm para AlClPc livre em acetonitrila. O espectro de absorção permaneceu com as suas bandas características principais posicionadas na região do violeta ou ultravioleta do espectro (300-350 nm banda-B ou banda Soret) e na região do visível (600-700 nm bandas-Q) Figura 32 B. A AlClPc apresenta uma intensa banda Q' de absorção eletrônica com máximo de emissão em 672 nm ($S_0 \rightarrow S_1$) e duas bandas vibrônicas, Q'' e Q''', de menor intensidade em 642 e 607 nm, respectivamente (Figura 32 A) típicas de transições eletrônicas do tipo

$\pi \rightarrow \pi^*$. Foi observada ainda uma banda solet em 350 nm típica de transições eletrônicas do tipo $\pi \rightarrow \pi^*$.

Figura 32. Espectros de absorção (A e B) de soluções de AICIPc livre em acetonitrila (A) e co-encapsulada com fármacos leishmanicidas (B).

O mesmo ocorre com a emissão de fluorescência da AlClPc, onde o espectro obtido com comprimento de onda de excitação fixo em 615 nm apresentou um perfil espectral entre 670 e 672 nm com um máximo de emissão de fluorescência em 672 nm (Figura 33 A). Os desvios para a região do vermelho, ou de menor energia observado para o fármaco encapsulado é mínimo (<5 nm)(Figura 36 B). Geralmente, este fenômeno batocrômico está relacionado com a interação fármaco-polímero (BARBUGLI et al., 2010a; FERREIRA et al., 1999). Este resultado corrobora com citado anteriormente, onde incorporação de corantes em meios micro-heterogêneos produz desvios para o vermelho (SIBATA, TEDESCO e MARCHETTI, 2004). Em todas as formulações de NC os resultados indicam a ausência de dímero de AlClPc ou estados de agregação, bem como qualquer reação química ou interação do FS com os excipientes da formulação, o que seria facilmente detectado por distorções nos espectros de absorção.

Figura 33. Espectros de fluorescência (A e B) de soluções de AlClPc livre em acetonitrila (A) e co-encapsulada com fármacos leishmanicidas (B) —NCAIClPc; —NCAIClPcRSV; —NCAIClPcCH8; —NCAIClPcAmB

4.4.4 Eficiência de encapsulação

A nanoencapsulação de fármacos em NC está relacionada com a solubilidade do ativo no núcleo oleoso. Assim, compostos lipofílicos são melhores encapsulados por esse sistema coloidal usado neste trabalho (CAUCHETIER et al., 2003).

Na Tabela 7 é apresentada a eficiência de encapsulação para todas as formulações preparadas na ausência e na presença dos ativos associados com AlClPc. As médias de E.E. ficaram entre 66% e 75%, ou seja, todas as formulações foram capazes de encapsular a AlClPc de maneira satisfatória, mesmo associados com diferentes fármacos leishmanicidas. Nota-se um ligeiro aumento na eficiência de encapsulação quando a AlClPc quando associada a AmB, porém sem diferença estatisticamente significativa entre as médias ($p > 0,05$).

Compostos lipofílicos podem ser encapsulados com taxas de 70% ou mais (MORA-HUERTAS, FESSI e ELAISSARI, 2010a). A eficiência de encapsulação observada para as formulações aqui estudadas estão de acordo com o descrito na

literatura, uma vez que o caráter hidrofóbico da AlClPc proporcionou uma boa taxa de encapsulação (máximo de 73%).

Tabela 7. Taxa de eficiência de encapsulação (E.E. %) da AlClPc em diversas formulações de NC

Formulações	E.E. % ^a
NCPcAlCl	72 ±1,6
NCPcAlCl Amb	73±1,6
NCPcAlClCH8	71±5
NCPcAlClResv	66±3,5

^a Medida ± EMP (n=3)

4.5 Estudos *in vitro*

4.5.1 Cultivo celular

Figura 34. Cultura de células de macrófagos de murinho RAW 264.7 confluentes

A linhagem de macrófagos utilizada neste estudo é de origem murina (machos adultos) leucêmica induzida por vírus, obtidas da [\(ATCC® TIB-71™\)](#) (Figura 34).

Possuem uma morfologia do tipo monócitos/macrófagos. Devido a essa morfologia, esta linhagem é aderida em substrato sólido, ou seja, garrafas de polipropileno, com um meio de cultura básico do tipo RPMI enriquecido com 10% de soro fetal bovino, 100 U.mL⁻¹ de estreptomicina e 2,3 g.L⁻¹ de bicarbonato de sódio.

No processo de subcultivo das células, executa-se a desagregação da monocamada fisicamente com a ajuda de um rodinho estéril, para então realizar a retirada das células do fundo da garrafa de cultivo.

A dissociação mecânica é utilizada principalmente para células macrofágicas devido a sua adesão diferenciada. Esse método consiste na retirada das células por meio de agentes físicos, que normalmente se conduzido de forma inadequada pode danificar as células.

A fagocitose e a opsonização de nanopartículas poliméricas (NP) em macrófagos é influenciada em grande parte pelas propriedades físico-químicas das mesmas. A opsonização, por exemplo, é aumentada com o aumento da carga das superfícies das nanopartículas (GESSNER et al., 2002). NP sem modificações são consideradas sistemas de transporte ideal para veiculação de ativos (CHELLAT et al., 2005). Esta estratégia foi aplicada posteriormente para veiculação dos sistemas mistos contendo agentes leishmanicidas em macrófagos infectados. As NP permitiram uma administração específica dos ativos e a manutenção dos níveis dos mesmos no interior dos macrófagos (BASU e LALA, 2004)

4.5.2 Micrografias celulares

NCAICIPc

NCAICIPCRSV

NCAICIPcCH8

NCAICIPcAmB

Figura 35. Fotografias tiradas com um microscópio de contraste de fase invertida 24 h após a aplicação da TFD. Os grupos de controle negativo (A, C, E e G) consistiram de células incubadas com meio de cultura, sem irradiação com luz ou tratamento com NC, já (B,D,F e H) foram incubação por 3 horas com NCAICIPc (5 µM), NCAICIPc+RSV (5 µM+50 µM), NCAICIPc+CH8 (5 µM+ 10 µM) e NCAICIPc+AmB (5µM + 4 µM), respectivamente submetidos a irradiação de 1 J.cm⁻². Lentes usadas de 10x e 20 x.

Nas imagens A,C,E e G apresentadas pela Figura 35, como controle negativo, observou-se células de macrófagos RAW 264.7 confluentes com conformação adequada. Já nas imagens B, D, F e H observou-se uma diminuição no número celular, mudança morfológica e possivelmente o que seriam corpúsculos apoptóticos, indicados nas figuras pelas setas.

A apoptose é conhecida como morte celular “programada ou ativa” controlada por fatores intra e extracelulares, resultando em uma sequência de mudanças morfológica, bioquímica e energética, mais especificamente encolhimento celular, condensação nuclear, e fragmentação. É um processo não inflamatório ou baixo inflamatório. A necrose, por outro lado, é uma forma violenta e rápida de degeneração celular, a qual afeta uma grande extensão de células, sendo caracterizada por turgescência citoplasmática, destruição de organelas e ruptura da membrana plasmática, levando à liberação do conteúdo intracelular e inflamação (CASTANO , DEMIDOVA e HAMBLIN, 2005; LUEDDE , KAPLOWITZ e SCHWABE, 2014).

Os principais fatores que determinam o tipo de morte celular após aplicação da TFD são o tipo de célula, tipo de agente fotossensibilizante e sua localização subcelular e dose de luz aplicada durante o tratamento (MOOR, 2000). A literatura científica relata que aplicação TFD leva a mortes celulares em sua maioria por apoptose. Os fármacos fotossensibilizantes hidrofóbicos localizam-se na membrana mitocondrial e essa localização subcelular da molécula fotoativa é primordial no processo fotodinâmico, pois ela determina o sítio do dano primário. Assim, compostos fotossensibilizantes localizados na mitocôndria induzem rapidamente a apoptose (LI et al., 2015).

Existem diversas técnicas que permitem diferenciar se a morte celular ocorreu por apoptose ou necrose. A microscopia eletrônica, a citometria de fluxo, que faz o uso de marcadores específicos de apoptose como anexinas, são técnicas muito utilizadas. Nas imagens obtidas por microscopia, os indícios morfológicos do processo de apoptose são alterações nucleares, alterações citoplasmáticas, alterações da membrana, separação das células vizinhas e formação de corpúsculos apoptóticos.

4.5.3 Ensaios de citotoxicidade

O primeiro ensaio de citotoxicidade foi feito com 4 concentrações diferentes de NCAICIPc (0,5;1,0;5,0 e 10 μM), NCAmB (1,0;2,0;4,0 e 8,0 μM), NCRSV(25,0; 50,0; 75,0 e 100,0 μM) e NCCH8(1,0; 5,0; 10,0 e 15,0 μM) com a intenção de determinar a melhor dose resposta dentro da faixa de trabalho desejada, ou seja, doses baixas que não matariam as células macrofágicas na ausência de radiação com luz visível e tentar observar se a associação do FS potencializaria o efeito dos ativos leishmanicidas. Como pode ser observado na Figura 36, após o tempo de incubação padrão de 3 horas não houve efeito tóxico da formulação coloidal na ausência do estímulo luminoso para as células de macrófagos para as concentrações de 5,0 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de AICIPc, 50,0 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de Resveratrol, 4,0 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de anfotericina B e 10,0 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de chalcona CH8. Portanto optou-se por escolher estas concentrações de ativo para o próximo teste com as formulações associadas. Como controle (CT) foi realizado também estudos utilizando-se a formulação não carregada, ou seja, as NC vazias. Estes resultados corroboram com pesquisas anteriores reforçando o comportamento esperado que nanocápsulas poliméricas podem ser muito biocompatíveis com o tecido e células quando as mesmas são sintetizadas a partir de materiais biocompatíveis e biodegradáveis (ANTON , BENOIT e SAULNIER, 2008b; COUVREUR , DUBERNET e PUISIEUX, 1995; GUINEBRETIERE et al., 2002b; MORA-HUERTAS , FESSI e ELAISSARI, 2010a; SIQUEIRA-MOURA et al., 2013).

Figura 36. Ensaio de citotoxicidade celular em linhagem de macrófagos RAW 264.7 incubados durante 3 h com formulações de (A) NCAICIPc; (B) NCAmB; (C)NCRSV e (D)NCCH8, sem ação de luz, nas seguintes concentrações NCAICIPC 0,5;1,0; 5,0 e 10 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, NCRSV 25,0;50,0;75,0 e 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, NCAmB 1,0;2,0; 4,0 e 8,0 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ e NCCH8 1,0; 5,0; 10,0 e $\mu\text{mol.L}^{-1}$. Com significância estatística * $p < 0,05$ em relação ao controle de 100%.

Com o objetivo de avaliar a toxicidade das NCAICIPc e suas respectivas associações, as culturas de células foram tratadas com as dispersões de nanocápsulas e após o tempo de incubação padrão de 3 horas, não houve efeito tóxico das formulações na ausência do estímulo luminoso para as células RAW 264.7, com a viabilidade celular da ordem de 80,0% a 100%, como pode ser visto na Figura 37. Tal resultado ressalta a característica imprescindível destas moléculas, ou seja, baixo nível de toxicidade na ausência da luz, o que satisfaz a condição para a escolha de um FS ideal para uso na TFD (BECHET et al., 2008). Estes resultados também demonstraram o caráter biocompatível das formulações de NC poliméricas.

Figura 37. A citotoxicidade celular utilizando o ensaio de MTT clássico em linhagem de células de macrófagos RAW 264.7 sem ação de luz, as células foram incubadas com AICIPc livre na concentração de $5,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$, nanocápsula contendo AICIPc na concentração de $5,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$, nanocápsulas contendo AICIPc na concentração de $5,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$ associada ao resveratrol na concentração de $50,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$, nanocápsulas contendo AICIPc na concentração de $5,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$ associada a anfotericina B na concentração de $4,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$ e nanocápsulas contendo AICIPc na concentração de $5,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$ associado a chalcona CH8 na concentração de $10,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$.

O efeito tóxico de AICIPc, AmB, RSV e CH8 livres (sem veiculação) foram também testados em células nas mesmas condições experimentais utilizadas para os fármaco nanoencapsulados, descrito acima.

Os fármacos livres associados, também foram testados. Não houve efeito tóxico destas na ausência de luz como demonstrado na Figura 38.

Figura 38. Citotoxicidade celular usando o teste colorimétrico MTT em linhagem de macrófago RAW 264.7, sem utilização de luz, incubadas com ativos livre associados nas concentrações de 5 μ M para AICIPc, 50 μ M para RSV, 4 μ M para AmB e 10 μ M para CH8.

Diante dos resultados, a concentração da AICIPc nanoencapsulada de 5 μ mol.L⁻¹ foi estabelecida como a “concentração de trabalho” para a realização de todos os ensaios de fotocitotoxicidade, uma vez que nessa concentração na ausência de estímulo luminoso seguramente não foi encontrada citotoxicidade significativa ($p > 0,05$).

4.5.4 Ensaio vermelho neutro

O ensaio de vermelho neutro assim como o ensaio de MTT é utilizado para medir a viabilidade celular. Ele tem sido utilizado como um indicador de citotoxicidade em culturas de hepatócitos primários (FAUTZ, HUSEIN e HECHENBERGER, 1991) e outras linhas de células (MORGAN et al., 1991; SIDDIQUI et al., 2015). As células vivas captam o vermelho neutro que fica concentrado nos lisossomos das células. Segundo Fotakis e Timbrell (FOTAKIS e TIMBRELL, 2006b), os testes de viabilidade MTT e vermelho neutro são os mais sensíveis dentre os testes como o de proteína e LDH (lactato desidrogenase). Porém os ensaios podem dar resultados diferentes dependendo do agente de teste e do ensaio de citotoxicidade empregado.

A fim de evitar superestimação ou subestimação da toxicidade de determinada substância, incubações com várias concentrações são necessários testes diferentes para distinguir os efeitos sobre organelas específicas ou citotoxicidade geral.

Mais do que um ensaio deve ser utilizado para determinar a viabilidade celular em estudos *in vitro*, isso aumentaria a confiabilidade dos resultados obtidos.

Os resultados mostraram que os ativos livres associados (não veiculados) não foram capazes de exercer efeitos tóxicos sobre a linhagem de macrófago RAW 264.7. Não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) entre os fármacos e controle. A viabilidade celular permaneceu na ordem de 80% (Figura 39).

Figura 39. Avaliação do efeito citotóxico dos ativos livres associados, nas concentrações de trabalho determinadas, AICIPc 5 μ M, RSV 50 μ M, AmB 4 μ M e CH8 10 μ M em linhagem de macrófago RAW 264.7 utilizando o teste vermelho neutro. Como controle utilizou-se células saudáveis.

4.5.5 Ensaios de fototoxicidade

Os estudos de fototoxicidade indicaram que o fotodano foi dependente da dose de energia aplicada para a célula estudada. Os resultados mostram que a baixa concentração de NCAICIPc associada a fármacos com potenciais leishmanicidas usados em baixas concentrações quando combinados com irradiação com luz visível de baixa intensidade induziram a morte celular dos macrófagos, indicando que essas novas formulações são uma alternativa potencial para a terapêutica de leishmaniose; sendo um grande incentivo para futuros estudos com aplicação de TFD.

O efeito fototóxico está intimamente relacionado com a concentração do FS, a dose de luz visível aplicada e o oxigênio tecidual. Para avaliar o dano celular em função da dose de irradiação, foram aplicadas doses de luz crescentes em energia dentro da

ordem de 40 mJ.cm⁻², 70 mJ.cm⁻², 150 mJ.cm⁻², 300 mJ.cm⁻², mJ.cm⁻² e 1 J.cm⁻². Ao analisar a Figuras 40, percebe-se claramente uma diminuição gradativa da viabilidade celular em função do aumento da dose de energia aplicada para a linhagem estudada. Foi realizado também um controle negativo, onde um conjunto de poços contendo células permaneceu sem FS e sem irradiação e um controle com poços sem FS, mas com irradiação, nota-se que apenas a luz laser não causa dano algum a célula.

Foi necessário uma dose de luz de 1 J.cm⁻² para chegar a um efeito tóxico máximo na linhagem RAW 264.7, como mostrado na Figura 40. A viabilidade celular foi de 26% ± 2,3 (NCAICIPc), 52% ± 5,7 (NCAICIPc+AmB), 24% ± 0,2 (NCAICIPc+RSV) e 6,6% ± 1,0 (NCAICIPc+CH8). Isso nos dá um excelente efeito fototóxico da NCAICIPc associada ou não com os outros ativos. Notamos que na mesma concentração de AICIPc (5 µM) quando associada ao RSV e a CH8 temos uma maior morte celular, com este último ativo sendo uma diferença expressiva na viabilidade celular. Pela análise estatística aplicada aos dados percebemos que não precisamos chegar a dose máxima de 1 J/cm² para encontrarmos morte celular significativa com relação ao controle de 100%, ou seja, abaixo do IC₅₀ para os tratamentos com NCAICIPc, NCAICIPc+CH8 e NCAICIPcRSV (*p<0,05). O primeiro tratamento de leishmaniose cutânea com uso da TFD é muito recente, relatado em 2003 por (GARDLO et al., 2003). O paciente recebeu tratamento sistêmico com estibogluconato de sódio (Pentostam®). A literatura também relata apenas um trabalho anterior a este no qual foram utilizados sistemas lipossomais associados à AICIPc e TFD para o tratamento de espécies de *leishmania* (HERNANDEZ et al., 2012b). A maioria dos pacientes que fizeram uso desta terapia descreve uma pequena sensação de queimação durante a irradiação, mas esse efeito colateral nunca é significativo para parar o tratamento ou mudar para uma terapia alternativa (VAN DER SNOEK et al., 2008).

O mesmo reforça os estudos obtidos com estes novos sistemas e abre uma janela de oportunidades para novas propostas de estudo e tratamento.

Figura 40. Ensaio de fotocitotoxicidade usando o teste de viabilidade MTT após incubação com as formulações de NCAICIPc, NCAICIPc+AmB, NCAICIPc+RSV e NCAICIPc+CH8 sobre células RAW 264.7 e posterior irradiação com diferentes doses (40,70,150,300,500 mJ.cm⁻² e 1J.cm⁻²). Neste ensaio usou-se como controle negativo apenas com células (0 mJ.cm⁻²) e um controle do laser, ou seja, células e irradiação de todas as dosagens (* $p < 0,05$ comparado ao controle de 100%).

4.6 Microscopia confocal

A microscopia confocal é uma técnica muito útil para a formação de imagens em 2D (2 dimensões) e 3D (3 dimensões) de sistemas biológicos. Além disso, pode ser utilizada para ensaios *in vivo* em tempo real (*time series*). No microscópio confocal todas as estruturas fora de foco são eliminadas na formação da imagem, deixando a imagem com melhor definição e profundidade em relação à microscopia óptica convencional. Outra vantagem sobre a microscopia óptica convencional é a capacidade que o confocal tem de realizar imagens que possibilitem uma sobreposição de imagens para a formação de uma imagem em 3D. Através desta técnica, utilizando marcadores fluorescentes é possível determinar a distribuição exata de determinadas moléculas dentro da célula.

Os estudos de microscopia confocal foram realizados para comprovar a internalização do FS e analisar sua localização celular. Além disso, esta técnica foi usada para verificar se a associação da AIClc com os demais ativos afetou positivamente ou negativamente este processo de internalização do FS. Após 24 horas de incubação, a análise por microscopia confocal confirmou a internalização qualitativa da AIClPc. Foi possível observar o perfil de distribuição intracelular do FS (RODRIGUES et al., 2012). Pode se afirmar que o FS não apresenta uma localização preferencial no núcleo, permanecendo o mesmo distribuído na região citoplasmática das células RAW 267.4, como nota-se nas figuras centrais visível em cor de rosa (AIClPc) que está circundando o núcleo corado em azul pelo marcador fluorescente DAPI. A incorporação da AIClPc no citoplasma está de acordo com a característica de FS de se acumular preferencialmente em organelas como os lisossomos e mitocôndria, por exemplo (LI et al., 2015; BARBUGLI et al., 2010a). Este resultado corrobora com o fato de NC poliméricas se encontrarem no citoplasma, fato confirmado por Paiva e colaboradores, que incorporaram um corante verde às NC de PLGA 50:50 e observaram sua liberação ao longo do tempo (ALMOFTI et al., 2003; PAIVA et al., 2013). Estudos recentes têm demonstrado que as nanopartículas podem estar distribuídas no citoplasma e nos endossomos após o processo de endocitose (GAO et al., 2013; MUEHLMANN et al., 2014). Estes resultados sugerem ainda que o perfil de internalização celular das nanocápsulas seja semelhante ao proposto para os lipossomas, que são endocitados e sofrem a ação dos lisossomos e outras organelas (ALMOFTI et al., 2003; DUZGUNES

e NIR, 1999). As nanopartículas seriam então endocitadas (SHARMAN , VAN LIER e ALLEN, 2004) e a cadeia polimérica degradada para posterior liberação do fármaco. É possível notar na Figura 41, que o FS parece estar circundando o citoplasma (DE PAULA et al., 2015). Esse fato indica que não ocorreu a internalização total e evidencia que as nanocápsulas facilitam a entrega do fármaco no meio intracelular em células RAW 264.7, como esperado. Notamos qualitativamente um aumento na internalização de AIClPc (todos os casos incubados com mesma concentração de 5 μ M de AIClPc) quando associados aos fármacos leishmanicidas (AmB, RSV ou CH8), mais evidenciado no caso da AmB e da CH8, um fator extremamente útil. Uma explicação plausível para o fato de haver maior permeação quando em associação com AmB, seria pelo mecanismo de ação desse ativo nas células. Ele age ligando-se aos esteróis da membrana celular, alterando a composição da membrana celular e aumentando, por conseguinte a permeação de compostos externos.

Figura 41. Mapeamento da AICIPc veiculada em NCAICIPc, NCAICIPc+AmB, NCAICIPc+CH8 e NCAICIPc+RSV em microscopia confocal de fluorescência nas células RAW 264.7 após 24 h de incubação. Na primeira coluna, a coloração azul mostra o núcleo celular, corado com DAPI; a coloração verde o citoesqueleto corado com faloidina; na segunda coluna a coloração rosa é resultado da emissão de fluorescência da AICIPc intracelular e na terceira coluna as imagens estão sobrepostas.

5. CONCLUSÃO

Nanocápsulas poliméricas carregadas com AICIPc e associações foram preparados a partir de um modelo de sistema nanoparticulado do tipo nanoemulsão usando o método nanoprecipitação modificado. As nanocápsulas apresentaram características físico-químicas desejadas para a aplicação na terapia fotodinâmica como tamanho de partícula na escala nanométrica cerca de 230 nm, o que aumenta seu tempo de circulação no organismo e facilita sua internalização celular, distribuição de tamanho com baixo índice de polidispersividade e potencial zeta com carga negativa. As formulações foram estáveis ao longo de pelo menos 4 meses, período de armazenamento a 4°C e confirmados pela análise de estabilidade acelerada com o uso do Lumisizer. Análises de microscopia de força atômica comprovaram seu formato esférico, seu tamanho nanométrico bem como sua homogênea distribuição. A veiculação do FS em nanocápsula poliméricas bem como sua associação com ativos leishmanicidas não alterou suas características fotofísicas e fotoquímicas.

Foi possível avaliar o comportamento reológico das nanocápsulas em solução bem como das nanopartículas gelificadas. Todas as formulações demonstraram um comportamento de fluxo não Newtoniano e pseudoplástico, ou seja, viscosidade não é constante e diminuem com o aumento da tensão de cisalhamento. Característica extremamente importante para formulações de uso tópico.

O fármaco fotossensibilizador AICIPc foi adequadamente encapsulado, mesmo com associações dos fármacos leishmanicidas, comprovado pela eficiência de encapsulação da ordem de 75% em todos os casos, como esperado para fármacos hidrofóbicos.

Os estudos de citotoxicidade mostraram que as nanocápsulas poliméricas são biocompatíveis com o sistema celular e que o FS não é tóxico na ausência do estímulo luminoso.

A linhagem de célula de macrófagos RAW 264.7 foi fotossensível em baixas concentrações de fotossensibilizador e baixa dosagem de luz. Com aplicação de uma dose de luz de 1J.cm^{-2} , houve uma morte significativa de 94% no caso do tratamento com NCAICIPc associada a CH8.

O acúmulo preferencial da AlClPc no citoplasma da célula está de acordo com o esperado para FS, isto é, não houve acúmulo no núcleo e consequente intercalação com ácidos nucleicos, sinalizando que não há efeito mutagênico secundário, ideal para o protocolo com TFD. A associação do FS com os demais ativos proporcionou uma maior internalização da AlClPc, fator extremamente interessante à ser investigado.

Portanto, esses resultados confirmam que as nanocápsulas são um sistema eficaz de administração de fármaco sensibilizante para aplicação em TFD no tratamento leishmanicida. Além disso, os resultados obtidos incentivam novos estudos sobre nanocápsulas carregadas com fármacos lipofílicos fotossensibilizadores para uso no tratamento não só da leishmaniose, mas de outras patologias cutâneas. Esta proposta é muito promissora, pois no futuro, permitirá diminuir a quantidade de fármacos necessários para alcançar o efeito terapêutico esperado, obtendo maior eficiência na focalização e administração (em comparação com o fármaco livre) estabelecendo como um protocolo para tratamento de Leishmaniose ainda não clínico.

6. REFERÊNCIAS

- AGOSTINIS, P.; BERG, K.; CENGEL, K. A.; FOSTER, T. H.; GIROTTI, A. W.; GOLLNICK, S. O.; HAHN, S. M.; HAMBLIN, M. R.; JUZENIENE, A.; KESSEL, D.; KORBELIK, M.; MOAN, J.; MROZ, P.; NOWIS, D.; PIETTE, J.; WILSON, B. C.; GOLAB, J. Photodynamic Therapy of Cancer: An Update, *Cancer Journal for Clinicians*, v. 61, p. 250-281, 2011.
- AKILOV, O. E.; KOSAKA, S.; O'RIORDAN, K.; HASAN, T. Photodynamic therapy for cutaneous leishmaniasis: the effectiveness of topical phenothiaziniums in parasite eradication and Th1 immune response stimulation, *Photochemical & Photobiological Sciences*, v. 6, p. 1067-1075, 2007.
- AL KHOURI FALLOUH, N.; ROBLOT-TREUPEL, L.; FESSI, H.; DEVISSAGUET, J. P.; PUISIEUX, F. Development of a new process for the manufacture of polyisobutylcyanoacrylate nanocapsules, *International Journal of Pharmaceutics*, v. 28, p. 125-132, 1986.
- ALLISON, R. R.; DOWNIE, G. H.; CUENCA, R.; HU, X. H.; CHILDS, C. J. H.; SIBATA, C. H. Photosensitizers in clinical PDT, *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, v. 1, p. 27-42, 2004.
- ALMEIDA, O. L. S.; SANTOS, J. B. Advances in the treatment of cutaneous leishmaniasis in the new world in the last ten years: a systematic literature review, *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v. 86, p. 497-506, 2011.
- ALMOFTI, M. R.; HARASHIMA, H.; SHINOHARA, Y.; ALMOFTI, A.; BABA, Y.; KIWADA, H. Cationic liposome-mediated gene delivery: Biophysical study and mechanism of internalization, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 410, p. 246-253, 2003.
- ALVES, P. M.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. Semisolid topical formulations containing nimesulide-loaded nanocapsules, nanospheres or nanoemulsion: development and rheological characterization, *Pharmazie*, v. 60, p. 900-904, 2005.
- AMARAL, A. C.; BOCCA, A. L.; RIBEIRO, A. M.; NUNES, J.; PEIXOTO, D. L. G.; SIMIONI, A. R.; PRIMO, F. L.; LACAVA, Z. G. M.; BENTES, R.; TITZE-DE-ALMEIDA, R.; TEDESCO, A. C.; MORAIS, P. C.; FELIPE, M. S. S. Amphotericin B in poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) and dimercaptosuccinic acid (DMSA) nanoparticles against paracoccidioidomycosis, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 63, p. 526-533, 2009.
- AMC, Analytical Methods Committee. Is My Calibration Linear? *Analyst* v. 119, p.2363-2366, 1994.
- ANTON, N.; BENOIT, J. P.; SAULNIER, P. Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates - A review, *Journal of Controlled Release*, v. 128, p. 185-199, 2008a.

- ANTON, N.; BENOIT, J. P.; SAULNIER, P. Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates - A review, *Journal of Controlled Release*, v. 128, p. 185-199, 2008b.
- BABICH, H.; BORENFREUND, E. Cytotoxicity of T-2 Toxin and Its Metabolites Determined with the Neutral Red-Cell Viability Assay, *Applied and Environmental Microbiology*, v. 57, p. 2101-2103, 1991.
- BAILE, C. A.; YANG, J. Y.; RAYALAM, S.; HARTZELL, D. L.; LAI, C. Y.; ANDERSEN, C.; DELLA-FERA, M. A. Effect of resveratrol on fat mobilization, *Resveratrol and Health*, v. 1215, p. 40-47, 2011.
- BALA, I.; HARIHARAN, S.; KUMAR, M. N. V. R. PLGA nanoparticles in drug delivery: The state of the art, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, v. 21, p. 387-422, 2004.
- BARBUGLI, P. A.; SIQUEIRA-MOURA, M. P.; ESPREAFICO, E. M.; TEDESCO, A. C. In Vitro Phototoxicity of Liposomes and Nanocapsules Containing Chloroaluminum Phthalocyanine on Human Melanoma Cell Line, *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, v. 10, p. 569-573, 2010a.
- BARBUGLI, P. A.; SIQUEIRA-MOURA, M. P.; ESPREAFICO, E. M.; TEDESCO, A. C. In Vitro Phototoxicity of Liposomes and Nanocapsules Containing Chloroaluminum Phthalocyanine on Human Melanoma Cell Line, *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, v. 10, p. 569-573, 2010b.
- BASTIANETTO, S.; MENARD, C.; QUIRION, R. Neuroprotective action of resveratrol, *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease*, v. 1852, p. 1195-1201, 2015.
- BASU, M. K.; LALA, S. Macrophage specific drug delivery in experimental leishmaniasis, *Current Molecular Medicine*, v. 4, p. 681-689, 2004.
- BATES, P. A. Leishmania sand fly interaction: progress and challenges, *Current Opinion in Microbiology*, v. 11, p. 340-344, 2008.
- BATES, P. A.; ROGERS, M. E. New insights into the developmental biology and transmission mechanisms of Leishmania, *Current Molecular Medicine*, v. 4, p. 601-609, 2004.
- BATHEJA, P.; SHEIHET, L.; KOHN, J.; SINGER, A. J.; MICHNIAK-KOHN, B. Topical drug delivery by a polymeric nanosphere gel: Formulation optimization and in vitro and in vivo skin distribution studies, *Journal of Controlled Release*, v. 149, p. 159-167, 2011.
- BECHET, D.; COULEAUD, P.; FROCHOT, C.; VIRIOT, M. L.; GUILLEMIN, F.; BARBERI-HEYOB, M. Nanoparticles as vehicles for delivery of photodynamic therapy agents, *Trends in Biotechnology*, v. 26, p. 612-621, 2008.
- BOECK, P.; BANDEIRA FALC+ÚO, C. A.; LEAL, P. C. s.; YUNES, R. A.; FILHO, V. C.; TORRES-SANTOS, E. C.; ROSSI-BERGMANN, B. Synthesis of

- chalcone analogues with increased antileishmanial activity, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 14, p. 1538-1545, 2006.
- BOLARD, J.; SEIGNEURET, M.; BOUDET, G. Interaction Between Phospholipid-Bilayer Membranes and the Polyene Antibiotic Amphotericin-B - Lipid State and Cholesterol Content Dependence, *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 599, p. 280-293, 1980.
- BONNETT, R. Photosensitizers of the Porphyrin and Phthalocyanine Series for Photodynamic Therapy, *Chemical Society Reviews*, v. 24, p. 19-33, 1995.
- BONNETT, R. Photodynamic therapy in historical perspective, *Reviews in Contemporary Pharmacotherapy*, v. 10, p. 1-17, 1999.
- BRAJTBURG, J.; BOLARD, J. Carrier effects on biological activity of amphotericin B, *Clinical Microbiology Reviews*, v. 9, p. 512-&, 1996.
- BURZA, S.; SINHA, P. K.; MAHAJAN, R.; LIMA, M. A.; MITRA, G.; VERMA, N.; BALASEGAREM, M.; DAS, P. Five-Year Field Results and Long-Term Effectiveness of 20 mg/kg Liposomal Amphotericin B (Ambisome) for Visceral Leishmaniasis in Bihar, India, *Plos Neglected Tropical Diseases*, v. 8, 2014a.
- BURZA, S.; SINHA, P. K.; MAHAJAN, R.; SANZ, M. G.; LIMA, M. A.; MITRA, G.; VERMA, N.; DAS, P. Post Kala-Azar Dermal Leishmaniasis following Treatment with 20 mg/kg Liposomal Amphotericin B (Ambisome) for Primary Visceral Leishmaniasis in Bihar, India, *Plos Neglected Tropical Diseases*, v. 8, 2014b.
- BUSTOS, M. F. G.; BARRIO, A.; PRIETO, G. G.; DE RASPI, E. M.; CIMINO, R. O.; CARDOZO, R. M.; PARADA, L. A.; YEO, M.; SOTO, J.; UNCOS, D. A.; PARODI, C.; BASOMBRI, M. A. In Vivo Antileishmanial Efficacy of Miltefosine Against Leishmania (Leishmania) Amazonensis, *Journal of Parasitology*, v. 100, p. 840-847, 2014.
- CADDEO, C.; MANCONI, M.; FADDA, A. M.; LAI, F.; LAMPIS, S.; DIEZ-SALES, O.; SINICO, C. Nanocarriers for antioxidant resveratrol: Formulation approach, vesicle self-assembly and stability evaluation, *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, v. 111, p. 327-332, 2013.
- CASTANO, A. P.; DEMIDOVA, T. N.; HAMBLIN, M. R. Mechanisms in photodynamic therapy: part two-cellular signaling, cell metabolism and modes of cell death, *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, v. 2, p. 1-23, 2005.
- CAUCHETIER, E.; DENIAU, M.; FESSI, H.; ASTIER, A.; PAUL, M. Atovaquone-loaded nanocapsules: influence of the nature of the polymer on their in vitro characteristics, *International Journal of Pharmaceutics*, v. 250, p. 273-281, 2003.

- CHANG, K. P.; CHAUDHURI, G.; FONG, D. Molecular Determinants of Leishmania Virulence, *Annual Review of Microbiology*, v. 44, p. 499-529, 1990.
- CHATTERJEE, D. K.; FONG, L. S.; ZHANG, Y. Nanoparticles in photodynamic therapy: An emerging paradigm, *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 60, p. 1627-1637, 2008.
- CHELLAT, F.; MERHI, Y.; MOREAU, A.; YAHIA, L. Therapeutic potential of nanoparticulate systems for macrophage targeting, *Biomaterials*, v. 26, p. 7260-7275, 2005.
- CHIU, H. T.; CHANG, C. Y.; PAN, H. W.; CHIANG, T. Y.; KUO, M. T.; WANG, Y. H. Characterization of polyurethane foam as heat seal coating in medical pouch packaging application, *Journal of Polymer Research*, v. 19, 2012.
- COUVREUR, P.; DUBERNET, C.; PUISIEUX, F. Controlled Drug-Delivery with Nanoparticles - Current Possibilities and Future-Trends, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 41, p. 2-13, 1995.
- CUNHA-AZEVEDO, E. P.; SILVA, J. R.; MARTINS, O. P.; SIQUEIRA-MOURA, M. P.; BOCCA, A. L.; FELIPE, M. S. S.; TEDESCO, A. C.; AZEVEDO, R. B. In Vitro Antifungal Activity and Toxicity of Itraconazole in DMSA-PLGA Nanoparticles, *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, v. 11, p. 2308-2314, 2011.
- DE AZEVEDO, M. M. M. **Sistemas poliméricos de liberação controlada utilizando micro e nanopartículas encapsulado violaceína: caracterização, atividade biológica, consequências e perspectivas.** 177p. Tese (doutorado)-Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.
- DE LIGT, M.; TIMMERS, S.; SCHRAUWEN, P. Resveratrol and obesity: Can resveratrol relieve metabolic disturbances?, *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease*, v. 1852, p. 1137-1144, 2015.
- DE MUYLDER, G.; ANG, K. K. H.; CHEN, S.; ARKIN, M. R.; ENGEL, J. C.; MCKERROW, J. H. A Screen against Leishmania Intracellular Amastigotes: Comparison to a Promastigote Screen and Identification of a Host Cell-Specific Hit, *Plos Neglected Tropical Diseases*, v. 5, 2011.
- DE PAULA, C. S.; TEDESCO, A. C.; PRIMO, F. L.; VILELA, J. M. C.; ANDRADE, M. S.; MOSQUEIRA, V. C. F. Chloroaluminium phthalocyanine polymeric nanoparticles as photosensitisers: Photophysical and physicochemical characterisation, release and phototoxicity in vitro, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 49, p. 371-381, 2013.
- DE PAULA, L. B.; PRIMO, F. L.; PINTO, M. R.; MORAIS, P. C.; TEDESCO, A. C. Combination of hyperthermia and photodynamic therapy on mesenchymal stem cell line treated with chloroaluminum phthalocyanine magnetic-nanoemulsion, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, v. 380, p. 372-376, 2015.

- DE ROSA, F. S.; BENTLEY, M. V. L. B. Photodynamic therapy of skin cancers: Sensitizers, clinical studies and future directives, *Pharmaceutical Research*, v. 17, p. 1447-1455, 2000.
- DENIZOT, F.; LANG, R. Rapid Colorimetric Assay for Cell-Growth and Survival - Modifications to the Tetrazolium Dye Procedure Giving Improved Sensitivity and Reliability, *Journal of Immunological Methods*, v. 89, p. 271-277, 1986.
- DERAKHSHANDEH, K.; ERFAN, M.; DADASHZADEH, S. Encapsulation of 9-nitrocamptothecin, a novel anticancer drug, in biodegradable nanoparticles: Factorial design, characterization and release kinetics, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 66, p. 34-41, 2007.
- DESCHEPPER, E.; THAS, O.; OTTOY, J. P. Regional residual plots for assessing the fit of linear regression models, *Computational Statistics & Data Analysis*, v. 50, p. 1995-2013, 2006.
- DOEGITO, E. S. T.; FESSI, H.; APPEL, M.; BARRATT, G.; LEGRAND, P.; BOLARD, J.; DEVISSAGUET, J. P. A morphological study of an amphotericin B emulsion-based delivery system, *International Journal of Pharmaceutics*, v. 145, p. 17-27, 1996.
- DOSTALOVA, A.; VOLF, P. Leishmania development in sand flies: parasite-vector interactions overview, *Parasites & Vectors*, v. 5, 2012.
- DUZGUNES, N.; NIR, S. Mechanisms and kinetics of liposome-cell interactions, *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 40, p. 3-18, 1999.
- DZEBA, I.; PEDZINSKI, T.; MIHALJEVIC, B. Photophysical and photochemical properties of resveratrol, *Journal of Photochemistry and Photobiology A-Chemistry*, v. 299, p. 118-124, 2015.
- ESCOBAR-CHAVEZ, J. J.; LOPEZ-CERVANTES, M.; NAIK, A.; KALIA, Y. N.; QUINTANAR-GUERRERO, D.; GANEM-QUINTANAR, A. Applications of thermoreversible pluronic F-127 gels in pharmaceutical formulations, *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, v. 9, p. 339-358, 2006.
- ETHIRAJAN, M.; CHEN, Y. H.; JOSHI, P.; PANDEY, R. K. The role of porphyrin chemistry in tumor imaging and photodynamic therapy, *Chemical Society Reviews*, v. 40, p. 340-362, 2011.
- FATTAL, E.; VAUTHIER, C.; AYNIE, I.; NAKADA, Y.; LAMBERT, G.; MALVY, C.; COUVREUR, P. Biodegradable polyalkylcyanoacrylate nanoparticles for the delivery of oligonucleotides, *Journal of Controlled Release*, v. 53, p. 137-143, 1998.
- FAUTZ, R.; HUSEIN, B.; HECHENBERGER, C. Application of the Neutral Red Assay (Nr Assay) to Monolayer-Cultures of Primary Hepatocytes - Rapid Colorimetric Viability Determination for the Unscheduled Dna-Synthesis Test (Uds), *Mutation Research*, v. 253, p. 173-179, 1991.

- FERREIRA, C.; SOARES, D. C.; DO NASCIMENTO, M. T. C.; PINTO-DA-SILVA, L. H.; SARZEDAS, C. G.; TINOCO, L. W.; SARAIVA, E. M. Resveratrol Is Active against *Leishmania amazonensis*: In Vitro Effect of Its Association with Amphotericin B, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 58, p. 6197-6208, 2014.
- FESSI, H.; PUISIEUX, F.; DEVISSAGUET, J. P.; AMMOURY, N.; BENITA, S. Nanocapsule Formation by Interfacial Polymer Deposition Following Solvent Displacement, *International Journal of Pharmaceutics*, v. 55, p. R1-R4, 1989.
- FOOTE, C. S. Definition of Type-I and Type-II Photosensitized Oxidation, *Photochemistry and Photobiology*, v. 54, p. 659, 1991.
- FOTAKIS, G.; TIMBRELL, J. A. In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride, *Toxicology Letters*, v. 160, p. 171-177, 2006a.
- FOTAKIS, G.; TIMBRELL, J. A. In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride, *Toxicology Letters*, v. 160, p. 171-177, 2006b.
- FRESHNEY R.I., **Culture of animal cells- A manual of basic technique**, forth ed., Wiley-LISS, New York, 1994.
- GALLEGO-GOMEZ, F.; QUINTANA, J. A.; VILLALVILLA, J. M.; DIAZ-GARCIA, M. A.; MARTIN-GOMIS, L.; FERNANDEZ-LAZARO, F.; SASTRE-SANTOS, A. Phthalocyanines as Efficient Sensitizers in Low-T-g Hole-Conducting Photorefractive Polymer Composites, *Chemistry of Materials*, v. 21, p. 2714-2720, 2009.
- GANI+¿RE MONTEIL, C.; KERGUERIS, M. F.; IOOSS, P.; THOMAS, L.; LAROUSSE, C. Quantitation of amphotericin B in plasma by second-derivative spectrophotometry, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 17, p. 481-485, 1998.
- GAO, H. L.; YANG, Z.; ZHANG, S.; CAO, S. J.; SHEN, S.; PANG, Z. Q.; JIANG, X. G. Ligand modified nanoparticles increases cell uptake, alters endocytosis and elevates glioma distribution and internalization, *Scientific Reports*, v. 3, 2013.
- GAO, X. H.; XU, Y. X.; JANAKIRAMAN, N.; CHAPMAN, R. A.; GAUTAM, S. C. Immunomodulatory activity of resveratrol: suppression of lymphocyte proliferation, development of cell-mediated cytotoxicity, and cytokine production, *Biochemical Pharmacology*, v. 62, p. 1299-1308, 2001.
- GARDLO, K.; HORSKA, Z.; ENK, C. D.; RAUCH, L.; MEGAHED, M.; RUZICKA, T.; FRITSCH, C. Treatment of cutaneous leishmaniasis by photodynamic therapy, *Journal of the American Academy of Dermatology*, v. 48, p. 893-896, 2003.
- GESSNER, A.; LIESKE, A.; PAULKE, B. R.; MULLER, R. H. Influence of surface charge density on protein adsorption on polymeric nanoparticles: analysis by

- two-dimensional electrophoresis, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 54, p. 165-170, 2002.
- GOLAS, C. L.; PROBER, C. G.; MACLEOD, S. M.; SOLDIN, S. J. Measurement of Amphotericin-B in Serum Or Plasma by High-Performance Liquid-Chromatography, *Journal of Chromatography*, v. 278, p. 387-395, 1983.
- GONZALEZ, A. G.; HERRADOR, M. A.; ASUERO, A. G.; SAYAGO, A. The correlation coefficient attacks again, *Accreditation and Quality Assurance*, v. 11, p. 256-258, 2006.
- GOTO, P. L.; VILELA, J. M. C.; ANDRADE, M. S.; DOS SANTOS, O. D. H. Preparation and Characterization of Polymeric Nanocapsules Produced by in Situ Polymerization From Nanoemulsions Produced by Direct Emulsification, *Journal of Dispersion Science and Technology*, v. 34, p. 228-233, 2013.
- GRABNAR, P. A.; KRISTL, J. The manufacturing techniques of drug-loaded polymeric nanoparticles from preformed polymers, *Journal of Microencapsulation*, v. 28, p. 323-335, 2011.
- GUINEBRETIERE, S.; BRIANCON, S.; FESSI, H.; TEODORESCU, V. S.; BLANCHIN, M. G. Nanocapsules of biodegradable polymers: preparation and characterization by direct high resolution electron microscopy, *Materials Science & Engineering C-Biomimetic and Supramolecular Systems*, v. 21, p. 137-142, 2002a.
- GUINEBRETIERE, S.; BRIANCON, S.; FESSI, H.; TEODORESCU, V. S.; BLANCHIN, M. G. Nanocapsules of biodegradable polymers: preparation and characterization by direct high resolution electron microscopy, *Materials Science & Engineering C-Biomimetic and Supramolecular Systems*, v. 21, p. 137-142, 2002b.
- HAMIDI, M.; AZADI, A.; RAFIEI, P. Hydrogel nanoparticles in drug delivery, *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 60, p. 1638-1649, 2008.
- HANDMAN, E. Leishmaniasis: Current status of vaccine development, *Clinical Microbiology Reviews*, v. 14, p. 229-+, 2001.
- HERNANDEZ, I. P.; MONTANARI, J.; VALDIVIESO, W.; MORILLA, M. J.; ROMERO, E. L.; ESCOBAR, P. In vitro phototoxicity of ultradeformable liposomes containing chloroaluminum phthalocyanine against New World Leishmania species, *Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology*, v. 117, p. 157-163, 2012a.
- HERNANDEZ, I. P.; MONTANARI, J.; VALDIVIESO, W.; MORILLA, M. J.; ROMERO, E. L.; ESCOBAR, P. In vitro phototoxicity of ultradeformable liposomes containing chloroaluminum phthalocyanine against New World Leishmania species, *Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology*, v. 117, p. 157-163, 2012b.

- KAKANJ, M.; GHAZI-KHANSARI, M.; MIRAKABADI, A. Z.; DARAEI, B.; VATANPOUR, H. Cytotoxic Effect of Iranian Vipera lebetina Snake Venom on HUVEC cells, *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, v. 14, p. 109-114, 2015.
- KAMHAWI, S. Phlebotomine sand flies and Leishmania parasites: friends or foes?, *Trends in Parasitology*, v. 22, p. 439-445, 2006.
- KAWASE, Y.; ISEKI, H. Parameter-finding studies of photodynamic therapy for approval in Japan and the USA, *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, v. 10, p. 434-445, 2013.
- KILLICKKENDRICK, R. The Life-Cycle of Leishmania in the Sandfly with Special Reference to the Form Infective to the Vertebrate Host, *Annales de Parasitologie Humaine et Comparee*, v. 65, p. 37-42, 1990.
- KIM, J. Y.; SONG, J. Y.; LEE, E. J.; PARK, S. K. Rheological properties and microstructures of Carbopol gel network system, *Colloid and Polymer Science*, v. 281, p. 614-623, 2003.
- KIM, S.; KIM, J. H.; JEON, O.; KWON, I. C.; PARK, K. Engineered polymers for advanced drug delivery, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 71, p. 420-430, 2009.
- KIRILOV, P.; LUKYANOVA, L.; FRANCESCHI-MESSANT, S.; PERIER, V.; PEREZ, E.; RICO-LATTES, I. A new type of colloidal dispersions based on nanoparticles of gelled oil, *Colloids and Surfaces A-Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 328, p. 1-7, 2008.
- KLEINBERG, M. What is the current and future status of conventional amphotericin B?, *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 27, p. S12-S16, 2006.
- KONAN, Y. N.; GURNY, R.; ALLEMANN, E. State of the art in the delivery of photosensitizers for photodynamic therapy, *Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology*, v. 66, p. 89-106, 2002.
- LERCHE, D. Dispersion stability and particle characterization by sedimentation kinetics in a centrifugal field, *Journal of Dispersion Science and Technology*, v. 23, p. 699-709, 2002.
- LERCHE, D.; SOBISCH, T. Evaluation of particle interactions by in situ visualization of separation behaviour, *Colloids and Surfaces A-Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 440, p. 122-130, 2014a.
- LERCHE, D.; SOBISCH, T. Evaluation of particle interactions by in situ visualization of separation behaviour, *Colloids and Surfaces A-Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 440, p. 122-130, 2014b.
- LETCHFORD, K.; BURT, H. A review of the formation and classification of amphiphilic block copolymer nanoparticulate structures: micelles, nanospheres,

- nanocapsules and polymersomes, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 65, p. 259-269, 2007.
- LI, D. H.; LI, L.; LI, P. X.; LI, Y.; CHEN, X. Y. Apoptosis of HeLa cells induced by a new targeting photosensitizer-based PDT via a mitochondrial pathway and ER stress, *Oncotargets and Therapy*, v. 8, p. 703-711, 2015.
- LONGO, J. P. F.; DE MELO, L. N. D.; MIJAN, M. C.; VALOIS, C. R. A.; JOANITTI, G. A.; SIMIONI, A. R.; TEDESCO, A. C.; DE AZEVEDO, R. B. Photodynamic Therapy Mediated by Liposomal Chloroaluminum-Phthalocyanine Induces Necrosis in Oral Cancer Cells, *Journal of Biomaterials and Tissue Engineering*, v. 3, p. 148-156, 2013.
- LUCAS, I. K.; KOLODZIEJ, H. In Vitro Antileishmanial Activity of Resveratrol Originates from its Cytotoxic Potential against Host Cells, *Planta Medica*, v. 79, p. 20-26, 2013.
- LUEDDE, T.; KAPLOWITZ, N.; SCHWABE, R. F. Cell Death and Cell Death Responses in Liver Disease: Mechanisms and Clinical Relevance, *Gastroenterology*, v. 147, p. 765-U110, 2014.
- MAFTOUM-COSTA, M.; NAVES, K. T.; OLIVEIRA, A. L.; TEDESCO, A. C.; DA SILVA, N. S.; PACHECO-SOARES, C. Mitochondria, endoplasmic reticulum and actin filament behavior after PDT with chloroaluminum phthalocyanine liposomal in HeLa cells, *Cell Biology International*, v. 32, p. 1024-1028, 2008.
- MALAM, Y.; LOIZIDOU, M.; SEIFALIAN, A. M. Liposomes and nanoparticles: nanosized vehicles for drug delivery in cancer, *Trends in Pharmacological Sciences*, v. 30, p. 592-599, 2009.
- MASSON, D. S.; MORAIS, G. G.; DE MORAIS, J. M.; DE ANDRADE, F. F.; DOS SANTOS, O. D. H.; DE OLIVEIRA, W. P.; ROCHA, P. A. Polyhydroxy alcohols and peach oil addition influence on liquid crystal formation and rheological behavior of O/W emulsions, *Journal of Dispersion Science and Technology*, v. 26, p. 463-468, 2005.
- MCGWIRE, B. S.; SATOSKAR, A. R. Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment, *Qjm-An International Journal of Medicine*, v. 107, p. 7-14, 2014.
- MILAO, D.; KNORST, M. T.; RICHTER, W.; GUTERRES, S. S. Hydrophilic gel containing nanocapsules of diclofenac: development, stability study and physico-chemical characterization, *Pharmazie*, v. 58, p. 325-329, 2003.
- MISHRA, B.; PATEL, B. B.; TIWARI, S. Colloidal nanocarriers: a review on formulation technology, types and applications toward targeted drug delivery, *Nanomedicine-Nanotechnology Biology and Medicine*, v. 6, p. 9-24, 2010.
- MOHAMMADI-BARDBORI, A.; NEJATI, M.; ESMAEILI, J.; GHAFARI, H.; GHAZI-KHANSARI, M. Comparative Measurement of In Vitro Paraquat and Aflatoxin B1 Cytotoxicity Using Three Different Cytotoxicity Assays in

- Pheochromocytoma Cells (PC-12), *Toxicology Mechanisms and Methods*, v. 18, p. 685-689, 2008.
- MOOR, A. C. E. Signaling pathways in cell death and survival after photodynamic therapy, *Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology*, v. 57, p. 1-13, 2000.
- MORA-HUERTAS, C. E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery, *International Journal of Pharmaceutics*, v. 385, p. 113-142, 2010a.
- MORA-HUERTAS, C. E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery, *International Journal of Pharmaceutics*, v. 385, p. 113-142, 2010b.
- MORGAN, C. D.; MILLS, K. C.; LEFKOWITZ, D. L.; LEFKOWITZ, S. S. An Improved Colorimetric Assay for Tumor-Necrosis-Factor Using Wehi 164 Cells Cultured on Novel Microtiter Plates, *Journal of Immunological Methods*, v. 145, p. 259-262, 1991.
- MUEHLMANN, L. A.; MA, B. C.; LONGO, J. P. F.; MENEZES, M. D.; SANTOS, A.; AZEVEDO, R. B. A luminum-phthalocyanine chloride associated to poly(methyl vinyl ether-co-maleic anhydride) nanoparticles as a new third-generation photosensitizer for anticancer photodynamic therapy, *International Journal of Nanomedicine*, v. 9, p. 1199-1213, 2014.
- NEVES, D.P. **Parasitologia Humana**. 11ed. São Paulo: Atheneu, 2005.
- NUNES, S. M. T.; SGUILLA, F. S.; TEDESCO, A. C. Photophysical studies of zinc phthalocyanine and chloroaluminum phthalocyanine incorporated into liposomes in the presence of additives, *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 37, p. 273-284, 2004.
- OCHSNER, M. Photodynamic therapy: The clinical perspective - Review on applications for control of diverse tumorous and non-tumorous diseases, *Arzneimittel-Forschung-Drug Research*, v. 47, p. 1185-1194, 1997.
- ORMOND, A. B.; FREEMAN, H. S. Dye Sensitizers for Photodynamic Therapy, *Materials*, v. 6, p. 817-840, 2013.
- OWENS, D. E.; PEPPAS, N. A. Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles, *International Journal of Pharmaceutics*, v. 307, p. 93-102, 2006.
- PACE, D. Leishmaniasis, *Journal of Infection*, v. 69, p. S10-S18, 2014.
- PAIVA, A. M.; PINTO, R. A.; TEIXEIRA, M.; BARBOSA, C. M.; LIMA, R. T.; VASCONCELOS, M. H.; SOUSA, E.; PINTO, M. Development of noncytotoxic PLGA nanoparticles to improve the effect of a new inhibitor of p53-MDM2 interaction, *International Journal of Pharmaceutics*, v. 454, p. 394-402, 2013.

- PEARSON, R. D.; SOUSA, A. D. Clinical spectrum of Leishmaniasis, *Clinical Infectious Diseases*, v. 22, p. 1-11, 1996.
- PEREIRA, M. A.; MOSIQUEIRA, V. C.; VILELA, J. M. C.; ANDRADE, M. S.; RAMALDES, G. A.; CARDOSO, V. N. PLA-PEG nanocapsules radiolabeled with (99m)Technetium-HMPAO: Release properties and physicochemical characterization by atomic force microscopy and photon correlation spectroscopy, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 33, p. 42-51, 2008a.
- PEREIRA, M. A.; MOSIQUEIRA, V. C.; VILELA, J. M. C.; ANDRADE, M. S.; RAMALDES, G. A.; CARDOSO, V. N. PLA-PEG nanocapsules radiolabeled with (99m)Technetium-HMPAO: Release properties and physicochemical characterization by atomic force microscopy and photon correlation spectroscopy, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 33, p. 42-51, 2008b.
- PEREZ-VICTORIA, F. J.; SANCHEZ-CANETE, M. P.; SEIFERT, K.; CROFT, S. L.; SUNDAR, S.; CASTANYS, S.; GAMARRO, F. Mechanisms of experimental resistance of Leishmania to miltefosine: Implications for clinical use, *Drug Resistance Updates*, v. 9, p. 26-39, 2006.
- PERVAIZ, S.; HOLME, A. L. Resveratrol: Its Biologic Targets and Functional Activity, *Antioxidants & Redox Signaling*, v. 11, p. 2851-2897, 2009.
- PETZOLD, G.; GOLTZSCHE, C.; MENDE, M.; SCHWARZ, S.; JAEGER, W. Monitoring the Stability of Nanosized Silica Dispersions in Presence of Polycations by a Novel Centrifugal Sedimentation Method, *Journal of Applied Polymer Science*, v. 114, p. 696-704, 2009.
- PIMENTEL, M. I. F.; BAPTISTA, C.; RUBIN, E. F.; VASCONCELLOS, E. D. F. E.; LYRA, M. R.; SALGUEIRO, M. D.; SAHEKI, M. N.; ROSALINO, C. M. V.; MADEIRA, M. D.; DA SILVA, A. F.; CONFORT, E. M.; SCHUBACH, A. D. American cutaneous leishmaniasis caused by Leishmania (Viannia) braziliensis resistant to meglumine antimoniate, but with good response to pentamidine: a case report, *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 44, p. 254-256, 2011.
- POULSEN, M. M.; FJELDBORG, K.; ORNSTRUP, M. J.; KJAER, T. N.; NOHR, M. K.; PEDERSEN, S. B. Resveratrol and inflammation: Challenges in translating pre-clinical findings to improved patient outcomes, *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease*, v. 1852, p. 1124-1136, 2015.
- PREETZ, C.; HAUSER, A.; HAUSE, G.; KRAMER, A.; MADER, K. Application of atomic force microscopy and ultrasonic resonator technology on nanoscale: Distinction of nanoemulsions from nanocapsules, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 39, p. 141-151, 2010.
- PRIMO, F. L.; RODRIGUES, M. M. A.; SIMIONI, A. R.; LACAVA, Z. G. M.; MORAIS, P. C.; TEDESCO, A. C. Photosensitizer-Loaded Magnetic

- Nanoemulsion for Use in Synergic Photodynamic and Magnetohyperthermia Therapies of Neoplastic Cells, *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, v. 8, p. 5873-5877, 2008.
- PRIMO, F. L. **Processos fotodinâmicos para bioestimulação tecidual em modelo *in vitro* de pele humana empregando-se laser de baixa potência e cloro alumínio ftalocianina em nanoemulsão.** 2009. 195 f. Tese (Doutorado em Medicamentos e Cosméticos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.
- QUINTANAR-GUERRERO, D.; ALLEMANN, E.; DOELKER, E.; FESSI, H. Preparation and characterization of nanocapsules from preformed polymers by a new process based on emulsification-diffusion technique, *Pharmaceutical Research*, v. 15, p. 1056-1062, 1998.
- RAO, J. P.; GECKELER, K. E. Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters, *Progress in Polymer Science*, v. 36, p. 887-913, 2011.
- REGGENTE, M.; ROSSI, M.; ANGELONI, L.; TAMBURRI, E.; LUCCI, M.; DAVOLI, I.; TERRANOVA, M. L.; PASSERI, D. Atomic Force Microscopy Techniques for Nanomechanical Characterization: A Polymeric Case Study, *Jom*, v. 67, p. 849-857, 2015.
- REIS, C. P.; NEUFELD, R. J.; VILELA, S.; RIBEIRO, A. J.; VEIGA, F. Review and current status of emulsion/dispersion technology using an internal gelation process for the design of alginate particles, *Journal of Microencapsulation*, v. 23, p. 245-257, 2006.
- REPETTO, G.; DEL PESO, A.; ZURITA, J. L. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity, *Nature Protocols*, v. 3, p. 1125-1131, 2008.
- ROCHA, M. S. T.; LUCCI, C. M.; LONGO, J. P. F.; GALERA, P. D.; SIMIONI, A. R.; LACAVA, Z. G. M.; TEDESCO, A. C.; AZEVEDO, R. B. Aluminum-Chloride-Phthalocyanine Encapsulated in Liposomes: Activity Against Naturally Occurring Dog Breast Cancer Cells, *Journal of Biomedical Nanotechnology*, v. 8, p. 251-257, 2012.
- ROCIO, C.; AMATO, V. S.; CAMARGO, R. A.; TUON, F. F.; NICODEMO, A. C. Liposomal formulation of amphotericin B for the treatment of mucosal leishmaniasis in HIV-negative patients, *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 108, p. 176-178, 2014.
- RODRIGUES, G. B.; PRIMO, F. L.; TEDESCO, A. C.; BRAGA, G. U. L. In Vitro Photodynamic Inactivation of Cryptococcus neoformans Melanized Cells with Chloroaluminum Phthalocyanine Nanoemulsion, *Photochemistry and Photobiology*, v. 88, p. 440-447, 2012.
- ROSSETTI, F. C. **Nanodispersões de cristais líquidos como sistemas de liberação de fotossensibilizadores na terapia fotodinâmica do câncer de pele: avaliação**

- in vitro e in vivo da permeação e retenção cutâneas.** 133 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.
- ROSSI-BERGMANN, B., TORRES-SANTOS, E.C., YUNES R., CECHINEL-FILHO, V. & Boeck, P. **Síntese e uso de chalconas para tratamento de doenças parasitárias.** Patente Brasil. BR nº PI 0204079-4. 2002.
- ROSSI-BERGMANN B., **A nanotecnologia: Da saúde para além do determinismo tecnológico.** *Ciência e Cultura (SBPC)*, v. 60, p. 54-57, 2008.
- SACKS, D. L. Metacyclogenesis in Leishmania Promastigotes, *Experimental Parasitology*, v. 69, p. 100-103, 1989.
- SACKS, D. L.; BRODIN, T. N.; TURCO, S. J. Developmental Modification of the Lipophosphoglycan from Leishmania-Major Promastigotes During Metacyclogenesis, *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 42, p. 225-233, 1990.
- SALIH, N. A.; VAN GRIENSVEN, J.; CHAPPUIS, F.; ANTIERENS, A.; MUMINA, A.; HAMMAM, O.; BOULLE, P.; ALIROL, E.; ALNOUR, M.; ELHAG, M. S.; MANZI, M.; KIZITO, W.; ZACHARIAH, R. Liposomal amphotericin B for complicated visceral leishmaniasis (kala-azar) in eastern Sudan: how effective is treatment for this neglected disease?, *Tropical Medicine & International Health*, v. 19, p. 146-152, 2014.
- SANTOS, Patrícia Barros dos. **Efeito imunomodulatório do resveratrol em células do sistema imune in vitro e na administração via oral de ovalbumina em camundongos.** 2010. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Fermentações) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.
- SCHAFFAZICK, S. R.; GUTERRES, S. S. U.; FREITAS, L. D.; POHLMANN, A. R. Physicochemical characterization and stability of the polymeric nanoparticle systems for drug administration, *Química Nova*, v. 26, p. 726-737, 2003a.
- SCHAFFAZICK, S. R.; GUTERRES, S. S. U.; FREITAS, L. D.; POHLMANN, A. R. Physicochemical characterization and stability of the polymeric nanoparticle systems for drug administration, *Química Nova*, v. 26, p. 726-737, 2003b.
- SELLERS, D. L.; KIM, T. H.; MOUNT, C. W.; PUN, S. H.; HORNER, P. J. Poly(lactic-co-glycolic) acid microspheres encapsulated in Pluronic F-127 prolong hirudin delivery and improve functional recovery from a demyelination lesion, *Biomaterials*, v. 35, p. 8895-8902, 2014.
- SHARMAN, W. M.; VAN LIER, J. E.; ALLEN, C. M. Targeted photodynamic therapy via receptor mediated delivery systems, *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 56, p. 53-76, 2004.

- SHARMAN, W. M.; ALLEN, C. M.; VAN LIER, J. E. Photodynamic therapeutics: basic principles and clinical applications, *Drug Discovery Today*, v. 4, p. 507-517, 1999.
- SHAWESH, A. M.; KAUKONEN, A.; KALLIOINEN, S.; ANTIKAINEN, O.; YLIRUUSI, J. Development of indomethacin Carbopol ETD 2001 gels and the influence of storage time and temperature on their stability, *Pharmazie*, v. 58, p. 130-135, 2003.
- SHI, J. J.; VOTRUBA, A. R.; FAROKHZAD, O. C.; LANGER, R. Nanotechnology in Drug Delivery and Tissue Engineering: From Discovery to Applications, *Nano Letters*, v. 10, p. 3223-3230, 2010.
- SIBATA, M. N.; TEDESCO, A. C.; MARCHETTI, J. M. Photophysicals and photochemicals studies of zinc(II) phthalocyanine in long time circulation micelles for Photodynamic Therapy use, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 23, p. 131-138, 2004.
- SIDDIQUI, M. A.; SAQUIB, Q.; AHAMED, M.; FARSHORI, N. N.; AHMAD, J.; WAHAB, R.; KHAN, S. T.; ALHADLAQ, H. A.; MUSARRAT, J.; AL-KHEDHAIRY, A. A.; PANT, A. B. Molybdenum nanoparticles-induced cytotoxicity, oxidative stress, G2/M arrest, and DNA damage in mouse skin fibroblast cells (L929), *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, v. 125, p. 73-81, 2015.
- SILVA, A. R. A.; SIMIONI, A. R.; TEDESCO, A. C. Photophysical and Complexation Studies of Chloro-Aluminum Phthalocyanine with Beta-Cyclodextrin and Hydroxypropyl-Beta-Cyclodextrin, *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, v. 11, p. 4046-4055, 2011.
- SIMIONI, A. R.; PRIMO, F. L.; ZANCANELA, D. C.; RODRIGUES, M. M. A.; TEDESCO, A. C. Silicon(IV) phthalocyanine loaded PLGA nanoparticles as biodegradable drug delivery system for Photodynamic Therapy use, *Drugs of the Future*, v. 32, p. 73-74, 2007.
- SINDERMAN, H.; ENGEL, J. Development of miltefosine as an oral treatment for leishmaniasis, *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 100, p. S17-S20, 2006.
- SINGH, C. K.; NDIAYE, M. A.; AHMAD, N. Resveratrol and cancer: Challenges for clinical translation, *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease*, v. 1852, p. 1178-1185, 2015.
- SIQUEIRA-MOURA, M. P.; PRIMO, F. L.; ESPREAFICO, E. M.; TEDESCO, A. C. Development, characterization, and photocytotoxicity assessment on human melanoma of chloroaluminum phthalocyanine nanocapsules, *Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications*, v. 33, p. 1744-1752, 2013.
- SIQUEIRA-MOURA, M. P.; PRIMO, F. L.; PETI, A. P. F.; TEDESCO, A. C. Validated spectrophotometric and spectrofluorimetric methods for determination

- of chloroaluminum phthalocyanine in nanocarriers, *Pharmazie*, v. 65, p. 9-14, 2010
- SOBOLEV, A. S.; JANS, D. A.; ROSENKRANZ, A. A. Targeted intracellular delivery of photosensitizers, *Progress in Biophysics & Molecular Biology*, v. 73, p. 51-90, 2000.
- SOTO, J.; BERMAN, J. Treatment of New World cutaneous leishmaniasis with miltefosine, *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 100, p. S34-S40, 2006.
- SOUZA, A. C. O.; NASCIMENTO, A. L.; DE VASCONCELOS, N. M.; JERONIMO, M. S.; SIQUEIRA, I. M.; SANTOS, L.; CINTRA, D. O. S.; FUSCALDI, L. L.; PIRES, O. R.; TITZE-DE-ALMEIDA, R.; BORIN, M. F.; BAO, S. N.; MARTINS, O. P.; CARDOSO, V. N.; FERNANDES, S. O.; MORTARI, M. R.; TEDESCO, A. C.; AMARAL, A. C.; FELIPE, M. S. S.; BOCCA, A. L. Activity and in vivo tracking of Amphotericin B loaded PLGA nanoparticles, *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 95, p. 267-276, 2015.
- SOUZA, C. S.; FELICIO, L. B. A.; FERREIRA, J.; KURACHI, C.; BENTLEY, M. V. B.; TEDESCO, A. C.; BAGNATO, V. S. Long-term follow-up of topical 5-aminolaevulinic acid photodynamic therapy diode laser single session for non-melanoma skin cancer, *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, v. 6, p. 207-213, 2009.
- SWARNALATHA, S.; SELVI, P. K.; KUMAR, A. G.; SEKARAN, G. Nanoemulsion drug delivery by ketene based polyester synthesized using electron rich carbon/silica composite surface, *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, v. 65, p. 292-299, 2008.
- TEDESCO, A. C.; ROTTA, J. C. G.; LUNARDI, C. N. Synthesis, photophysical and photochemical aspects of phthalocyanines for photodynamic therapy, *Current Organic Chemistry*, v. 7, p. 187-196, 2003.
- TEIXEIRA, M.; ALONSO, M. J.; PINTO, M. M. M.; BARBOSA, C. M. Development and characterization of PLGA nanospheres and nanocapsules containing xanthone and 3-methoxyxanthone, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 59, p. 491-500, 2005.
- TORRADO, J. J.; ESPADA, R.; BALLESTEROS, M. P.; TORRADO-SANTIAGO, S. Amphotericin B formulations and drug targeting, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 97, p. 2405-2425, 2008.
- TURCHIELLO, R. F.; VENA, F. C. B.; MAILLARD, P.; SOUZA, C. S.; BENTLEY, M. V. B. L.; TEDESCO, A. C. Cubic phase gel as a drug delivery system for topical application of 5-ALA, its ester derivatives and m-THPC in photodynamic therapy (PDT), *Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology*, v. 70, p. 1-6, 2003.

- TWENTYMAN, P. R.; LUSCOMBE, M. A Study of Some Variables in A Tetrazolium Dye (Mtt) Based Assay for Cell-Growth and Chemosensitivity, *British Journal of Cancer*, v. 56, p. 279-285, 1987.
- VAN DER SNOEK, E. M.; ROBINSON, D. J.; VAN HELLEMOND, J. J.; NEUMANN, H. A. M. A review of photodynamic therapy in cutaneous leishmaniasis, *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, v. 22, p. 918-922, 2008.
- VEHABOVIC, M.; HADZOVIC, S.; STAMBOLIC, F.; HADZIC, A.; VRANJES, E.; HARACIC, E. Stability of ranitidine in injectable solutions, *International Journal of Pharmaceutics*, v. 256, p. 109-115, 2003.
- WANG, J. C.; CHEN, S. H.; XU, Z. C. Synthesis and properties research on the nanocapsulated capsaicin by simple coacervation method, *Journal of Dispersion Science and Technology*, v. 29, p. 687-695, 2008.
- WHO technical report series; no. 949. Control of the leishmaniasis. Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, Geneva, 22–26 March 2010; © World Health Organization, 2010; WHO Press, Switzerland.
- http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_949_eng.pdf (acessado em 11/01/2015)
- XU, Q. S.; MASSART, D. L.; LIANG, Y. Z.; FANG, K. T. Two-step multivariate adaptive regression splines for modeling a quantitative relationship between gas chromatography retention indices and molecular descriptors, *Journal of Chromatography A*, v. 998, p. 155-167, 2003.
- YAMASAKI, H.; AGATSUMA, T.; PAVON, B.; MORAN, M.; FURUYA, M.; AOKI, T. Leishmania Major-Like Parasite, A Pathogenic Agent of Cutaneous Leishmaniasis in Paraguay, *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 51, p. 749-757, 1994.
- ZHENG, B. Y.; LIN, T.; YANG, H. H.; HUANG, J. D. Photodynamic inactivation of *Candida albicans* sensitized by a series of novel axially di-substituted silicon (IV) phthalocyanines, *Dyes and Pigments*, v. 96, p. 547-553, 2013a.
- ZHENG, B. Y.; ZHANG, H. P.; KE, M. R.; HUANG, J. D. Synthesis and antifungal photodynamic activities of a series of novel zinc(II) phthalocyanines substituted with piperazinyl moieties, *Dyes and Pigments*, v. 99, p. 185-191, 2013b.