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

Avaliação Fotobiológica da Ftalocianina de Zinco complexada à Cucurbiturila Aplicada na Terapia Fotodinâmica e na Hipertermia Celular

Gisele Cristina Bolfarini

Tese 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 Doutor em
Ciências, Área: **Química**.

RIBEIRÃO PRETO

2012

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

Avaliação Fotobiológica da Ftalocianina de Zinco complexada à Cucurbiturila Aplicada na Terapia Fotodinâmica e na Hipertermia Celular

Gisele Cristina Bolfarini

Orientador: Prof. Dr. Antonio Claudio Tedesco

Tese 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 Doutor em
Ciências, Área: **Química**

RIBEIRÃO PRETO

2012

FICHA CATALOGRÁFICA

Bolfarini, Gisele Cristina

Avaliação Fotobiológica da Ftalocianina de Zinco complexada à Cucurbiturila Aplicada na Terapia Fotodinâmica e na Hipertermia Celular, Ribeirão Preto, 2012

101p.: il.; 30cm

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

Orientador: Tedesco, Antonio Claudio.

1.Terapia Fotodinâmica. 2. Hipertermia Celular.
3.Complexo de Inclusão. 4. Lipossomas.

Dedico este trabalho

*Aos meus pais José Clóvis e Maria José, por todo
amor dedicado à família, pelo apoio e incentivo
constantemente para realização dos meus sonhos.*

AMO VCS!

AGRADECIMENTOS

A Deus, por iluminar meus caminhos e permitir que eu conseguisse chegar até aqui.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Antonio Claudio Tedesco, pela oportunidade de fazer parte de seu grupo de pesquisa e pelo aprendizado científico.

Ao meu irmão Alexandre e à minha cunhada Jamile, obrigada pelo apoio e incentivo.

Ao meu namorado Rodrigo, pelo companheirismo, amor, paciência e constante incentivo. Obrigada por encher minha vida de momentos inesquecíveis.

Aos colegas do Laboratório de Fotobiologia e Fotomedicina Fernando, Andreza, Paulinha, Hugo, André, Leonardo, Fernanda, Aldo, Patrícia, Andrielle e todos os ICs.

Às minha amigas Paty, Dani e Camila, obrigada pelos momentos de descontração durante esses anos de companheirismo.

À minha amiga Roberta, pela amizade desde os tempos da graduação e pela ajuda em alguns momentos deste trabalho.

Ao Gilson, obrigada pela ajuda e discussões científicas que muito me enriqueceram.

À Olímpia pelo profissionalismo e por sempre me ajudar nos momentos em que precisei.

Ao Prof. Dr. Luis Gustavo Dias pela disposição e pela contribuição ao trabalho de simulação molecular.

A todos que direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho.

Aos docentes e funcionários do Departamento de Química da FFCLRP – USP.

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

RESUMO

BOLFARINI, G. C. Avaliação Fotobiológica da Ftalocianina de Zinco complexada à Cucurbiturila Aplicada na Terapia Fotodinâmica e na Hipertermia Celular. 2012. 101f. Tese (Doutorado). Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

A ação combinada da Terapia Fotodinâmica (TFD) e da Hipertermia (HPT), projetadas para trabalhar sinergicamente, pode levar a uma considerável regressão de tumores neoplásicos após mínimas doses de dissipação de calor e/ou fotossensibilização luminosa. Nesse estudo foi proposto, inicialmente, a formação do complexo de inclusão entre o fármaco fotossensibilizante, ftalocianina de zinco (ZnPc) e a cucurbiturila (CB[7]), de modo a aumentar a solubilidade do fármaco e minimizar sua agregação. Além disso, foi proposto nanoencapsular o complexo em lipossomas, tornando-os bicompatíveis. O complexo de inclusão CB[7]:ZnPc foi preparado pelo método de co-evaporação complementado por liofilização e caracterizado por Ressonância Magnética Nuclear (RMN ^1H), Calorimetria Diferencial Exploratória (DSC) e Difração de Raios-X (XDR). As formulações lipossomais foram preparadas pelo método de hidratação do filme lipídico e caracterizadas com relação ao tamanho das vesículas, potencial Zeta, índice de polidispersão e estabilidade. Nos estudos biológicos, utilizando a linhagem neoplásica B16-F10, foi feita uma comparação entre o complexo livre e encapsulado em lipossoma, a fim de estudar o lipossoma como um veículo de liberação de fármacos. Além desse estudo, foi avaliada a toxicidade do lipossoma contendo o complexo de inclusão e o fluido magnético (CB:ZnPc-MLp) na presença de luz e campo magnético. Esse resultado nos mostra que a aplicação da luz e do campo magnético em conjunto, consegue ser mais eficaz do que os mesmos aplicados separadamente, comprovando o efeito sinérgico.

Palavras-chave: Terapia Fotodinâmica, Hipertermia Celular, Complexo de inclusão, lipossomas.

ABSTRACT

BOLFARINI, G. C. **Evaluation of the photobiological Phthalocyanine Zinc complexed to Cucurbituril Applied in Photodynamic Therapy and Hyperthermia.** 2012. 101f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

The combined action of photodynamic therapy (PDT) and hyperthermia (HPT), designed to work synergistically, may lead to a significant regression of neoplastic tumors after minimum doses of heat dissipation and / or light photosensitization. In this study was provided initially, the formation of an inclusion complex between the drug photosensitizer, zinc phthalocyanine (ZnPc) and cucurbit[7]uril (CB [7]) in order to increase the solubility of the drug and minimize aggregation. Furthermore, it was also proposed nanoencapsular liposome complex, making them biocompatible. The inclusion complex CB [7]: ZnPc was prepared by co-evaporation method complemented by lyophilization and characterized by nuclear magnetic resonance (^1H -NMR), Differential Scanning Calorimetry (DSC) and X-ray diffraction (XDR). Liposomal formulations were prepared by lipid film hydration and characterized with respect to vesicle size, zeta potential, polydispersity and stability. In the biological studies, using neoplastic cell line B16-F10, a comparison was made between the free complex and the complex encapsulated in liposome in order to study the liposome as a carrier for drug delivery. In this study, we evaluated the toxicity of the liposome containing the inclusion complex and the magnetic fluid (CB: ZnPc-MLP) in the presence of magnetic field and light. This result shows that the application of light and magnetic field in combination are able to be more effective than the same applied separately, demonstrating the synergistic effect.

Keywords: Photodynamic Therapy, Hyperthermia, Inclusion Complex, liposome.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Diagrama de Jablonski para o processo de fotoativação	5
Figura 2: Estrutura química das porfirinas e das ftalocianinas	10
Figura 3: Estrutura química das ciclodextrinas	12
Figura 4: Ilustração da associação entre a ciclodextrina e o fármaco	13
Figura 5: Esquema de síntese e representações das Cucurbit[5, 6 e 8]urilas.....	15
Figura 6: Estrutura da Cucurbiturila [7] CB[7].....	17
Figura 7: Passos para a formação dos lipossomas: estrutura do fosfolípido, da bicamada lipídica e do lipossoma.....	19
Figura 8: Representação esquemática de um magnetolipossoma	22
Figura 9: Ilustração da linhagem neoplásica de melanoma murino B16-F10 na fase de confluência.....	41
Figura 10: Espectro de absorção UV-VIS da ZnPc em etanol.....	51
Figura 11: Curva de calibração para ZnPc em etanol	52
Figura 12: Substituinte da molécula da Ftalocianina de Zinco com carbonos que apresentam hidrogênios numerados	56
Figura 13: Unidade da molécula de Cucurbiturila [7] com carbonos que apresentam hidrogênios numerados	56
Figura 14: Substituinte da molécula da ftalocianina de zinco e a unidade da cucurbiturila[7] com os carbonos que apresentam hidrogênios numerados	58
Figura 15: Curva DSC da Cucurbiturila[7], da Zinco ftalocianina e do complexo de inclusão (CB[7]:ZnPc).....	61
Figura 16: Difratoogramas de Raios-X	62
Figura 17: Simulação molecular da Ftalocianina de Zinco (ZnPc)	64

Figura 18: Simulação molecular da Cucurbiturila[7] (CB[7]).....	64
Figura 19: Simulação molecular do complexo de inclusão (1:1), onde a ZnPc e a CB[7] ficam alinhadas	65
Figura 20: Simulação molecular do complexo de inclusão (1:1), onde a ZnPc é uma tampa para a CB[7].....	66
Figura 21: Estudo de estabilidade avaliando o diâmetro hidrodinâmico das vesículas, sendo (■) lipossoma vazio, (■) lipossoma contendo CB[7], (■) lipossoma contendo ZnPc e (□) lipossoma contendo complexo de inclusão	71
Figura 22: Estudo de estabilidade avaliando o potencial Zeta das vesículas, sendo (■) lipossoma vazio, (■) lipossoma contendo CB[7], (■) lipossoma contendo ZnPc e (□) lipossoma contendo complexo de inclusão	71
Figura 23: Estudo de estabilidade avaliando o diâmetro hidrodinâmico das vesículas, sendo (■) lipossoma contendo o fluido magnético (ML) e (■) lipossoma contendo o complexo de inclusão e o fluido magnético (CB:ZnPc:ML).....	72
Figura 24: Porcentagem de células B16-F10 viáveis após 3 h de incubação com a CB[7] livre em diferentes concentrações (Não houve diferença significativa com relação ao controle, $p > 0,05$)	75
Figura 25: Porcentagem de células B16-F10 viáveis após 3 h de incubação com a ZnPc livre em diferentes concentrações (Houve diferenças significativas com relação ao controle, $p < 0,05$)	76
Figura 26: Porcentagem de células B16-F10 viáveis após 3 h de incubação com o complexo livre CB[7]:ZnPc (1:1) em diferentes concentrações (Houve diferenças significativas com relação ao controle, $p < 0,05$).....	76
Figura 27: Porcentagem de células B16-F10 viáveis após 3 h de incubação com o Lipossoma vazio (Vazio-Lp), o lipossoma contendo a CB[7]-Lp, o lipossoma contendo o fármaco (ZnPc-Lp) e o lipossoma contendo complexo de inclusão (CB:ZnPc-Lp) na concentração de $0,25 \mu\text{g.mL}^{-1}$	78
Figura 28: Porcentagem de células B16-F10 vivas após 3 horas de incubação com o Lipossoma de fluido magnético (ML), o lipossoma com o complexo e o fluido magnético (CB:ZnPc-ML) na concentração de $0,25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $1,0 \times 10^{15}$ partículas.mL ⁻¹	79
Figura 29: Porcentagem de células B16-F10 vivas após 3 horas de incubação com o complexo livre após ser submetido a diferentes doses de irradiação	80

Figura 30: Porcentagem de células B16-F10 vivas após 3 horas de incubação com o lipossoma contendo o complexo (CB:ZnPc-Lp) submetido a diferentes doses de irradiação81

Figura 31: Porcentagem de células B16-F10 vivas após 3 horas de incubação com o lipossoma CB:ZnPc-ML submetido a diferentes doses de radiação83

Figura 32: Porcentagem de células B16-F10 vivas após 3 horas de incubação com o lipossomas ML e CB:ZnPc-ML na presença do campo magnético85

Figura 33: Porcentagem de células B16-F10 vivas, incubadas com o lipossoma CB:ZnPc-ML com aplicação de luz laser e de campo magnético.....86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Dimensões e algumas propriedades físicas das cucurbiturilas.....	16
Tabela 2: Valores de coeficiente de partição para a ZnPc (sistema 1- octanol/ água).....	53
Tabela 3: Dados espectroscópicos do composto Ftalocianina de Zinco	56
Tabela 4: Dados espectroscópicos do composto Cucurbiturila[7]	57
Tabela 5: Dados espectroscópicos do complexo de inclusão (1:1).....	58
Tabela 6: Dados espectroscópicos do complexo de inclusão na proporção 2:1	59
Tabela 7: Tamanho das vesículas, índice de polidispersão e Potencial Zeta para as formulações lipossomais	68
Tabela 8: Perda de ZnPc durante o processo de preparação do lipossoma contendo o complexo CB:ZnPc-Lp.....	73

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de Variância
β -CD	β – Ciclodextrina
B16-F10	Linhagem celular de melanoma metastático pigmentada
ClAlPc	Ftalocianina de cloroalumínio
CB[7]	Cucurbiturila[7]
CB[7]:ZnPc	Cucurbiturila[7] complexada à ftalocianina de zinco
CB[7]-Lp	Lipossoma contendo a cucurbiturila[7]
CB:ZnPc-Lp	Lipossoma contendo o complexo de inclusão
CB:ZnPc-ML	Lipossoma contendo o complexo de inclusão e fluido magnético
CD	Ciclodextrina
Δ	Deslocamento químico nos sinais de RMN
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMF	Dimetilformamida
DSC	Differential scanning calorimeter
E	Coefficiente de absorvidade molar
EROS	Espécies reativas de oxigênio
FDA	Food and Drug Administration
FS	Fármaco fotossensibilizante
FM	Fluido magnético
FMBs	Fluidos magnéticos biocompatíveis
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HO•	Radical hidroxila
He-Ne	Hélio-Neodímio
HEPES	Ácido N-2-Hidroxiethylpiperazina-N'-2'-Etanossulfônico
HPT	Hipertermia
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IPd	Índice de polidispersividade
MTT	3[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-brometo difenil tetrazólico)

ML	Lipossomas contendo o fluido magnético
MLV	Vesículas multilamelares grandes
NPMs	Nanopartículas magnéticas
$^1\text{O}_2$	Oxigênio singleto
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Saline phosphate buffer (tampão salino fosfato)
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
S_0	Estado fundamental
S_1	Primeiro estado excitado singleto
S_n	Estado singleto excitado
SFB	Soro fetal bovino
SUV	Vesículas unilamelares pequenas
TFD	Terapia Fotodinâmica
TMS	Tetrametilsilano
UV-Vis	Ultravioleta-visível
XDR	Difração de raios X
Z	Potencial Zeta
ZnPc	Ftalocianina de zinco
ZnPc-Lp	Lipossoma contendo a ftalocianina de zinco

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract	ii
Lista de Figuras	iii
Lista de Tabelas	iv
Lista de abreviaturas e Siglas.....	vi
I. INTRODUÇÃO.....	1
1. Câncer	1
2. Terapia Fotodinâmica (TFD).....	2
3. Fármacos Fotossensibilizantes utilizados na TFD	7
4. Ftalocianinas	9
5. Complexos de inclusão com ciclodextrina	11
6. Complexos de inclusão com cucurbiturilas	14
7. Sistemas de Liberação Controlada – Lipossomas	18
8. Fluidos Magnéticos	20
9. Hipertermia	22
II. OBJETIVOS	24
III. PARTE EXPERIMENTAL	25
1. Materiais	25
2. Preparações	27
3. Aparelhagem.....	28
4. Métodos	31
4.1 Metodologia para quantificação de ZnPc por espectrofotometria.....	31
4.2 Determinação do coeficiente de partição (o/a) do fármaco fotossensibilizante (ZnPc)	32
4.3 Preparação do complexo de inclusão com a β -ciclodextrina	33
4.4 Preparação dos complexos de inclusão com a cucurbiturila[7]	34
4.5 Caracterização físico-química dos complexos de inclusão	35
4.6. Simulação molecular do complexo de inclusão CB[7]:ZnPc.....	36
4.7 Preparação dos lipossomas	36
4.8 Preparação dos lipossomas magnéticos (Magnetolipossomas)	37

4.9 Caracterização físico-química dos lipossomas.....	38
5. Estudo de estabilidade das formulações lipossomais.....	38
5.1 Determinação da eficiência de encapsulação e do rendimento da preparação lipossomal.....	39
5.2. Estudos envolvendo linhagem de células neoplásicas	40
5.2.1 Crescimento e manutenção da cultura de células da linhagem neoplásica de melanoma murino (B16-F10)	40
5.2.2 Controle da integridade da membrana celular.....	41
5.2.3 Ensaio de viabilidade celular – MTT	42
5.2.4 Estudos de citotoxicidade	43
5.2.5 Determinação da citotoxicidade da Ftalocianina de Zinco (ZnPc), da Cucurbiturila (CB[7]) e do complexo de inclusão (CB[7]:ZnPc) na ausência de luz e campo magnético	44
5.2.6 Determinação da citotoxicidade das formulações lipossomais na ausência de luz e campo magnético	45
5.2.7 Determinação da citotoxicidade dos lipossomas magnéticos na ausência de luz e do campo magnético.....	45
5.2.8 Determinação fototoxicidade do complexo livre (CB[7]:ZnPc), do lipossoma contendo o complexo (CB:ZnPc-Lp) e do lipossoma contendo o complexo e o fluido magnético (CB:ZnPc-ML)	46
5.2.9 Determinação da citotoxicidade dos lipossomas magnéticos na presença de campo magnético	47
5.3 Determinação da toxicidade do lipossoma contendo o complexo de inclusão (CB:ZnPc-ML) na presença de luz e de campo magnético.....	48
IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
1. Metodologia para quantificação da ZnPc por espectrofotometria.....	50
2. Determinação do coeficiente de partição do fármaco fotossensibilizante (ZnPc)	52
3. Preparação do complexo de inclusão	53
4. Caracterização físico-química do complexo de inclusão	55
4.1 Ressonância magnética nuclear (RMN ¹ H).....	55
4.2 Calorimetria exploratória diferencial (DSC).....	60
4.3 Difração de raios-X (XDR)	61
5. Simulação molecular do complexo de inclusão CB[7]:ZnPc.....	63
6. Caracterização físico-química dos lipossomas.....	67
7. Estudo de estabilidade das formulações lipossomais.....	70

8. Determinação da eficiência de encapsulação do complexo de inclusão em lipossoma e do rendimento da preparação lipossomal	72
9. Determinação da toxicidade da ftalocianina de zinco (ZnPc), da cucurbiturila (CB[7]) e do complexo de inclusão (CB[7]:ZnPc) (1:1) na ausência de luz	74
10. Determinação da toxicidade das formulações lipossomais na ausência de luz.....	77
11. Determinação da toxicidade dos lipossomas magnéticos na ausência do estímulo luminoso e do campo magnético	78
12. Determinação fototoxicidade do complexo livre (CB[7]:ZnPc), do lipossoma contendo o complexo (CB:ZnPc-Lp) do lipossoma contendo o complexo e o fluido magnético (CB:ZnPc-ML).....	80
13. Determinação da toxicidade do lipossoma contendo o complexo de inclusão e o fluido magnético na presença de campo magnético	84
14. Determinação da toxicidade do lipossoma contendo o complexo de inclusão na presença de luz e de campo magnético.....	85
V. CONCLUSÕES.....	88
VI. REFERÊNCIAS	90
VII. ANEXOS.....	98

I. INTRODUÇÃO

1. Câncer

Câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado (maligno) de células que invadem os tecidos e órgãos, podendo espalhar-se (metástase) para outras regiões do corpo. Dividindo-se rapidamente, estas células tendem a ser muito agressivas e incontroláveis, determinando a formação de tumores (acúmulo de células cancerosas) ou neoplasias malignas. Por outro lado, um tumor benigno significa simplesmente uma massa localizada de células que se multiplicam vagarosamente e se assemelham ao seu tecido original, raramente constituindo um risco de vida.

Os diferentes tipos de câncer correspondem aos vários tipos de células do corpo. Por exemplo, existem diversos tipos de câncer de pele, pois ela é formada de mais de um tipo de célula. Se o câncer tem início em tecidos epiteliais como pele ou mucosas ele é denominado carcinoma. Se começa em tecidos conjuntivos como osso, músculo ou cartilagem é chamado de sarcoma.

Outras características que diferenciam os diversos tipos de câncer entre si são a velocidade de multiplicação das células e a capacidade de invadir tecidos e órgãos vizinhos ou distantes (metástases).

As causas de câncer são variadas, podendo ser externas ou internas ao organismo, estando ambas inter-relacionadas. As causas externas relacionam-se ao meio ambiente e aos hábitos ou costumes próprios do meio social e cultural. As causas

internas são, na maioria das vezes, geneticamente pré-determinadas e estão ligadas à capacidade do organismo de se defender das agressões externas. Esses fatores causais podem interagir de várias formas, aumentando a probabilidade de transformações malignas nas células normais.

A incidência mundial de cânceres cresceu 20% na última década, sendo registrados mais de 12 milhões de novos casos ao ano – número superior à população da cidade de São Paulo. De acordo com dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) em 2010, o câncer foi a segunda causa de morte em países desenvolvidos, figurando atrás apenas de doenças cardiovasculares. Trata-se, portanto, de um alvo constante de pesquisa e desenvolvimento tecnológico, para potencializar os efeitos terapêuticos de fármacos que promovam, acima de tudo, melhoria na qualidade de vida dos pacientes.

No Brasil, de acordo com estimativas do Instituto Nacional do Câncer (INCA), em 2012, a epidemiologia da doença segue a tendência mundial. Nesse ano, foram estimados diagnósticos de mais de 518 mil novos casos.

2. Terapia Fotodinâmica (TFD)

A Terapia Fotodinâmica foi a primeira combinação droga-dispositivo luminoso aprovada pela Associação Americana de Drogas e Alimentos (FDA), há aproximadamente duas décadas, porém permanece pouco utilizada clinicamente já que a maioria dos estudos relacionados ainda encontram-se em fase pré-clínica. O sucesso dessa modalidade terapêutica surge dado o contexto atual das terapêuticas comumente

empregadas, que levam tanto a destruição massiva de tecidos tumorais, quanto à imunossupressão do paciente (TRIESSCHEIJN et al., 2006) e inúmeros efeitos colaterais indesejáveis.

A TFD emprega a combinação de um fármaco fotossensibilizante (FS) que se localiza seletivamente no tecido tumoral, uma luz de comprimento de onda específico na região do visível, compatível com a maior absorção do fármaco empregado e oxigênio molecular (MACDONALD e DOUGHERTY, 2001), geralmente dissolvido no tecido. A administração do fármaco fotossensibilizante pode ocorrer pelas vias sistêmicas, tópica ou intratumoral, seguido de um período de 1-72h de biodistribuição (dependendo da cinética do FS) para que ocorra seu acúmulo no tecido tumoral. As lesões são então expostas à luz no comprimento de onda de absorção máxima do fármaco fotossensibilizante (600 a 800 nm). Em suma, o objetivo principal da TFD consiste em induzir a morte de células neoplásicas pela fotossensibilização do fármaco, com regressão da massa tumoral, minimizando os danos às células saudáveis e, conseqüentemente, os efeitos colaterais, por processo de apoptose ou necrose. Entretanto, apenas o processo fotodinâmico não teria serventia para o tratamento de células cancerígenas se não fosse a propriedade apresentada pelas próprias células malignas de manter aprisionadas no seu interior o FS por um tempo muito maior do que aquele observado em células normais. A TFD, que tem sido cada vez mais utilizada no tratamento de câncer, ocorre devido a uma sequência de eventos físicos, químicos e biológicos (PLAETZER et al., 2009; TAPAJOS et al., 2008).

O mecanismo de atuação da TFD ocorre por meio de dano oxidativo a componentes celulares pela geração de espécies reativas de oxigênio (EROS),

principalmente o oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$). Após a injeção endovenosa ou aplicação local do fármaco fotossensibilizante e seu acúmulo no tecido tumoral há a internalização do mesmo para o ambiente intracelular (TRIESSCHEIJN et al., 2006). Nesse estágio, o FS se encontra em seu estado fundamental (S_0) e estável.

Assim que ocorre a irradiação do tecido, em comprimento de onda específico, normalmente na região vermelha ou infravermelha do espectro eletromagnético (600 a 800 nm), o fármaco que se encontra acumulado nas células tumorais absorve a energia fornecida pela fonte luminosa, em forma de fótons, atingindo um estado excitado singlete de maior energia (S_n), decaindo rapidamente para o mais baixo estado excitado singlete (S_1). A seguir, pela conversão ao estado tripleto via cruzamento intersistemas, de acordo com o diagrama de Jablonsk (ATKINS, ELUMALAI e DE PAULA, 2002) como mostra Figura 1, o mesmo pode dar sequência a uma série de reações que geram espécies reativas de oxigênio (EROS). Nesse momento, de forma muito rápida, o FS pode sofrer dois tipos de reações fotoenergéticas (ARUMAINAYAGAM et al., 2010).

Os mecanismos de ação da TFD são classificados em Tipo I e Tipo II e são resultantes de uma combinação de fenômenos físicos (interação da luz com a molécula), fenômenos químicos (produção de espécies reativas de oxigênio – EROS) e fenômenos biológicos (destruição do tumor) Figura 2. (PLAETZER et al., 2009; VANHILLEGGERSBERG, KORT e WILSON, 1994).

Figura 1: Diagrama de Jablonski para o processo de fotoativação. Na figura: S_0 (estado fundamental), S_1 (primeiro estado excitado singlete), S_n (estado excitado singlete), T_1 (primeiro estado excitado tripleto), O_2 (oxigênio), $HO^\bullet$ (radical hidroxila), $O_2^\bullet$ (ânion superóxido), H_2O_2 (peróxido de hidrogênio), 1O_2 (oxigênio singlete). Seta azul (absorção), seta laranja (fluorescência), seta vermelha a. (conversão interna), seta vermelha b. (fosforescência).

O **Tipo I** envolve a abstração de átomo de hidrogênio ou reações de transferência de elétrons entre os estados excitados do fármaco fotossensibilizante e um substrato biológico, resultando na produção de radicais livres e íons-radicais. Estes radicais são altamente reativos e reagem com o oxigênio molecular gerando os ânions superóxidos ou radicais hidroxila que causam irreparáveis danos aos tecidos tumorais (PLAETZER et al., 2009).

O **Tipo II** resulta da transferência de energia entre o estado tripleto excitado do fármaco fotossensibilizante e o oxigênio molecular gerando o primeiro estado excitado do oxigênio, o oxigênio singlete (1O_2). Esta molécula reativa causa danos em várias estruturas celulares como quebra do DNA genômico, destruição da membrana plasmática, lipossomas e mitocôndrias (FICHEUX, 2009).

Ambos os tipos de reações podem ocorrer simultaneamente e a razão entre esses processos são dependentes do fármaco fotossensibilizante utilizado, assim como a concentração dos substratos e do oxigênio presentes no meio. Dada à alta reatividade e o curto período de meia vida do oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) e dos radicais hidroxilas, apenas as moléculas que estão próximas às áreas de localização do FS são diretamente afetados pela TFD (CASTANO , DEMIDOVA e HAMBLEM, 2004; ROBERTSON , EVANS e ABRAHARNSE, 2009).

A geração massiva de EROS promove o disparo de diversos mecanismos celulares que induzirão a morte celular direta por diferentes vias: apoptose ou necrose, que vai depender do tipo de célula, da concentração do FS empregado, da dose de energia fornecida e da localização intracelular do FS (AGOSTINIS et al., 2011).

A localização intracelular do FS sinaliza a via de morte mais provável, uma vez que fármacos com acúmulos em mitocôndrias estão associados à indução de apoptose celular pela liberação do citocromo c e indução de resposta por meio da cascata de caspases. Fármacos localizados em membranas de organelas como os lisossomos tendem a ocasionar necrose, dada à perda de integridade de membrana, bem como a rápida depleção intracelular de ATP. Há descrições de que viabilidades celulares menores que 70% são preditivas de apoptose, enquanto que a necrose é encontrada com taxas de citotoxicidade de mais de 90% (MROZ e HAMBLIN, 2011).

Além do dano celular direto, a TFD também promove lesão à vascularização tumoral, resultando em falta de aporte de nutrientes e oxigenação às células tumorais no microambiente tumoral consequentemente, promovendo a morte celular secundária associada à necrose tecidual. Estudos como o de Barnes et al, 2009 têm demonstrado

que intervalos menores entre o tempo de administração do fármaco fotossensibilizante e a radiação tumoral favorecem a ocorrência de lesões vasculares, uma vez que não há completa dissipação do FS às células tumorais, potencializando a eficiência do tratamento e levando à reduções tumorais maiores, sendo esse um efeito desejado nessa modalidade de tratamento (BARNES et al., 2009).

3. Fármacos Fotossensibilizantes utilizados na TFD

Os fármacos fotossensibilizantes (FS) são os agentes ativos no processo da TFD. Tal fato justifica o grande número de estudos para desenvolvimento de novos compostos, na tentativa de torná-los mais específicos na retenção e distribuição pelos tecidos carcinogênicos, além de potencialmente mais ativos. Nos últimos anos, as grandes linhas de pesquisa na área de TFD se concentram nos estudos de desenvolvimento, administração e biodistribuição de possíveis candidatos a fármacos fotossensibilizantes empregáveis no tratamento fotoquímico-terápico de tecidos tumorais (ALLISON et al., 2004). As principais propriedades de um fármaco fotossensibilizante tumoral são:

- i. alta pureza química;
- ii. alto coeficiente de extinção molar no vermelho;
- iii. baixa tendência de agregação em meio aquoso;
- iv. alto rendimento quântico de produção de oxigênio singlete e outras EROS;
- v. boa seletividade;
- vi. rápida absorção pelo organismo;

- vii. baixa ou total ausência de toxicidade no escuro;
- viii. acúmulo mínimo na pele e ausência de potencial mutagênico.

Dentre os fármacos fotossensibilizantes presentes no mercado atualmente, destacam-se três grandes gerações. A primeira geração foi desenvolvida no começo do século XX, composta principalmente de porfirinas e seus derivados, sendo seu principal representante o Photofrin® (ETHIRAJAN et al., 2011). Apesar do sucesso na sua aplicação clínica e de ainda ser o fármaco fotossensibilizante mais utilizado, o Photofrin® possui inúmeras desvantagens, dentre elas, baixo comprimento de onda de ativação (na faixa de 630 nm), restringindo sua aplicação a cânceres superficiais e ainda apresenta tempo de retenção prolongada, favorecendo a toxicidade cutânea após a TFD (JORI, 1996).

A segunda geração de FS, por sua vez, foi estabelecida com o intuito de contornar os efeitos limitantes dos fármacos de primeira geração. Os principais fármacos de segunda geração são as ftalocianinas, clorinas e alguns corantes. Dentre as clorinas, a mais empregada é o Foscan® (BONNETT, 1995), que é um potente FS com comprimento de onda de ativação de 652 nm. Possui uma maior eliminação tecidual, se comparado ao Photofrin®. Apesar da eficácia, o Foscan® desencadeia fotossensibilidade cutânea elevada, que pode permanecer por várias semanas após o tratamento (O'CONNOR, GALLAGHER e BYRNE, 2009).

Dentre os fármacos fotossensibilizantes de segunda geração, podemos destacar as ftalocianinas, que são utilizadas desde 1995 pelo nosso grupo de pesquisa, o qual já desenvolveu alguns trabalhos explorando suas propriedades (BARBUGLI et al., 2010;

NUNES , SGUILLA e TEDESCO, 2004; OLIVEIRA et al., 2006; TEDESCO , ROTTA e LUNARDI, 2003).

4. Ftalocianinas

As ftalocianinas utilizadas na TFD contêm um íon metálico diamagnético e demonstraram alta eficiência fotodinâmica no tratamento de tumores animais, assim como efeitos colaterais fototóxicos reduzidos (DE ROSA e BENTLEY, 2000).

De uma maneira geral, as ftalocianinas (tetraazatetrabenzoporfirina) são compostos sintéticos semelhantes a porfirinas naturais, ou seja, são compostos heterocíclicos planares em um sistema aromático (Figura 2). Contudo, nas ftalocianinas as subunidades pirrólicas são unidas por átomos de nitrogênio, enquanto nas porfirinas as subunidades são unidas através de pontes de metileno. Além disso, nas ftalocianinas a conjugação do macrociclo é estendida por anéis benzênicos sobre quatro unidades pirrólicas, resultando em uma forte banda de absorção na região do vermelho do espectro visível (650 a 680 nm).

As propriedades fotofísicas das ftalocianinas são fortemente dependentes do íon metálico central. Dentre as ftalocianinas, complexos de Zn^{2+} e Al^{3+} (ftalocianina de zinco e ftalocianina de cloro e alumínio) possuem as propriedades fotofísicas mais favoráveis para a aplicação na TFD, isto é, tempo de vida longo no estado singlete excitado (cerca de 3-8 ns) e tripleto excitados (na ordem de 400 a 500 μs), os quais são produzidos com alto rendimento quântico (IDOWU e NYOKONG, 2007). Além disso, apresentam boa fotoestabilidade; podem ser seletivamente acumuladas e eliminadas do

tecido alvo com quase nenhuma emissão de fluorescência basal observada em estudo *in vitro* após 24 h da sua administração; são preparadas por métodos sintéticos clássicos com bom rendimento; são produzidas em larga escala; além de possuir vantagens sobre as porfirinas devido à sua absorção ocorrer numa faixa de comprimento de onda maior (HOWE e ZHANG, 1998; LIU et al., 2005; NUNES , SGUILLA e TEDESCO, 2004).

Ftalocianina

Figura 2: Estrutura química das porfirinas e das ftalocianinas. M é o metal de coordenação que a nomeia (Imagens retiradas do catálogo da Sigma-Aldrich®).

Outra característica importante é que os complexos metalizados de ftalocianinas têm demonstrado baixa toxicidade no escuro e eliminação rápida, reduzindo efeitos tóxicos comumente encontrados nos fármacos fotossensibilizantes já empregados comercialmente (DURMUS e AHSEN, 2010).

Como desvantagem, as ftalocianinas tendem a formar agregados, uma associação intermolecular em meio aquoso, que reduz o rendimento quântico de

fluorescência e encurta o tempo de vida tripleto excitado, afetando a sua eficácia fotossensibilizante e todo o processo fotodinâmico (OZOEMENA, KUZNETSOVA e NYOKONG, 2001). Além disso, alguns derivados de ftalocianinas são altamente hidrofóbicos e de difícil veiculação no organismo. Quando comparamos a estrutura da ftalocianina de zinco (ZnPc) com a ftalocianina de cloro e alumínio (ClAlPc), temos que essa última, por causa da presença do cloro não apresenta uma estrutura plana, ao contrário da ftalocianina de zinco. Esse fato contribui para que a ZnPc, além de ser extremamente hidrofóbica, agrega-se mais facilmente do que as moléculas da ClAlPc. Outro aspecto negativo é a baixa seletividade tumoral, exigindo altas doses de medicamento para que as concentrações efetivas estejam presentes para a irradiação tecidual (SCHNEIDER et al., 2008). Por essas razões, foi proposta a formação de um complexo de inclusão utilizando a ftalocianina de zinco, a fim de minimizar os problemas relacionados com a hidrofobicidade e a agregação.

5. Complexos de inclusão com ciclodextrina

Uma das áreas mais importantes da biotecnologia e bioengenharia é o fenômeno da complexação molecular, a qual tem grande importância na seletividade e solubilização de uma diversidade de biomoléculas. As ciclodextrinas, nos últimos tempos, têm sido utilizadas no desenvolvimento de novos sistemas terapêuticos com a finalidade de aumentar a incorporação de fármaco, estabilizá-lo e até modelar sua liberação (LIRA et al., 2009).

As ciclodextrinas são classificadas de forma geral em α , β e γ (ciclodextrinas naturais) (Figura 3). Essa classificação depende da quantidade de unidades de glicopiranoses (glicose) existentes, as quais determinarão o tamanho da cavidade interna. Assim, as ciclodextrinas α , β e γ possuem seis, sete e oito unidade de glicopiranoses e diâmetro de aproximadamente 5,2; 6,6 e 8,4 Å respectivamente (CONNORS, 1997). Dentre as ciclodextrinas naturais, a β -ciclodextrina é largamente utilizada. Esse fato é atribuído tanto devido ao seu preço, como a sua disponibilidade e ainda pelo tamanho de sua cavidade interna.

A presença da cavidade interna hidrofóbica das ciclodextrinas faz com que elas tenham a capacidade de alojar uma molécula hóspede formando complexos de inclusão com uma variedade de substâncias hidrofóbicas (Figura 4) (DEL VALLE, 2004).

Figura 3: Estrutura química das ciclodextrinas (CONNORS, 1997).

Para a formação de complexos de inclusão com a ciclodextrina é necessário que a molécula hóspede, ou parte da molécula, entre em contato com a cavidade da ciclodextrina para que seja formada uma associação estável. Uma variedade de forças

não-covalentes como forças de Van der Waals, interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio, são responsáveis pela formação do complexo. É importante ressaltar que não ocorrem interações fortes como ligações covalentes.

Os complexos de inclusão têm sido extensamente estudados por promoverem um aumento da solubilidade de substâncias pouco solúveis em água. Além de melhorar a hidrossolubilidade, a complexação proporciona uma melhoria na estabilidade química, maior biodisponibilidade, diminuição dos efeitos indesejáveis do composto utilizado como princípio ativo (DEVARAKONDA et al., 2005). As CDs vêm desempenhando um importante papel na Química Medicinal no que diz respeito à tecnologia de liberação controlada de fármacos, que representa atualmente uma das fronteiras da ciência envolvendo diferentes aspectos multidisciplinares do conhecimento.

Figura 4: Ilustração da associação entre a ciclodextrina e o fármaco; (A) complexos de inclusão 1:1 e (B) complexos de inclusão 1:2 (DEVARAKONDA et al., 2005).

Os sistemas de liberação, frequentemente descritos como “drug delivery systems” (FREITAS et al., 2012), oferecem inúmeras vantagens quando comparados a outros de dosagem convencional. As CDs vêm sendo empregadas com sucesso na administração e liberação de fármacos por várias vias e/ou locais de administração, como oral, nasal, oftálmica, pulmonar, dérmica e transdérmica. Sendo assim, a incorporação das CD's em sistemas farmacêuticos constitui uma realidade consolidada, segundo estatísticas recentes, 515 princípios ativos já foram estudados em associação com ciclodextrinas (SZEJTLI, 2005). Mais de 30 medicamentos comercializados mundialmente já possuem CD's presentes em suas formulações (LOFTSSON e DUCHENE, 2007). Como no caso de princípios largamente utilizados, como o antiinflamatório Piroxicam - β CD (Brexin®) (DE JESUS et al., 2006) e o protetor gástrico Omeprazol - β CD (Omebeta®) (FIGUEIRAS et al., 2007), que tiveram seus efeitos colaterais minimizados após a utilização da β -CD como excipiente.

Os trabalhos encontrados na literatura que utilizaram a β -ciclodextrina como um veículo para a formação de complexos de inclusão (BARBATO et al., 2003; LIRA et al., 2009; ZINGONE e RUBESSA, 2005), nos serviram de modelo para a formação dos complexos de inclusão com um novo composto, a cucurbiturila.

6. Complexos de inclusão com cucurbiturilas

A cucurbiturila pertence a uma classe de compostos que vem ganhando cada vez mais espaço na literatura e que tem mostrado uma química tão rica e versátil quanto à das ciclodextrinas (DEMETS, 2007).

Da mesma forma que as ciclodextrinas, as cucurbiturilas além de serem simétricas, possuem uma cavidade central hidrofóbica relativamente grande, que é capaz de acomodar espécies variadas para a formação de complexos de inclusão (WANG et al., 2009), melhorando a solubilidade de substâncias lipofílicas e diminuindo a capacidade de agregação dessas espécies (JOGUPARTHI e ANDERSON, 2008).

As cucurbiturilas são estruturas cíclicas toroidais, compostas de unidades de glicolurila (Tetrahydroimidazo[4,5-d]imidazole-2,5-(1H,3H)-dione) (de 5 a 11 unidades), ligadas por grupos $-CH_2-$ em suas aminas de simetria D_{6h} (Figura 5).

Nas primeiras sínteses de cucurbitandos originaram exclusivamente macrocíclicos hexaméricos e só recentemente foi possível sintetizar e isolar, em quantidades representativas, seus análogos.

Como pode ser observado pela Figura 5, quanto maior o número de unidade glicolurílicas, maior é o tamanho da cavidade e dos opérculos dos cavitandos, representando a principal barreira estérica para a formação de complexos de inclusão.

Figura 5: Esquema de síntese em cima, a= Mock e Behrend, b= Kim) e representações das Cucurbit[5, 6 e 8]urilas, vistas de cima (DEMETS, 2007).

A formação de compostos de inclusão ocorre essencialmente por quatro fatores. O primeiro são as interações solvofóbicas, uma vez que o interior das cavidades é hidrofóbico e procura acomodar espécies com a mesma natureza. O segundo são as interações do tipo íon-dipolo que são responsáveis pela formação de complexos entre cátions e as carbonilas glicolurílicas. O terceiro fator são as ligações de hidrogênio, responsáveis pela formação de adutos pelos opérculos dos cavitandos. O último fator, que determina a seletividade por tamanho, são as dimensões dos portais das cucurbiturilas.

A Tabela 1 apresenta as dimensões das principais CB[n] e algumas de suas propriedades físicas.

Tabela 1: Dimensões e algumas propriedades físicas das cucurbiturilas.

CB[n]	Ø Opérculo/Å	Ø Interno/Å	Volume Å ³	T(°C) decomp.	Solub. em H ₂ O/mM
CB [5]	2,4	4,4	82	> 420	20-30
CB [6]	3,9	5,8	164	425	0,018
CB [7]	5,4	7,3	279	370	20-30
CB [8]	6,9	8,8	479	> 420	< 0,01

Observa-se que, as cucurbiturilas por serem estruturas regulares, apresentam uma boa estabilidade térmica, decompondo-se acima de 400 °C. Dentre as cucurbiturilas apresentadas na Tabela 1, podemos destacar a CB[7] (figura 6), que apresenta maior solubilidade em água e também um diâmetro interno que favorece a formação de complexos de inclusão com moléculas maiores que apresentam em suas estruturas anéis aromáticos, sejam derivados de naftalenos ou fluoróforos grandes.

Além da CB[n] melhorar a solubilidade de substâncias lipofílicas, existem estudos que utilizam esses compostos como sistemas de liberação de fármacos (KEMP et al., 2007).

Figura 6: Estrutura da Cucurbiturila [7] (CB[7]) (UZUNOVA et al., 2010).

Estudos recentes mostram o desenvolvimento de sistemas de liberação controlada de medicamentos já aprovados ou aqueles em estágio clínico. Um exemplo desse estudo é a utilização de fármacos anticâncer derivados de platina, que encapsulados em CB[n] tem mostrado um potencial em particular (WHEATE, 2008). A encapsulação de fármacos no interior de uma macromolécula traz dois benefícios. Em primeiro lugar, protege o fármaco da degradação usando o impedimento estérico. Em segundo lugar, a encapsulação pode aumentar a especificidade do fármaco e sua absorção nas células cancerosas, uma vez que essas são porosas, com cavidades de até 1000 nm de diâmetro e que são capazes de prender e reter grandes moléculas de forma mais eficaz do que as células normais (que têm apenas pequenas cavidades) {KRATZ et al., 2008 13 /id}. Além disso, estudos mostram que a liberação de fármacos é ainda mais eficiente, quando são utilizados lipossomas (DRAGOVICH et al., 2006).

Dessa forma, foi proposto neste estudo, a utilização da cucurbiturila CB[7] para formar um complexo de inclusão com a ftalocianina de zinco, que é fármaco fotossensibilizante hidrofóbico muito utilizado na terapia fotodinâmica. De maneira a tornar o sistema mais biocompatível, foi proposto também nanoencapsular o complexo de inclusão em um sistema de liberação controlada, os lipossomas.

7. Sistemas de Liberação Controlada – Lipossomas

Lipossomas são pequenas vesículas esféricas formadas por bicamadas concêntricas de fosfolipídios (Figura 7) que se organizam espontaneamente em meio aquoso. Tais vesículas são consideradas uma excelente forma de sistema de liberação controlada de fármacos ou substâncias biologicamente ativas devido à sua flexibilidade estrutural seja no tamanho, composição e fluidez da bicamada lipídica, como na sua capacidade de incorporar uma variedade de compostos tanto hidrofílicos como hidrofóbicos (TORCHILIN, 2005; VOINEA e SIMIONESCU, 2002; XU, KHAN e BURGESS, 2012).

A composição da bicamada lipídica é um fator de grande importância na preparação dos lipossomas e obtenção de preparações estáveis. A escolha dos componentes da bicamada pode determinar a fluidez ou rigidez da mesma e ainda proporcionar carga. Por exemplo, a utilização de fosfolipídios saturados como a dipalmitoilfosfatidilcolina gera uma estrutura rígida, enquanto que a fosfatidilcolina com insaturações derivadas de fontes naturais, como gema de ovo ou soja, promove maior fluidez da membrana.

Figura 7: Passos para a formação dos lipossomas: estrutura do fosfolípido, da bicamada lipídica e do lipossoma (LIRA, Mariane Cajubá de Britto. Complexo de inclusão ácido úsnico: β -ciclodextrina: Preparação, Caracterização e Nanoencapsulação em lipossomas. 2007. 67f. (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Pernambuco).

Algumas preparações contêm lipídios com carga negativa como fosfatidilserina ou fosfatidilglicerol; por outro lado, outras preparações contêm lipídios com carga positiva, como, por exemplo, a estearilamina. A presença de carga nos lipossomas é importante para aumentar a estabilidade, pois promove a repulsão entre as vesículas evitando uma possível fusão entre elas, o que levaria à precipitação e instabilidade das formulações (WONGSAGONSUP et al., 2005). O colesterol, outro componente do lipossoma, melhora a fluidez da bicamada lipídica e a estabilidade dos lipossomas na presença de fluidos biológicos como sangue (VEMURI e RHODES, 1995).

O uso de formulações lipossomais como sistema de liberação de fármacos, é viável clinicamente por serem tipicamente feitos de moléculas lipídicas de origem natural, biodegradável e não tóxica. Os lipossomas podem proteger o fármaco da degradação enzimática, possibilitam o aumento da concentração de droga no sítio alvo e podem ser utilizados como excipientes não tóxicos para a solubilização de fármacos hidrofóbicos como as ftalocianinas, além de prolongar o tempo do fármaco na

circulação, permitindo um possível direcionamento para sítios específicos de células ou órgãos (TORCHILIN, 2005).

Alguns problemas relacionados aos lipossomas têm sido a rápida liberação no sangue, devido à adsorção de proteínas do plasma com a membrana fosfolipídica, e o reconhecimento e a captação dos lipossomas pelo sistema fagocítico mononuclear. A habilidade dos lipossomas para penetrar nos tecidos doentes está diretamente correlacionada com o seu tamanho. Lipossomas grandes são rapidamente removidos da circulação por macrófagos e não se obtém significantes níveis nos outros tecidos do corpo, enquanto que lipossomas pequenos (lipossomas em escala nanométrica – SUV – Small Unilamellar Vesicles) demoram um pouco mais para serem reconhecidos e fagocitados, aumentando a probabilidade dos mesmos de penetrarem os tecidos.

Diversos estudos têm relatado a aplicação de fármacos fotossensibilizadores em formulação lipossomal no tratamento de neoplasias malignas na terapia fotodinâmica, sendo observada maior eficiência fototóxica, bem como redução de toxicidade cutânea e aumento de seletividade tumoral (DADASHZADEH et al., 2010; LONGO et al., 2009).

8. Fluidos Magnéticos

Fluidos magnéticos (FM) são sistemas coloidais magnéticos nos quais o disperso é constituído de nanopartículas magnéticas (NPMs) funcionalizadas por uma camada molecular estabilizante e o dispersante é um solvente orgânico ou inorgânico. A camada molecular estabilizante adsorvida na superfície da nanopartícula, com espessura tipicamente entre 1 e 4 nm, tanto pode ser de natureza inorgânica, como

orgânica (MORAIS et al., 2001). O fluido dispersante, por sua vez, tanto pode ser orgânico (óleo), como inorgânico (água).

A característica mais importante de um FM é a sua estabilidade coloidal, ou seja, a propriedade das NPMs de permanecerem em suspensão na forma de entidades isoladas, evitando a aglomeração das nanopartículas e subsequente precipitação. A estabilidade coloidal do FM decorre de um equilíbrio muito delicado das interações atrativas e repulsivas entre as nanopartículas.

Como os FM são insolúveis em água e não adequados para o uso clínico, devem ser quimicamente transformados em colóides, o que pode ser obtido através do recobrimento das partículas com um material biologicamente ativo, sem alterar, entretanto, as suas propriedades magnéticas e possibilitando a sua utilização. Para haver estabilidade, a superfície da partícula magnética deve ser modificada para que se torne biocompatível (FMBs). A biocompatibilidade é alcançada desde que os FM sejam biodegradáveis, hemocompatíveis e não-tóxicos ao organismo. Além disso, as partículas magnéticas devem atravessar a barreira endotelial, evitar a fagocitose e se acumular especificamente nos tecidos alvo, sem causar danos às células normais.

Outra estratégia para se conseguir FMBs estáveis em soluções fisiológicas e, também, para aumentar a eficiência e a seletividade de incorporação destas partículas magnéticas pelos tecidos tumorais, se baseia no desenvolvimento dos chamados magnetolipossomas (KÜCKELHAUS et al., 2004). Os magnetolipossomas são lipossomas que contêm partículas magnéticas encapsuladas na região do núcleo da bicamada lipídica (Figura 8).

Figura 8: Representação esquemática de um magnetolipossoma, com o núcleo (região preta) constituído por uma partícula magnética encapsulada pela bicamada fosfolipídica (OLIVEIRA, Daniela Manfrim. Estudos sinérgicos de fármacos fotossensibilizadores utilizados na Terapia Fotodinâmica e fluidos magnéticos utilizados em Hipertermia celular. 2006. 162f. Tese (Doutorado em Química) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo).

No sistema proposto neste estudo, um FS, a zinco ftalocianina, e um FM a base de NPMs de citrato, foram utilizados como fármacos anticancerígenos sobre células da linhagem de melanoma murino B16-F10, uma vez que os dois compostos têm sido postulados como candidatos promissores ao tratamento do câncer, com mecanismo de atuação independente ou em ação sinérgica (PARK et al., 2012).

9. Hipertermia

A Hipertermia (HPT), assim como a TFD, tem sido considerada um método promissor para o tratamento de neoplasias que quando utilizada corretamente, apresenta efeitos colaterais mínimos em contraste com as terapias convencionais. A sua utilização é baseada no fato de as células tumorais serem menos resistentes a aumentos de temperatura se comparadas com as células normais circunvizinhas (YANASE et al., 1998).

Atualmente, a HPT é aplicada, na maioria das vezes, como uma terapia complementar junto a outros tratamentos, sendo que estudos experimentais mostraram que a combinação de tratamentos, induz a potencialização dos efeitos no tocante à regressão tumoral (PRIMO et al., 2008; RODRIGUES et al., 2009).

O mecanismo preciso pelo qual ocorre a citotoxicidade causada pela aplicação de calor ainda permanece indefinido, no entanto, estudos mostraram que a HPT causa uma desaceleração significativa na multiplicação de células neoplásicas e morte celular simultânea através do mecanismo de apoptose (BARNI et al., 2006).

Para que a HPT seja eficiente é necessária a utilização de mediadores de aquecimento adicionais ou sistemas de aplicação de aquecimento para concentrar o campo elétrico em um tecido específico. Uma vez que a célula esteja associada à partículas magnéticas, pode-se fazer com que estas partículas, pela ação de um campo magnético de corrente alternada de alta frequência, comecem a vibrar. Essa vibração das partículas magnéticas dissipará o calor nas células associadas, provocando sua lise e morte. Este processo, conhecido como magnetotermocitólise - morte celular por calor gerado magneticamente – leva à destruição específica da célula alvo, sem afetar as células dos tecidos vizinhos. Sendo assim, a magnetotermocitólise é uma técnica pouco invasiva que, ao contrário do laser infravermelho, das microondas e da HPT por ultrassom, impedem o aquecimento desnecessário nos tecidos saudáveis, pois somente as nanopartículas magnéticas absorvem o campo magnético.

Os fluidos magnéticos biocompatíveis (FMBs) são os principais sistemas utilizados no desenvolvimento da magnetotermocitólise.

II. OBJETIVOS

Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho se fundamenta em, primeiramente, padronizar a preparação do complexo de inclusão entre o fármaco fotossensibilizante (ZnPc) e a β -Ciclodextrina. Estudar a formação do complexo entre a ZnPc e a Cucurbiturila[7] e nanoencapsular o complexo em sistemas lipossomais tornando-os biocompatíveis, na ausência e na presença de fluido magnético biocompatível (FMB) a base de nanopartículas magnéticas de citrato.

Objetivos específicos

- 1) Padronizar a preparação do complexo de inclusão, utilizando a β -Ciclodextrina e a Ftalocianina de zinco;
- 2) Preparar e caracterizar por meio de métodos físico-químicos o complexo de inclusão formado por Cucurbiturila[7] e Ftalocianina de zinco (CB[7]:ZnPc);
- 3) Preparar e caracterizar por meio de métodos físico-químicos as formulações lipossomais, através do tamanho, do índice de polidispersividade (IPd), do potencial zeta (ζ) e da eficiência de encapsulação;
- 4) Comparação entre o complexo livre e o mesmo encapsulado em lipossoma de maneira a estudar o lipossoma como um veículo de liberação de fármacos;
- 5) Avaliação do efeito citotóxico fotodinâmico e/ou hipertérmico das formulações lipossomais na ausência ou presença de luz e/ou campo magnético em linhagem neoplásica de melanoma murino B16-F10.

III. PARTE EXPERIMENTAL

1. Materiais

Ftalocianina de zinco (ZnPc, 97%) e estearilamina (98%) foram compradas da Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, EUA. Fosfatidilcolina de ovo e colesterol foram obtidos da Avanti Polar Lipids (Alabama, EUA). A Cucurbiturila (CB[7]), sintetizada foi cedida pelo Prof. Dr. Grégoire Jean-François Demets do Departamento de Química da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, com o qual realizamos um projeto de colaboração.

Os solventes de grau analítico relacionados a seguir foram utilizados sem tratamento prévio: Metanol (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, EUA), Etanol (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, EUA) e Clorofórmio (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha).

Os estudos de citotoxicidade foram realizados com a linhagem de melanoma B16-F10 (American Type Culture Collection, ATCC). Esse tipo de célula neoplásica é obtido originalmente de ratos C57BL/6JD/D. A indução desse tipo de neoplasma (melanoma cutâneo) é feita pela injeção de metilcolantreno na cavidade torácica de ratos. A remoção do fluido presente nesta cavidade é feita após dois dias, e a subsequente transfusão para outros animais garante a proliferação deste tipo de células.

Para os estudos biológicos foram utilizados os seguintes materiais: fosfato de potássio monobásico (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, EUA), fosfato de sódio dibásico (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, EUA), cloreto de sódio (Sigma-Aldrich

Co., St. Louis, MO, EUA), cloreto de potássio (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, EUA), bicarbonato de sódio (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, EUA), HEPES (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, EUA). Meio de cultura RPMI 1640 (Gibco, Invitrogen Co., Grand Island NY, USA), anfotericina B (Cultilab®, Campinas, Brasil), antibiótico – penicilina/estreptomicina (Cultilab®, Campinas, Brasil), tripsina-EDTA (Gibco, Invitrogen Co., Grand Island NY, USA) e soro fetal bovino inativado estéril (Gibco, Invitrogen Co., Grand Island NY, USA). O soro fetal bovino (SFB) apresenta, em sua composição básica, insulina, hormônios e vários outros fatores de crescimento. A solução estoque foi aquecida a 56°C para inativação das enzimas, e, em seguida, alíquotas de volumes fixos de 10,0 mL foram conservadas no freezer a -20°C até sua utilização.

Foi utilizado nos estudos fotobiológicos o protocolo de contagem e avaliação da viabilidade celular com o 3[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-brometo difenil tetrazolium (MTT, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, EUA) e o corante azul de tripan (Gibco, Invitrogen Co., Grand Island NY, USA).

O fluido magnético (FM), constituído por nanopartículas de citrato, utilizado neste trabalho foi sintetizado no laboratório da Profa. Dra. Emília Celma de Oliveira Lima (Instituto de Química-UFGO) e caracterizado no laboratório do Prof. Dr. Paulo César de Moraes (Instituto de Física-UNB), com os quais realizamos um projeto de colaboração.

2. Preparações

A solução salina tamponada de fosfato (PBS), pH = 7,4 foi preparada pela mistura de diferentes volumes de soluções de fosfato de sódio monobásico 10 mM e fosfato de sódio dibásico 10 mM em água ultrapura. A estas soluções foram adicionadas 1,37 mM de NaCl e 2,7 mM KCl, resultando numa solução salina tamponada de fosfato (PBS) isotônica.

As soluções estoques de ftalocianina de zinco (ZnPc) foram preparadas em uma mistura de DMSO/DMF (1:1) armazenadas por um período não superior a duas semanas, na ausência de luz, a - 20°C.

Todas as formulações lipossomais foram preparadas pelo método de hidratação do filme lipídico, conforme descritas no item 4.6 da Seção III e armazenadas na ausência total de luz a temperatura ambiente.

As concentrações finais da solução de ZnPc nas soluções utilizadas nos estudos, foram determinadas espectrofotometricamente, utilizando-se o coeficiente de extinção molar em 666 nm ($\epsilon = 2,3 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) em etanol.

Para o cultivo da linhagem B16-F10 foi utilizado o meio RPMI 1640, constituído de uma mistura de sais enriquecidos com aminoácidos, vitaminas e outros componentes essenciais para o crescimento celular, constituindo uma solução nutritiva. O meio RPMI 1640 foi adquirido na forma desidratada e preparado em 1,0 L de água ultrapura, pela adição do conteúdo do envelope, acrescido de 2,2 g de bicarbonato de sódio, 2,4 g de tampão HEPES. Em seguida, foi filtrado, utilizando-se uma membrana de 0,22 μm em um sistema de filtração autoclavável da Corning e por

fim foi ajustado seu pH em 7,0. Posteriormente a esse meio foi adicionado 10% de soro fetal bovino, penicilina (100 UI.mL^{-1}), estreptomicina ($100 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$) e anfotericina B ($2,5 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$), para obtenção do meio completo.

A solução de azul de tripan foi preparada na concentração estoque de 0,4%, utilizando-se como solvente o tampão PBS (pH = 7,4). Tal solução foi filtrada utilizando-se uma membrana de $0,22 \text{ } \mu\text{m}$ e conservada sob refrigeração em temperatura de $2-8^{\circ}\text{C}$.

Todas as soluções aquosas foram preparadas com água ultrapura, obtida através do sistema de água Direct-Q 3 (Sistema de purificação de água –Millipore), com filtração em membrana de porosidade $0,2 \text{ } \mu\text{m}$ de diâmetro, pressão máxima de operação em 50% psi ($3,4 \text{ Kg/cm}^2$) e resistividade de $18 \text{ m}\Omega$.

3. Aparelhagem

Nos estudos espectrofotométricos foram utilizados os espectrofotômetros de absorção UV/visível modelo Lambda 20 da Perkin Elmer e U3000 da Hitachi e os espectrofluorímetros modelo Fluorog 3 da Spex e F4500 da Hitachi, todos com controle de temperatura e agitação.

Na análise de ressonância magnética nuclear foi utilizado o espectrômetro Bruker Avance DRX-500 (RMN ^1H , 500 MHz). As análises foram realizadas no Laboratório de Ressonância Magnética do Departamento de Química da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto.

Na calorimetria exploratória diferencial foi utilizado o equipamento DSC-50 thermal analyser (Shimadzu, Japan). Esse estudo foi feito no laboratório do Prof. Dr. Luis Alexandre Pedro de Freitas do Departamento de Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto.

As análises de Raios-X das amostras na forma de pó foram realizadas no equipamento modelo D5005 da Siemens.

Nos estudos do tamanho das partículas foi utilizado o equipamento Zetasizer Nano system ZS da Malvern-UK, o qual possui um laser de He-Ne de 4 mW que opera no comprimento de onda de 633 nm, permitindo realizar medidas não invasivas por “backscatter optics” (NIBS). Possui a capacidade de determinar tamanho de partículas no intervalo de 2nm a 3 µm. As medidas foram realizadas num ângulo de detecção de 90° e a posição da medida na cubeta foi automaticamente determinada pelo software do equipamento.

A preparação das suspensões lipossomais foi feita pelo método de extrusão por meio de membranas de polycarbonato (Nucleopore®, Costar, Cambridge, MA) com poros variados sob atmosfera inerte de nitrogênio e pressão positiva de 30 Kf/cm².

Na determinação da eficiência de encapsulação foram utilizados eppendorfs com filtros de 10.000 Daltons (Microcon®) e centrífuga tipo Eppendorf (Centrifuge 5810 R, Hamburg, Alemanha), na velocidade de 10.000 rpm por 1 h a 4°C.

Os trabalhos rotineiros com culturas celulares foram realizados em sala asséptica utilizando capelas de fluxo laminar modelo Pachane 400 (Pachane) e modelo Airstem Esco Class II BSC, esterilizada com luz germicida e fluxo contínuo de ar. As culturas celulares foram estabelecidas em incubadora da Forma Scientific modelo

3130 com controle digital de injeção de CO₂ (5%) e temperatura de 37°C. Toda vidraria foi previamente esterilizada em autoclave da Termotron modelo Clear 2001 de dois ciclos a 120°C por 30 minutos. O material plástico foi esterilizado previamente por óxido de etileno realizado junto ao setor de esterilização do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – HC/ FMRP/ USP.

Para os ensaios biológicos de fototoxicidade em célula da linhagem B16-F10 utilizou-se o sistema laser de diodo Eagle da Quantum Tech, operando no comprimento de onda de emissão em 675 nm acoplado a uma fibra óptica operando em torno de 600 mW de potência, com tempos de irradiação ajustados de maneira a obter densidades de energias entre 0,5 e 5,0 J.cm⁻². Para os ensaios biológicos com a aplicação do campo magnético foi utilizado um aparelho portátil, desenvolvido pelo Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Genética e Morfologia da Universidade de Brasília (UNB), operando a 1MHz com amplitude de campo de 40 Oe.

Os estudos de viabilidade celular foram determinados utilizando-se um leitor espectrofotométrico para protocolos de ELISA, modelo Safira² da TECAN Group (Grödig, Áustria).

Foram utilizados também: microscópio invertido CK2 Olympus (para análise de forma, tamanho e crescimento de cultura), microscópio convencional axiovert 40 CFL da Zeiss, balança eletrônica A-200 DS (Denver Instrument Company), sonificador modelo Branson 1510 (Branson Ultrasonics Corporation, Eagle Road, Danbury, USA) e pHmetro modelo QX-1500 (Qualxtron).

4. Métodos

4.1 Metodologia para quantificação de ZnPc por espectrofotometria

Inicialmente foi preciso desenvolver um método analítico para quantificar a ftalocianina de zinco incorporada no complexo de inclusão e nas formulações lipossomais.

A partir de uma solução estoque de ZnPc ($200 \mu\text{g.mL}^{-1}$) em DMF/DMSO, foram realizadas sucessivas diluições para 2,0; 1,0; 0,5; 0,25; 0,125; 0,0625 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ do FS em etanol. A solução estoque foi preparada pesando uma massa de ftalocianina de zinco, que foi adicionada em 1,0 mL de DMF/ DMSO (1:1) e submetida à sonicação até completa solubilização. Sabendo que a absorvidade molar da ftalocianina de zinco é de $\epsilon = 2,3 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, através de um espectro de absorção foi possível calcular a concentração final utilizando a lei de Lambert-Beer. Os espectros de absorção foram traçados num intervalo de 300 a 800 nm, utilizando como branco o etanol. Para todas as análises foram usadas células de quartzo de quatro faces (10 mm).

Desta forma, foi possível obter uma curva padrão de ZnPc, plotando-se o gráfico de intensidade de absorção *versus* a concentração do fármaco fotossensibilizante. As concentrações da ZnPc foram determinadas por extrapolação, utilizando-se a equação obtida por regressão linear da curva padrão.

4.2 Determinação do coeficiente de partição (o/a) do fármaco fotossensibilizante (ZnPc)

A hidrofobicidade de um fármaco é um fator a ser avaliado, uma vez que a sua atividade está diretamente relacionada aos processos de absorção e distribuição, do mesmo no meio biológico alvo. Para que os fármacos atuem é necessário que se dissolvam, atravessem as membranas biológicas e alcancem os seus sítios de ação. O coeficiente de partição de um FS constitui a característica principal do mesmo a ser considerada no estudo da sua interação com as membranas celulares, uma vez que a permeabilidade de uma molécula através das membranas celulares pode ser estimada pelo seu coeficiente de partição; quanto maior a lipofilicidade da molécula, maior é o seu coeficiente de partição e mais rápida será sua difusão através das membranas (TAVARES, 2004).

O parâmetro que expressa a hidrofobicidade de um fármaco é o coeficiente de partição (Log P). O coeficiente de partição pode ser definido como sendo a razão entre as concentrações que se estabelecem nas condições de equilíbrio de uma substância química, quando dissolvida em um sistema constituído por uma fase orgânica e uma fase aquosa. Nesse estudo foi utilizado o sistema 1-octanol/ tampão fosfato pH 7,4, considerado o sistema preferencial para a determinação do coeficiente de partição, uma vez que o 1-octanol possui uma ampla capacidade de dissolução, é quimicamente estável e não volátil (PARKER e STANBRO, 1982).

Foram preparadas soluções de ZnPc na concentração de $10,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ num volume de 3,0 ml de tampão fosfato (pH=7,4). Em seguida, adicionou-se igual volume de 1-

octanol. A mistura foi agitada por meio de um sonificador modelo Branson 1510 (Branson Ultrasonics Corporation, Eagle Road, Danbury, USA) durante 1 hora. Após esse período, as misturas foram colocadas em repouso para ocorrer a separação das fases.

A concentração de ZnPc na fase orgânica e na fase aquosa foi quantificada antes e após a separação das fases, com auxílio de uma micropipeta (Corning, LAMBDA™ 100-1000 µL) e o valor do coeficiente de partição foi determinado de acordo com a equação (TAVARES, 2004):

$$P = [\text{fase orgânica}]/[\text{fase aquosa}] \quad (\text{Equação 1})$$

Em que P (ou também log P) é o coeficiente de partição do composto analisado; [fase orgânica] a concentração do composto na fase orgânica nas condições de equilíbrio; [fase aquosa] a concentração do FS na fase aquosa nas condições de equilíbrio.

4.3 Preparação do complexo de inclusão com a β-ciclodextrina

Primeiramente, utilizamos a preparação do complexo de inclusão entre a β-Ciclodextrina (β-CD) e a ftalocianina de zinco como uma forma de padronizar a formação do complexo de inclusão pelo método de Co-evaporação.

O complexo de inclusão foi inicialmente preparado na concentração de 250 µM e com um volume de 50 mL de água e etanol, totalizando 100 mL de solução. A solução foi inicialmente aquecida a 40°C por 30 minutos e permaneceu sob agitação constante a 25°C durante 24 horas. A seguir, a solução era rotaevaporada a 40°C e 100

rpm, contudo, essa etapa desprendia um grande tempo e além disso, o rendimento da preparação era baixo, sendo necessário otimizar o sistema. Para isso, foi necessário alterarmos as variáveis da preparação, o complexo passou a ser preparado na concentração de 500 μM e com volume de 30 mL de água e etanol, totalizando 60 mL de solução. Além disso, a solução passou a ser rotaevaporada a 40°C e 100 rpm, para eliminação do etanol e liofilizada, para a eliminação da água.

4.4 Preparação dos complexos de inclusão com a cucurbiturila[7]

Sabe-se que a Cucurbiturila tem a tendência de formar preferencialmente complexos na proporção (1:1) ou (1:2) (UZUNOVA et al., 2010). A partir desta informação, um complexo de inclusão foi preparado nas duas proporções pelo método de co-evaporação, seguido por liofilização, método otimizado com a β -CD, como descrito no item 4.3 da Seção III, onde a cucurbiturila[7] e o fármaco fotossensibilizante (ftalocianina de zinco) foram solubilizados em uma mistura (1:1) de água etanol, ambos na concentração de 500 μM . A solução foi inicialmente aquecida a 40°C por 30 minutos e permaneceu sob agitação constante a 25°C durante 24 horas, com o auxílio de um agitador magnético e um banho termostaticável. Em seguida foi rota-evaporada (Rotovapor® BÜCHI, Switzerland) a 40°C e 100 rpm, para retirada do solvente. Após este processo a mistura foi congelada e a água retirada pelo processo de liofilização (Labconco, Freeze Dry System / LYPH LOCK 4.5, Missouri, USA) a - 45°C e 0.1 mPa. (TEIXEIRA et al., 2003; ZINGONE e RUBESSA, 2005).

4.5 Caracterização físico-química dos complexos de inclusão

A caracterização físico-química do complexo de inclusão foi feita por ressonância magnética nuclear (RMN), calorimetria diferencial exploratória (DSC) e difração de raios-X em pó (XDR), para as duas proporções de complexos. O emprego destas técnicas se baseia na comparação dos resultados das substâncias puras e do complexo.

Nos espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio os deslocamentos químicos (δ) estão relatados em parte por milhão (ppm) em relação ao tetrametilsilano (TMS), utilizado como padrão interno. Os sinais foram atribuídos nomeando-se de acordo com a seguinte legenda: s = singleto e m = multipletto.

Na calorimetria exploratória diferencial as amostras foram analisadas em panelas de alumínio herméticas (TA Instruments) fechadas e para cada análise foram utilizados 5 mg de material. As análises foram realizadas aquecendo a amostra com uma taxa de aquecimento de 10°C/min, no intervalo de temperatura entre 150 e 450°C, ou seja, num intervalo acima da temperatura de fusão dos componentes, sob fluxo de N₂ (50 mL.min⁻¹).

Nas análises de Raios-X as amostras na forma de pó foram analisadas em um tubo selado de Cu (radiação K(alfa) de 1,5406 Å com o ângulo 2 θ variando entre 5 e 40° com uma velocidade de varredura de 0,025 graus por segundo.

4.6. Simulação molecular do complexo de inclusão CB[7]:ZnPc

O cálculo da estrutura molecular do complexo de inclusão foi realizado pelo Prof. Dr. Luís Gustavo Dias do Departamento de Química da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto.

As estruturas de CB[7] e ZnPc foram inicialmente desenhadas com os programas Chems sketch e VegaZZ. Na sequência as moléculas, isoladamente, tiveram suas geometrias de equilíbrio encontradas por métodos quânticos baseados em Teoria Funcional da Densidade (Density Functional Theory, DFT). O complexo foi montado já partindo das geometrias otimizadas do CB[7] e ZnPc. As geometrias foram então otimizadas usando novamente métodos quânticos baseados em DFT e o programa Jmol (An Open Science Project) que auxiliou na visualização do complexo e também permitiu observar alterações nas distâncias entre as moléculas antes e após a formação do complexo de inclusão. Os cálculos foram realizados no vácuo (ausência de solventes).

4.7 Preparação dos lipossomas

Para os estudos iniciais foram preparados quatro tipos sistemas lipossomais: o lipossoma vazio (Vazio-Lp), lipossoma contendo a Cucurbiturila[7] (CB[7]-Lp), lipossoma contendo a zinco ftalocianina (ZnPc-Lp) e lipossoma contendo o complexo de inclusão (CB:ZnPc-Lp). Todos foram preparados pelo método de hidratação do filme lipídico (MANOLIKAR e SAWANT, 2003), na concentração de $5 \mu\text{mol.L}^{-1}$ em

relação ao fármaco fotossensibilizante. Nesse método, fosfatidilcolina de ovo, colesterol, estearilamina na proporção fixa de 7:2:1 respectivamente, foram dissolvidos numa mistura de Clorofórmio/ metanol (3:1) a 37°C. A solução foi agitada por 30 min e rotaevaporada a 37°C e 100 rpm para a retirada dos solventes. Em seguida foi feita a hidratação do filme lipídico seco com 10 mL de tampão fosfato (PBS pH 7,4). Os componentes CB[7], ZnPc e o complexo de inclusão foram adicionados na fase orgânica junto com os demais componentes.

Ao término do processo, foi obtido um lipossoma formado por vesículas multilamelares grandes (MLV). Para obtenção de lipossomas em escala nanométrica foi necessário submetê-los à extrusão por meio de membranas de polycarbonato (Nucleopore®, Costar, Cambridge MA) com poros de 1,0 µm, 0,6 µm, 0,4 µm e 0,2 µm, sequencialmente num total de 4 vezes em cada membrana (valor estabelecido como ideal para que todas as vesículas estejam com o mesmo tamanho), sob atmosfera inerte de nitrogênio e pressão positiva de 30 Kf.cm⁻².

4.8 Preparação dos lipossomas magnéticos (Magnetolipossomas)

Para os estudos com o campo magnético, foram preparados lipossomas de fluido magnético (ML) e lipossomas contendo o complexo de inclusão e o fluido magnético (CB:ZnPc-ML). Estes lipossomas foram preparados da mesma forma descrita no item 4.6 da Seção III, com a diferença de que ocorre a adição do fluido magnético após os lipossomas serem submetidos ao processo de extrusão, na concentração de $1,0 \times 10^{15}$ partículas.mL⁻¹, concentração na qual o fluido magnético

(FM) apresenta propriedades magnéticas que oferecem resposta à indução do campo magnético (OLIVEIRA, D. M., 2006).

4.9 Caracterização físico-química dos lipossomas

A caracterização dos lipossomas foi feita pelo medindo-se o diâmetro médio das vesículas, do índice de polidispersão e do potencial zeta pela análise por espalhamento de luz dinâmico (espectroscopia de correlação de fótons, PCS). As análises foram realizadas em ângulo de varredura de 173° e após diluição de 20 µL das formulações em 2 mL de água ultrapura. As determinações foram feitas em triplicatas a 25°C.

5. Estudo de estabilidade das formulações lipossomais

Para que as formulações lipossomais mantenham suas propriedades originais por um intervalo de tempo, foram realizados estudos de estabilidade.

A estabilidade das formulações lipossomais foi investigada num período de 3 meses avaliando o tamanho das vesículas e o potencial zeta. As análises foram realizadas após diluição de 20 µL das formulações em 2 mL de água ultrapura. As determinações foram feitas em triplicatas a 25°C.

5.1 Determinação da eficiência de encapsulação e do rendimento da preparação lipossomal

Após ser submetido ao processo de extrusão foi avaliada também a eficiência de encapsulação do fármaco fotossensibilizante no sistema lipossomal contendo o complexo de inclusão (CB:ZnPc-Lp), uma vez que essa formulação é o foco do nosso estudo. A determinação foi feita pelo método de ultracentrifugação e ultrafiltração, no qual isola a fase aquosa externa, sendo possível quantificar a fração livre da ZnPc presente na formulação lipossomal (BUBOLTZ e FEIGENSON, 1999). O volume de 200 µL da preparação lipossomal foi centrifugada a 10.000 rpm, a 4°C por 1 hora em ependorf microcon® com filtro de 10.000 Daltons. Após a centrifugação, a concentração de ZnPc foi determinada por espectrofotometria Uv-visível (λ = 300-800 nm, pico máximo em 673 nm). Para a determinação do rendimento da preparação lipossomal foi necessário também digerir as membranas utilizadas na extrusão para determinar quantidade de FS retido nas membranas. A eficiência de encapsulação e o rendimento da preparação lipossomal foram determinados como descrito a seguir:

$$EE (\%) = \frac{CT - CL}{CT} \times 100 \quad \text{Equação 2}$$

$$\text{Rendimento} = \frac{\text{CF}}{\text{CT}} \times 100 \quad \text{Equação 3}$$

Onde:

EE = Eficiência de encapsulação

CF = Concentração final

CT = Concentração teórica

CL = Concentração livre

5.2. Estudos envolvendo linhagem de células neoplásicas

5.2.1 Crescimento e manutenção da cultura de células da linhagem neoplásica de melanoma murino (B16-F10)

As matrizes congeladas de células B16-F10 ($0,5 \times 10^6$ células.mL⁻¹) (Figura 9) estocadas em nitrogênio líquido foram descongeladas a 37°C e adicionadas a um frasco de cultura (Corning, estéril, de 75 cm²) contendo 10,0 mL do meio completo (RPMI 1640). As células de melanoma B16-F10 foram incubadas a 37°C com 5,0 % de CO₂ durante 48 h. Após este período, realizou-se a primeira repicagem de células. Como as células crescem aderidas no frasco celular, foi necessária a utilização de uma solução de tripsina-EDTA (0,05%) para soltá-las, sendo necessário o contato com esta solução durante 3 minutos. Assim, o meio contendo as células foi adicionado em um tubo cônico do tipo Falcon e centrifugado a 25°C com rotação constante de 1200 rpm durante 10 min. O sobrenadante foi descartado e o sedimento suspenso com 10,0 ml de meio completo; as células foram, então, distribuídas em frascos de culturas

celulares de 75 cm². A troca de meio destas células foi realizada sempre que necessário.

No processo de congelamento as células foram lavadas com o meio RPMI e posteriormente congeladas em tubos criogênicos contendo uma solução composta de soro fetal bovino e DMSO (80/20) numa proporção final de 1:1

Figura 9: Ilustração da linhagem neoplásica de melanoma murino B16-F10 na fase de confluência (5 dias após o descongelamento).

5.2.2 Controle da integridade da membrana celular

Quando se trabalha com cultura de células, costuma-se analisar a integridade da membrana celular como controle de viabilidade em função do crescimento, a fim de avaliar o número médio de células presente na cultura. Este teste utiliza o corante Azul de Tripan e é chamado teste de exclusão do Azul de Tripan. Inicialmente foi feita uma mistura de 100 µL da solução de Azul de Tripan 0,4% e 100 µL da suspensão de células em meio de cultura. A seguir, esta solução foi agitada e 10 µL foram

adicionados na câmara de Neubauer. A contagem dentro da câmara foi realizada em microscópio no campo claro na objetiva de aumento de 10X, sendo contadas apenas as células viáveis (não coradas em azul). Para todos os ensaios *in vitro* de citotoxicidade foi padronizada uma concentração de 1×10^5 células/poço, as quais foram semeadas em placas de cultura de 24 poços.

5.2.3 Ensaio de viabilidade celular – MTT

Este método se baseia no uso do corante (3[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-brometo difenil tetrazólico) e é apropriado para se determinar espectrofotometricamente número total de células como função da atividade mitocondrial intacta, ou seja, células vivas.

Soluções de MTT dissolvidas em meio de cultura ou em soluções salinas, balanceadas na ausência de indicador vermelho de fenol, são de cor amarelada. A dehidrogenase mitocondrial das células viáveis atua sobre o anel tetrazolium, produzindo cristais de formazan de cor púrpura, os quais são insolúveis em solução aquosa. Os cristais são então dissolvidos em isopropanol acidificado. Um aumento ou diminuição no número de células resulta em uma mudança concomitante na quantidade do formazan formado, indicando assim o grau de citotoxicidade (MOSMANN, 1983). Após 24 h do estudo em células, o meio foi retirado e foram adicionados 80 μL da solução de MTT (5 mg.mL^{-1}) e 420 μL de meio RPMI (sem Phenol Red e sem soro bovino fetal) a cada poço. As células foram re-incubadas por 4 h, sendo por fim retirado e adicionado 500 μL de isopropanol para a solubilização do formazan obtido.

O teste foi finalizado através de medidas espectrofotométricas basal, da absorbância no comprimento de onda de 560 nm, descontando-se a absorbância de fundo a 690 nm (FRESHNEY, 1986). Estas medidas foram determinadas utilizando-se um leitor espectrofotométrico de Microplacas modelo Safira² da TECAN Group (Grödig, Áustria).

Os experimentos foram realizados em triplicatas e para o tratamento estatístico utilizou-se o Prism® Software (Version 3.0). A análise da significância estatística entre o controle e os outros grupos foi determinada por unilateral ANOVA seguido pelo teste-t Tukey para comparações múltiplas. Os resultados obtidos representam as médias $\pm$ SEM (n=3).

5.2.4 Estudos de citotoxicidade

Após contagem e plaqueamento das células, as placas foram incubadas por 24 h em condições padrão de cultivo para permitir adesão e recobrimento celular da área dos poços de cultura. Ao atingirem confluência, o meio foi retirado e as células foram lavadas com PBS e em seguida, foram adicionadas as amostras contendo as soluções a serem testadas. As soluções foram preparadas em meio RPMI contendo 3% de soro fetal bovino. Depois de 3 h de incubação, as soluções foram retiradas e foi adicionado meio RPMI completo. Após 24 h realizou-se o ensaio padrão de viabilidade celular MTT (3[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-brometodifenil tetrazolium), como descrito no item 5.2.3 da Seção III.

5.2.5 Determinação da citotoxicidade da Ftalocianina de Zinco (ZnPc), da Cucurbiturila (CB[7]) e do complexo de inclusão (CB[7]:ZnPc) na ausência de luz e campo magnético

Inicialmente foi determinada a citotoxicidade dos compostos ZnPc, CB[7] e CB[7]:ZnPc na ausência de luz e de campo magnético. Por meio deste estudo variou-se a concentração de cada componente com o objetivo de determinar a concentração de trabalho.

As soluções de cucurbiturila[7] e do complexo de inclusão foram preparadas por meio de diluição seriada a partir de uma solução estoque em PBS de $2,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$. As soluções de ZnPc foram preparadas a partir de uma solução estoque (DMF:DMSO) também por meio de diluição seriada. A determinação foi feita intervalo de concentração na faixa de 2,0 e $0,125 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

As células foram incubadas com as soluções de ZnPc, CB[7] e CB[7]:ZnPc em meio RPMI 3%. Depois de 3 h de incubação a 37°C em uma estufa de CO_2 , as soluções foram retiradas e foi adicionado meio RPMI 10%. Após 24 h foi realizado o ensaio de MTT para a avaliação da integridade celular, conforme descrito no item 5.2.3 da Seção III.

Os dados encontrados através do teste de MTT foram analisados utilizando-se o teste t de Students (ANOVA, $P < 0,05$).

5.2.6 Determinação da citotoxicidade das formulações lipossomais na ausência de luz e campo magnético

Da mesma forma que no item 5.2.5 da Seção III, foi feito um estudo de modo a avaliar a citotoxicidade das formulações lipossomais na ausência de estímulo luminoso e de campo magnético. Este estudo foi feito com as formulações (Vazio-Lp), (CB[7]-Lp), (ZnPc-Lp), (CB:ZnPc-Lp). As soluções foram preparadas em meio RPMI 3% nas concentrações citadas anteriormente, as células foram incubadas com as amostras por um período de 3 h a 37°C em uma estufa de CO₂. Depois de 24 h foi realizado o ensaio de MTT para a avaliação da integridade celular, conforme descrito no item 5.2.3 da Seção III.

Os dados encontrados através do teste de MTT foram analisados utilizando-se o teste t de Students (ANOVA, $P < 0,05$).

5.2.7 Determinação da citotoxicidade dos lipossomas magnéticos na ausência de luz e do campo magnético

Foi avaliada também a citotoxicidade dos lipossomas magnéticos (ML) e (CB:ZnPC-ML) na ausência de estímulo luminoso e de campo magnético. As soluções foram preparadas em meio RPMI 3% e contendo 1×10^{15} partículas.mL⁻¹ de fluido magnético. As células foram incubadas com as amostras por um período de 3 h a 37°C em uma estufa de CO₂. Depois de 24 h foi realizado o ensaio de MTT para a avaliação da integridade celular, conforme descrito no item 5.2.3 da Seção III.

Os dados encontrados através do teste de MTT foram analisados utilizando-se o teste t de Students (ANOVA, $P < 0,05$).

5.2.8 Determinação fototoxicidade do complexo livre (CB[7]:ZnPc), do lipossoma contendo o complexo (CB:ZnPc-Lp) e do lipossoma contendo o complexo e o fluido magnético (CB:ZnPc-ML)

No estudo de fototoxicidade, foi avaliado o efeito da luz sob a cultura celular (células B16-F10) na presença do complexo de inclusão livre e dos lipossomas CB:ZnPc-Lp e CB:ZnPc-ML na concentração de $0,25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e 1×10^{15} partículas. mL^{-1} de fluido magnético, preparadas em meio RPMI 3%. Após o período de incubação de 3 h a 37°C em uma estufa de CO_2 , as soluções foram retiradas e foi adicionado PBS. Em seguida, a cultura celular foi submetida a diferentes intensidades de irradiação (de $0,5$ a 5 J.cm^{-2}). Para a irradiação foi utilizado o sistema laser de diodo Eagle da Quantum Tech, no comprimento de onda de emissão em 670 nm acoplado a uma fibra ótica operando no máximo de 600 mW de potência.

Ao término da irradiação, o tampão PBS foi removido e foi adicionado meio RPMI 10%. Após 24 horas foi realizado o ensaio do MTT para a avaliação da viabilidade celular, conforme descrito no item 5.2.3 da Seção III.

Os dados encontrados através do teste de MTT foram analisados utilizando-se o teste t de Students (ANOVA, $P < 0,05$).

5.2.9 Determinação da citotoxicidade dos lipossomas magnéticos na presença de campo magnético

No estudo de citotoxicidade, foi avaliado o efeito do campo magnético sobre a cultura celular (células B16-F10) na presença dos lipossomas ML e CB:ZnPc-ML. Neste experimento, a concentração do FS foi de $0,25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e a do FM de 1×10^{15} partículas.mL⁻¹. As soluções foram preparadas em meio RPMI 3% e incubadas por um intervalo de tempo de 3 h a 37°C em uma estufa de CO₂.

A seguir as soluções foram retiradas, foi adicionado o tampão PBS e a cultura celular foi submetida a um campo magnético, utilizando-se aparelho portátil desenvolvido pelo Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Genética e Morfologia da Universidade de Brasília (UNB), operando a 1MHz com amplitude de campo de 40 Oe, por 3 minutos.

Após a aplicação do campo, o tampão PBS foi removido e adicionou-se meio RPMI 10%. As células foram levadas à estufa de CO₂ por um período de 24 h. Após este intervalo, foi realizado o ensaio do MTT para a avaliação da viabilidade celular, conforme descrito no item 5.2.3 da Seção III.

Os dados encontrados através do teste de MTT foram analisados utilizando-se o teste t de Students (ANOVA, $P < 0,05$).

5.3 Determinação da toxicidade do lipossoma contendo o complexo de inclusão (CB:ZnPc-ML) na presença de luz e de campo magnético

Nesse estudo, foi avaliado o efeito da luz e do campo magnético sob a cultura celular (células B16-F10) na presença do lipossoma (CB:ZnPc-ML). Neste experimento, a concentração do FS foi de $0,25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e a do FM de 1×10^{15} partículas.mL⁻¹, e as células com aproximadamente 1×10^6 células.mL⁻¹ foram incubadas por um intervalo de tempo de 3 h a 37°C em uma estufa de CO₂. A seguir a solução contendo o FS foi retirada e foi adicionado tampão PBS.

A cultura celular foi então submetida a uma intensidade de irradiação de num intervalo de 0,5 a 2,0 J.cm⁻² e em seguida, a mesma cultura celular foi submetida a um campo magnético de 1 MHz de frequência por 3 minutos.

Após a aplicação do campo, o tampão PBS foi removido e adicionou-se meio RPMI completo. As células foram levadas à estufa de CO₂ por um período de 24 h. Após este intervalo, foi realizado o ensaio do MTT para a avaliação da viabilidade celular, conforme descrito no item 5.2.3 da Seção III.

Os dados encontrados através do teste de MTT foram analisados utilizando-se o teste t de Students (ANOVA, $P < 0,05$).

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O objetivo deste trabalho foi utilizar ação combinada da Terapia Fotodinâmica (TFD) com a Hipertermia celular (HPT) para potencializar o efeito terapêutico no tratamento de células neoplásicas. Para viabilizar este estudo foi necessário o desenvolvimento de uma partícula mista contendo agentes ativos tanto na TFD quanto no processo de HPT ou magnetotermocitólise.

O agente fotoativo na TFD escolhido inicialmente foi a ftalocianina de zinco (ZnPc) considerado como um FS clássico. Como este fármaco possui uma elevada hidrofobicidade, foi proposta a formação de um complexo de inclusão entre o FS (ZnPc) e a Cucurbiturila[7], afim de minimizar os problemas relacionados a este comportamento.

O sistema de liberação utilizado nesse estudo foi o lipossoma, a base de L- α -fosfatidilcolina de ovo, preparados pelo método de hidratação do filme lipídico descrito no item 4.7 da Seção III, com a finalidade de obter formulações com um caráter biocompatível.

Sendo assim, foi realizada inicialmente formação e a caracterização do complexo de inclusão através de métodos físico-químicos clássicos. Estudos iniciais de toxicidade e fototoxicidade foram feitos de maneira a comparar o complexo livre e o mesmo nanoencapsulado em lipossomas. Em seguida, foram realizados estudos com o lipossoma contendo o complexo de inclusão e o fluido magnético na presença de luz e/ou campo magnético.

1. Metodologia para quantificação da ZnPc por espectrofotometria

Durante o desenvolvimento do método analítico para a quantificação da ZnPc, foi considerado o tipo de solvente orgânico usado para as análises. O etanol demonstrou a um bom resultado, uma vez que foi capaz de solubilizar os componentes da formulação e não apresentou qualquer influência sobre o máximo de absorção da ZnPc.

A TFD tem encontrado vários obstáculos, sobretudo a competição entre as bandas de absorção de luz do pigmento melanina (máxima em 530 nm) e o fármaco fotossensibilizante. Compostos capazes de absorver luz em comprimentos de ondas maiores (> 650 nm) apresentam-se como fármacos promissores aplicados à TFD contra as lesões cutâneas de células pigmentadas. Sendo assim, as ftalocianinas que possuem bandas de absorção na faixa entre 670 e 680 nm apresentam-se como moléculas promissoras na terapêutica contra o melanoma, pois terão uma menor competição com a absorção de luz pela melanina, além de estar associada a maior penetração tecidual da luz (MAMOON et al., 2009; NUNES, SGUILLA e TEDESCO, 2004).

O espectro de absorção das ftalocianinas apresenta duas bandas principais posicionadas na região violeta ou ultravioleta do espectro (300-350 nm) e na região da luz visível (600-700 nm). Essas bandas são conhecidas como banda de Soret e banda-Q, respectivamente (TEDESCO et al., 2003) (Figura 10).

Como pode ser visto na Figura 10, o espectro da ZnPc em etanol revelou um máximo de absorção na banda-Q do espectro em 666 nm. Essa banda está localizada dentro da janela terapêutica (600-800 nm), região máxima de penetração tecidual,

reforçando desta forma a ideia de que este fármaco pode ser muito útil para o estudo *in vitro* (OLIVEIRA et al., 2006).

Figura 10: Espectro de absorção UV-visível da ZnPc em etanol na concentração de $30 \mu\text{g.mL}^{-1}$, intervalo de comprimento de onda entre 300 e 800 nm.

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

As análises de regressão linear foram realizadas por meio da construção de uma curva padrão relacionando a absorbância *versus* concentração de ZnPc (Figura 11). Com base na análise gráfica é possível verificar a linearidade e calcular um fator de conversão de valores de absorbância em concentração. Como se pode observar pela Figura 11, foi detectada uma linearidade satisfatória para o método espectrofotométrico no intervalo de concentração entre $0,0625$ - $2,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de ZnPc em etanol. O ajuste por mínimos quadrados revelou um excelente coeficiente de correlação ($r = 0,9998$) e a equação linear foi: $\text{absorbância} = 0,5629 \times [\text{ZnPc, concentração em } \mu\text{g.mL}^{-1}] - 0,0151$.

Figura 11: Curva padrão da ZnPc ($0,0625\text{--}2,0\ \mu\text{g.mL}^{-1}$) em etanol relacionando a absorção em função da concentração do FS em 666 nm, em que a equação linear obtida foi $y = 0,5629 X - 0,0151$.

A curva padrão da ZnPc foi uma ferramenta muito importante e bastante utilizada neste trabalho, uma vez que por meio dela foi possível quantificar o fármaco fotossensibilizante durante todo o estudo, principalmente nas formulações lipossomais utilizadas nos experimentos *in vitro*.

2. Determinação do coeficiente de partição do fármaco fotossensibilizante (ZnPc)

Após o desenvolvimento do método de quantificação, foi preciso avaliar a hidrofobicidade da ZnPc, de modo a justificar a formação de um complexo de inclusão com a Cucurbiturila. A hidrofobicidade foi avaliada por meio da determinação do coeficiente de partição do FS em um sistema composto por uma fase orgânica e uma fase aquosa, como descrito no item 4.2 da Seção III.

O valor do coeficiente de partição foi utilizado para se avaliar a lipofilicidade (ou hidrofobicidade) do FS, fornecendo informações sobre quais seriam as possíveis

interações do fármaco com o sistema biológico, como a membrana celular. As substâncias polares, hidrossolúveis, se concentram na fase aquosa e as apolares, lipossolúveis, na fase orgânica. O experimento foi feito em triplicata e está apresentado na Tabela 2.

Tabela 2: Valores de coeficiente de partição para a ZnPc (sistema 1- octanol/ água).

P = [Orgânica]/[Aquosa]	Log P*
11,2 ± 1,7	1,047 ± 0,065

* Valores ± Desvio Padrão de três determinações.

Observa-se na Tabela 2, que a ZnPc apresentou valores de $P \gg 1$ e consequentemente $\text{Log } P > 0$. Esses dados comprovam que o fármaco em estudo é altamente hidrofóbico, justificando assim a busca de um complexo de inclusão com a CB[7], para seu uso nos estudos biológicos. A hidrofobicidade da ZnPc pôde ser observada visualmente uma vez que, após 1 hora de sonicação, a solução foi colocada em repouso e esse tempo foi suficiente para que o fármaco migrasse totalmente para a fase orgânica, confirmando a extrema hidrofobicidade do fármaco em estudo.

3. Preparação do complexo de inclusão

Comprovada a hidrofobicidade da ZnPc, iniciou-se a formação do complexo de inclusão como descrito no item 4.3 da Seção III. Na literatura existem poucos trabalhos que envolvem a formação de um complexo de inclusão com a CB[7], por

esse motivo, foi preciso primeiramente padronizar o método de preparação com um composto bastante utilizado, a β -ciclodextrina. A CD vem desempenhando um importante papel na Química Medicinal no que diz respeito à tecnologia de liberação controlada de fármacos e existem muitos trabalhos na literatura os quais utilizam as CDs na formação de complexos de inclusão com uma variedade de substâncias.

As alterações feitas no método de preparo do complexo de inclusão, como descrito no item 4.3 da Seção III, aperfeiçoaram o processo e melhoraram o rendimento da preparação. Quando o processo era todo feito apenas por rotaevaporação o complexo final se aderiria todo ao balão fazendo com que o rendimento da preparação fosse baixo, em torno de 25%. Com a adição da liofilização, o rendimento ficou em torno de 60%.

Padronizado o método de preparação, foi possível prosseguir com a formação do complexo de inclusão entre a ZnPc e a CB[7] em duas proporções possíveis 1:1 e 2:1.

A formação do complexo de inclusão se justifica, uma vez que é por meio dessa interação que muitos fármacos têm sua solubilidade aumentada. Para comprovar esse aumento na solubilidade, a mesma massa de ZnPc livre e do complexo de inclusão (CB[7]:ZnPc) foram adicionadas em tampão. Após 5 minutos de sonicação, foi possível observar um aumento na solubilidade da ZnPc presente no complexo de inclusão, quando comparada com a solubilidade da ZnPc livre. Dessa forma, foi possível comprovar que a formação do complexo de inclusão com um composto hidrofóbico, como é o caso da ZnPc, melhora a solubilidade desse fármaco, possibilitando assim, sua utilização nos estudos posteriores.

4. Caracterização físico-química do complexo de inclusão

Após a preparação do complexo de inclusão CB[7]:ZnPc nas proporções 1:1 e 2:1, esses foram caracterização por meio de métodos físico-química.

O complexo de inclusão entre a ZnPc e a CB[7] foi formado através do método de co-evaporação complementado por liofilização, a -45°C e 0.1 mPa, como descrito no item 4.4 na seção III. A caracterização físico-química do complexo de inclusão foi feita por meio da Ressonância Magnética Nuclear (RMN), Calorimetria Diferencial Exploratória (DSC) e Difração de Raios-X (XDR), nos equipamentos descritos no item 3 da Seção III.

4.1 Ressonância magnética nuclear (RMN ^1H)

A Ressonância Magnética Nuclear (RMN) é uma das técnicas mais importantes para a detecção da formação do complexo de inclusão. Essa detecção é feita através das mudanças provocadas nos sinais de próton (^1H) presentes na molécula da cucurbiturila (CB[7]) e da ftalocianina de zinco (ZnPc). Os espectros de RMN da ftalocianina de zinco, da cucurbiturila[7] e do complexo de inclusão (CB[7]:ZnPc), nas proporções de 1:1 e 2:1 se encontram nos anexos I, II, III e IV.

A ftalocianina de zinco é um composto simétrico, constituído por 4 unidades iguais. Essa unidade está apresentada na Figura 12, com os respectivos carbonos que apresentam hidrogênios numerados de 1 a 4. Assim como a ftalocianina, pode-se observar que sua unidade também é simétrica. Por esse motivo, os prótons dos carbonos 1 e 2 possuem o mesmo deslocamento químico, assim como os prótons dos carbonos 3 e 4 (Tabela 3). A integral relativa de cada sinal é 8 e o sinal formado é um singlete (ANEXO I).

Ftalocianina de Zinco

Figura 12: Unidade da molécula da Ftalocianina de Zinco com carbonos que apresentam hidrogênios numerados .

Tabela 3: Dados espectroscópicos do composto Ftalocianina de Zinco.

C	$\delta H(\text{ppm})$	Integral Relativa	Multiplicidade
1	8,29	4H	S
2	8,29	4H	S
3	9,44	4H	S
4	9,44	4H	S

A cucurbiturila[7] também é um composto simétrico, porém constituído por 7 unidades iguais em sua estrutura, o qual se encontra destacada na Figura 13, com seus respectivos carbonos que apresentam hidrogênios numerados de 1 a 4.

Cucurbiturila[7]

Figura 13: Unidade da molécula de Cucurbiturila [7] com carbonos que apresentam hidrogênios numerados.

Observa-se por meio da Figura 13 que a unidade da molécula de cucurbiturila[7] apresenta uma simetria horizontal, fazendo com que os hidrogênios 1 e 2 sejam iguais e também uma simetria vertical (na carbonila), fazendo com que os hidrogênios 3 e 4 também sejam iguais. A integral realtiva para o par de prótons dos carbonos 1 e 2 é 28 e para os prótons dos carbonos 3 e 4 é 14 (Tabela 4), uma vez que os hidrogênios 3 e 4 são provenientes de um carbono CH e os hidrogênios 1 e 2 provenientes de um carbono CH₂ (ANEXO II).

Tabela 4: Dados espectroscópicos do composto Cucurbiturila[7].

C	$\delta H(\text{ppm})$	Integral Relativa	Multiplicidade
1	2,52	14H	S
2	2,52	14H	S
3	2,10	7H	S
4	2,10	7H	S

A análise do RMN da ftalocianina de zinco e da cucurbiturila[7], foi analisada a ressonância magnética nuclear dos complexos nas proporções 1:1 e 2:1 apresentados nos Anexos III e IV, respectivamente. Na Figura 14 podem ser observados os substituintes das moléculas que formam o complexo de inclusão.

Complexo de inclusão CB[7]:ZnPc

Figura 14: Unidades das moléculas da ftalocianina de zinco e da cucurbiturila[7] com os carbonos que apresentam hidrogênios numerados.

Tabela 5: Dados espectroscópicos do complexo de inclusão (1:1).

C	$\delta H(\text{ppm})$	Integral Relativa	Multiplicidade
1	5,40*	14H	S
2	5,65*	14H	S
3	4,20	7H	S
4	4,20	7H	S
5	8,29	4H	S
6	8,29	4H	S
7	9,44	4H	S
8	9,44	4H	S

* podem estar trocados

Na Tabela 5 temos que o complexo de inclusão CB[7]:ZnPc (1:1) apresenta os sinais relativos à CB[7] (prótons 1, 2, 3 e 4) e à ZnPc (prótons 5, 6, 7 e 8). Quando se compara os resultados apresentados na Tabela 5 com os resultados das Tabelas 3 e 4, pode-se observar que os deslocamentos químicos dos hidrogênios da ftalocianina de zinco não sofreram alteração, enquanto que os da cucurbiturila foram alterados. Esse

fato nos mostra que pode estar havendo uma interação entre as moléculas da ZnPc e da CB[7]. Além disso, ocorreu um desdobramento de sinal que levou à separação dos sinais dos hidrogênios 1 e 2, o que evidencia também uma possível interação entre as moléculas que formam o complexo. Uma possível explicação para a formação do complexo é que ocorre a deslocalização dos elétrons do oxigênio da carbonila para o zinco e a deslocalização dos elétrons do nitrogênio para o carbono da carbonila, tornando o nitrogênio positivo, o que desblinda os demais hidrogênios.

Na Tabela 6, apresentamos os valores obtidos na ressonância magnética nuclear do complexo de inclusão na proporção 2:1, apresentado no Anexo IV. Pode-se observar que os valores das integrais demonstram que a complexação não foi de 2:1.

Tabela 6: Dados espectroscópicos do complexo de inclusão na proporção 2:1.

C	$\delta H(\text{ppm})$	Integral Relativa	Multiplicidade
1	5,40*	78H	S
2	5,65*	78H	S
3	4,20	39H	S
4	4,20	39H	S
5	8,29	4H	S
6	8,29	4H	S
7	9,44	4H	S
8	9,44	4H	S

* podem estar trocados

4.2 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

Com a análise de RMN foi possível constatar que o complexo de inclusão entre a ZnPc e a CB[7] está sendo formado na proporção 1:1. A partir desse resultado, foram feitas as análises por meio da Calorimetria Exploratória Diferencial e da Difração de Raios-X para o complexo 1:1 de modo a complementar a informação dada pelo RMN.

Na DSC, mede-se a variação de entalpia que ocorre entre a amostra e a referência durante o processo de aquecimento/resfriamento. Os termogramas são obtidos através do surgimento de picos positivos quando ocorre um processo de absorção de calor, endotérmico (já que o aquecedor da amostra deve dissipar calor para manter a temperatura igual à referência), e de picos negativos no processo de liberação de calor, exotérmico (BERNAL et al., 2002).

Os termogramas da CB[7], da ZnPc e do complexo de inclusão (CB[7]:ZnPc) estão representados na Figura 15. Pode ser observado que o termograma da CB[7] apresenta um pico endotérmico próximo em 400°C, o que está de acordo com a literatura, uma vez que esse composto apresenta ponto de fusão em 370°C. O termograma da ZnPc nos mostra um pico endotérmico entre 250 e 300°C, o que também condiz com a literatura, já que o ponto de fusão da zinco ftalocianina encontra-se neste intervalo de temperatura. No termograma do complexo (CB[7]:ZnPc) pode-se observar que houve o desaparecimento dos picos característicos dos componentes livres indicando uma interação entre ambos. Pode-se observar também que o termograma do complexo acompanha o perfil dos termogramas da CB[7] e da ZnPc.

Figura 15: Curva DSC da Cucurbiturila[7], da Zinco ftalocianina e do complexo de inclusão (CB[7]:ZnPc). As análises foram realizadas utilizando 5 mg de cada composto a uma taxa de aquecimento de 10°C/min, no intervalo de temperatura entre 150 e 450°C.

4.3 Difração de raios-X (XDR)

A análise por difração de raios-X é uma ferramenta clássica na caracterização de complexos, uma vez que, o fenômeno da complexação está frequentemente associado ao aumento no grau de amorfização (redução do grau de cristalinidade) das substâncias envolvidas na formação do complexo no estado sólido (RIBEIRO et al., 2003). Na difração de raios-X foi feita também uma comparação entre os difratogramas das espécies livres com o difratograma do complexo. Desta forma, diferenças nas amostras tratadas, como surgimento ou desaparecimento de picos ou mudanças nas intensidades relativas, constituem indícios de formação do complexo.

No difratograma da ZnPc (Figura 16B) aparecem picos de difração que demonstram um ordenamento estrutural típico de um sólido cristalino, enquanto no

difratograma da CB[7] (Figura 16C) observa-se ausência de picos e comportamento típico de substância amorfa. Para o complexo (Figura 16A), verifica-se que os picos mais intensos da ZnPc se sobressaem sobre o amorfo típico da CB[7] e além disso, ocorrem grandes reduções nas intensidades destes picos. Pode-se observar também que o difratograma do complexo mostrou uma perda do padrão de ordenamento do cristal de ZnPc. Essas alterações evidenciam a formação do complexo de inclusão.

Figura 16: Difratogramas de Raios-X das amostras na forma de pó: (A) CB[7]:ZnPc, (B) ZnPc CB[7], (C) CB[7]. Nessa análise as amostras foram analisadas em um tubo selado de Cu (radiação K(alfa) de 1,5406 Å com o ângulo 2θ variando entre 5 e 40° com uma velocidade de varredura de 0,025 graus por segundo.

5. Simulação molecular do complexo de inclusão CB[7]:ZnPc

Confirmada a formação do complexo de inclusão CB[7]:ZnPc na proporção 1:1, foi proposto realizar um estudo de estrutura molecular por métodos quânticos, de modo a enriquecer os resultados obtidos e ajudar na visualização do complexo formado. Esse estudo foi feito no vácuo (sem solventes), como descrito no item 4.6 da Seção III.

Inicialmente, foram feitos cálculos quânticos das estruturas moleculares de ZnPc e CB[7], antes da complexação (Figuras 17 e 18).

Figura 17: Representação da estrutura molecular da Ftalocianina de Zinco (ZnPc) na forma planar (esquerda) e 3D no formato *ball&stick* (direita).

Figura 18: Representação da estrutura molecular da Cucurbiturila[7] (CB[7]). Formato 3D *ball&stick* está apresentado à direita onde átomos C, H, N e O aparecem como esferas nas cores cinza, branca, azul e vermelho.

Após a obtenção das estruturas isoladas iniciou-se o cálculo do complexo de inclusão CB[7]:ZnPc na proporção 1:1. No vácuo foi possível formar dois tipos de estruturas para o complexo de inclusão (Figuras 19 e 20). Ambas as estruturas são estáveis e mantidas por interações fracas.

Na Figura 20 pode-se observar que uma das configurações possíveis para o complexo de inclusão é a molécula da ZnPc alinhada com a CB[7]. Nessa configuração, o metal zinco se orienta com o oxigênio de uma das carbonilas da CB[7], comprovando o resultado obtido no RMN. Com o auxílio dos programas descritos no item 4.6 da Seção III, foi possível observar inicialmente que a CB[7] sendo uma estrutura simétrica, apresenta a mesma distância entre os oxigênios das carbonilas. Quando ocorre esse tipo de complexação essa distância é alterada, fazendo com que a estrutura da CB[7] se abra para que ocorra a interação com a ZnPc, e além dessa abertura a estrutura sofre ainda uma distorção.

Figura 19: Simulação molecular do complexo de inclusão (1:1), onde a ZnPc e a CB[7] ficam alinhadas.

Outra configuração possível para o complexo de inclusão é uma parte da molécula de ZnPc no interior da CB[7] (Figura 20). O metal de coordenação, zinco, torna rígida a estrutura central da ftalocianina, sendo possível apenas a flexibilidade das fenilas. Nessa estrutura, pode-se observar que uma das fenilas da ZnPc se dobra para o interior da CB[7], de tal forma que o metal zinco se oriente com o oxigênio de uma das carbonilas, comprovando mais uma vez o resultado obtido no RMN. Além disso, nessa configuração, a distância entre os oxigênios das carbonilas também foi alterada, de modo que a estrutura da CB[7] se abre para que parte da molécula de ZnPc entre. Mas nesse caso, a estrutura da CB[7] apenas se abriu e não foi observada nenhuma distorção.

Figura 20: Simulação molecular do complexo de inclusão (1:1), onde a ZnPc é uma tampa para a CB[7].

Dessa forma, os cálculos serviram como uma ferramenta complementar aos resultados obtidos na caracterização do complexo de inclusão, nos mostrando que a formação do complexo CB[7]:ZnPc ocorre e que essa formação pode ser de duas formas distintas.

6. Caracterização físico-química dos lipossomas

Com o complexo de inclusão formado e caracterizado, os estudos prosseguiram com o objetivo de tornar o complexo biocompatível, possibilitando sua utilização em meio biológico.

O sistema de carregamento de fármacos mais comumente empregado é o lipossomal (MAFTOUM-COSTA et al., 2008; MISRA , ACHARYA e SAHOO, 2010). Antes da utilização dos lipossomas como sistemas de liberação é importante a utilização de métodos que avaliem aspectos como tamanho das vesículas, distribuição de tamanho, estabilidade e taxa de encapsulação de fármacos, pois estes influenciam diretamente no comportamento dos lipossomas em meio biológico (LASIC, 1998).

Neste estudo foram preparados seis tipos de formulações lipossomais, por meio do método de hidratação do filme lipídico descrito nos itens 4.7 e 4.8 da Seção III. Para verificar os parâmetros físico-químicos das formulações quanto à homogeneidade do tamanho das vesículas formadas e possíveis influências em suas propriedades físico-químicas, foram realizadas a análise do tamanho das vesículas, potencial zeta e determinação do índice de polidispersão (IPd).

Os resultados da Tabela 7 indicam a formação de lipossomas em tamanho nanométrico preparados pelo método de hidratação do filme lipídico. Os lipossomas apresentam uma distribuição de tamanho médio com uma pequena variação entre as diferentes preparações lipossomais. Uma possível explicação para essa variação é que a ZnPc e a CB[7] livres abrem o lipossoma provocando um aumento no tamanho das vesículas, enquanto que no complexo de inclusão, acontece uma ligação entre as moléculas de ZnPc e de CB[7] que se ordenam de maneira que o lipossoma contendo o complexo de inclusão tenha um tamanho menor que o lipossoma contendo a CB[7] e a ZnPc.

Tabela 7: Tamanho das vesículas, índice de polidispersão e potencial zeta para as formulações lipossomais.

Lipossoma	Tamanho (nm)*	IPd*	Potencial zeta (ζ) (mV)*
Vazio Lp	154,1 $\pm$ 4,1	0,09 $\pm$ 0,04	+54,6 $\pm$ 1,6
CB[7]-Lp	169,1 $\pm$ 3,8	0,13 $\pm$ 0,02	+59,9 $\pm$ 1,8
ZnPc-Lp	160,6 $\pm$ 2,1	0,08 $\pm$ 0,01	+55,3 $\pm$ 2,0
CB:ZnPc-Lp	156,4 $\pm$ 3,2	0,12 $\pm$ 0,03	+48,8 $\pm$ 3,3
ML	185,1 $\pm$ 2,3	0,13 $\pm$ 0,02	----
CB:ZnPc-ML	208,9 $\pm$ 1,7	0,11 $\pm$ 0,04	----

* Valores $\pm$ Desvio Padrão de três determinações.

O fluido magnético (FM) age como um mediador de aquecimento adicional para concentrar o campo elétrico em um tecido específico. Uma vez associada às partículas magnéticas, as células por ação de um campo magnético começam a vibrar, provocando sua lise e morte. Dessa forma, esse lipossoma nos permite a ação combinada da TFD e da HPT, projetadas para trabalhar sinergicamente, de modo que leve à uma considerável regressão tumoral após mínimas doses de dissipação de calor e fotossensitização da luz. Sendo assim, foi necessária a preparação de um lipossoma contendo somente o FM e outro lipossoma contendo o FM e o complexo de inclusão.

Na Tabela 7 observa-se que os lipossomas contendo o fluido magnético apresentam um tamanho maior do que aqueles que não o possuem em sua composição, isso pode ser explicado pelo fato do FM se incorporar no interior do lipossoma, ou seja em sua cavidade interna aquosa, ocasionando o aumento no diâmetro médio das vesículas que o formam.

A polidispersividade é um indicativo da distribuição de tamanho de uma formulação. Como é possível observar na Tabela 7, todas as formulações apresentaram IPd abaixo de 0.15, confirmando a formação de uma formulação monodispersa e homogênea.

De acordo com a Tabela 7 é possível observar também, que as formulações possuem grande carga superficial positiva (potencial zeta), dentro de uma faixa de +48.8 a +59.9 mV. Esse potencial reflete a carga efetiva das partículas e está relacionada com a repulsão eletrostática existente entre elas e assim, com a estabilidade da suspensão. Pode-se dizer que uma formulação é estável quando apresenta valores de potencial zeta menores que -30 mV e maiores que +30 mV, pois

esses valores geram uma força de repulsão entre as partículas suficiente para superar a tendência natural à agregação das vesículas (WONGSAGONSUP et al., 2005). Sendo assim, pode-se dizer que os valores dos parâmetros físico-químicos estão em concordância com aqueles desejáveis para a obtenção de uma formulação ideal para o estudo.

7. Estudo de estabilidade das formulações lipossomais

Após a caracterização físico-química das formulações lipossomais, foi preciso avaliar a estabilidade dessas formulações num período de 3 meses como descrito no item 5.0 da Seção III.

A avaliação da estabilidade dos sistemas de liberação é um estudo essencial, pois leva em consideração a interação química entre o fármaco veiculado e os componentes da formulação, que podem sofrer modificações com o tempo de estocagem cuja formulação venha a ser submetida.

Este estudo foi realizado avaliando as medidas de tamanho das vesículas e potencial zeta, das diferentes formulações lipossomais, durante 3 meses consecutivos (Figuras 21 e 22). Para complementar esse resultado, foi avaliada também as medidas de tamanho das vesículas das formulações lipossomais contendo o fluido magnético (Figura 23). Nesse estudo, não foi necessária a medida do potencial zeta, uma vez que a formulação não foi alterada e a adição do FM não interfere na carga das vesículas. As formulações permaneceram em temperatura ambiente (25°C) e as análises foram realizadas em triplicatas.

Figura 21: Estudo de estabilidade avaliando o diâmetro hidrodinâmico das vesículas, sendo (■) lipossoma vazio, (■) lipossoma contendo CB[7], (■) lipossoma contendo ZnPc e (□) lipossoma contendo complexo de inclusão.

Figura 22: Estudo de estabilidade avaliando o potencial zeta das vesículas, sendo (■) lipossoma vazio, (■) lipossoma contendo CB[7], (■) lipossoma contendo ZnPc e (□) lipossoma contendo complexo de inclusão.

Figura 23: Estudo de estabilidade avaliando o diâmetro hidrodinâmico das vesículas, sendo (■) lipossoma contendo o fluido magnético (ML) e (■) lipossoma contendo o complexo de inclusão e o fluido magnético (CB:ZnPc:ML).

Pelos resultados obtidos, conclui-se que as formulações lipossomais utilizadas neste estudo, sofreram variações mínimas nos tamanhos das vesículas ao longo do tempo analisado. Esse resultado juntamente com os demais obtidos na caracterização físico-química demonstra que as formulações lipossomais, independentemente dos componentes, são estáveis e podem ser utilizadas nos estudos *in vitro* posteriores.

8. Determinação da eficiência de encapsulação do complexo de inclusão em lipossoma e do rendimento da preparação lipossomal

Com as formulações lipossomais devidamente caracterizadas e mantidas estáveis por um período de 3 meses foi preciso determinar a eficiência de encapsulação do lipossoma contendo o complexo de inclusão, que dentre as formulações lipossomais foi o foco deste estudo.

A determinação da eficiência de encapsulação nos lipossomas é um dos aspectos que deve ser avaliado no momento de desenvolvimento destes sistemas, pois a localização do fármaco nos sistemas de liberação influencia desde suas propriedades físico-químicas até o seu perfil de liberação e biodisponibilidade. Os resultados obtidos pelas análises do conteúdo de ZnPc no filtrado e nas membranas de extrusão estão na Tabela 8 e os cálculos foram realizados a partir das equações 2 e 3 descritas no item 5.1 da Seção III.

Tabela 8: Perda de ZnPc durante o processo de preparação do lipossoma contendo o complexo CB:ZnPc-Lp.

Concentração Teórica (CT) ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)	Quantidade na Membrana ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)	Quantidade Filtrado (CL) ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)	Concentração Final (CF) ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)	Rendimento da Preparação (%)
5,0	1,4	0	3,6	72,0

Pode ser visto na Tabela 8 que a quantidade de ZnPc não encapsulada é retirada durante o processo de extrusão, ficando retida nas membranas. A partir dos valores obtidos, pode-se dizer que o método de preparação dos lipossomas é eficiente, uma vez que o rendimento da preparação é de 72%. Após o processo de extrusão foi determinada a eficiência de encapsulação do lipossoma pelo método de ultracentrifugação e ultrafiltração. Como não foi encontrado fármaco no filtrado, conclui-se que a quantidade de fármaco presente na formulação esteja incorporada no lipossoma, garantindo uma eficiência de encapsulação de 100%.

9. Determinação da toxicidade da ftalocianina de zinco (ZnPc), da cucurbiturila (CB[7]) e do complexo de inclusão (CB[7]:ZnPc) (1:1) na ausência de luz

Após a caracterização do lipossoma contendo o complexo de inclusão, foram iniciados os estudos *in vitro* utilizando a linhagem celular B16-F10. Primeiramente, foi necessário avaliar a toxicidade, de maneira separada, de todas as variáveis envolvidas neste estudo.

Um dos critérios a ser apresentado por um bom fármaco fotossensibilizante é a de que o mesmo tenha uma baixa toxicidade no escuro, além de acumular preferencialmente nos tecidos tumorais (DE ROSA e CRUTCHLEY, 2002).

O tempo de incubação utilizado na avaliação da toxicidade celular das variáveis livres foi de 3 h, considerando que quando se associa esse complexo ao fármaco ZnPc, devemos nos orientar pelo tempo de incubação determinado pelo composto mais fotossensível (ZnPc), sem que este cause a morte celular no escuro. Neste caso, o tempo de incubação já determinando para a ZnPc lipossomal (OLIVEIRA et al., 2006) foi o utilizado. Diante disto, inicialmente foi feito um estudo variando a concentração de cada componente de modo a determinar a concentração ideal de trabalho. As Figuras 24, 25 e 26 mostram respectivamente a toxicidade da cucurbiturila[7], da ftalocianina de zinco e do complexo de inclusão numa faixa de concentração entre 2,0 e 0,125 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

De acordo com a Figura 24 não se observa valores significativos de toxicidade independente da concentração de CB[7] estudada, uma vez que os valores de viabilidade celular estão acima de 80%. Pode-se dizer assim que a CB[7] apresenta um caráter biocompatível.

Figura 24: Ensaio *in vitro* de citotoxicidade da CB[7] livre em células B16-F10 após 3 h de incubação. A significância estatística das diferenças entre as concentrações de CB[7] foi determinada pelo teste de análise de variância *One-way* ANOVA seguido do pós-teste Newman-Keuls para múltiplas comparações ($p > 0,05$). Cada SEM representa o desvio padrão ($\pm$ SD) para $n = 3$.

No estudo de avaliação de toxicidade do fármaco ZnPc (Figura 25), pode-se observar que entre as concentrações de 0,125 e 0,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ não há toxicidade significativa (valores de viabilidade celular próximo de 100%). Nas concentrações acima de 0,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ a ZnPc livre apresentou uma leve toxicidade, com valores de viabilidade celular próximo de 80%. Nesse caso, pode-se dizer que assim como a ZnPc, a CB[7] livre também apresenta um caráter biocompatível.

Figura 25: Ensaio *in vitro* de citotoxicidade da ZnPc livre em células B16-F10 após 3 h de incubação. A significância estatística das diferenças entre as concentrações de ZnPc foi determinada pelo teste de análise de variância *One-way* ANOVA seguido do pós-teste Newman-Keuls para múltiplas comparações (* $p < 0,01$). Cada SEM representa o desvio padrão ($\pm$ SD) para $n = 3$.

Figura 26: Ensaio *in vitro* de citotoxicidade do complexo livre CB:ZnPc (1:1) em células B16-F10 após 3 h de incubação. A significância estatística das diferenças entre as concentrações do complexo foi determinada pelo teste de análise de variância *One-way* ANOVA seguido do pós-teste Newman-Keuls para múltiplas comparações (* $p < 0,001$). Cada SEM representa o desvio padrão ($\pm$ SD) para $n = 3$.

Comparando os resultados obtidos no estudo de toxicidade das variáveis livres, foi possível observar uma maior incidência de células viáveis na presença da CB[7] e da ZnPc, no intervalo de concentração analisado. Com o complexo CB[7]:ZnPc (Figura 26) observou-se que houve uma significativa diminuição na porcentagem de células viáveis, quando utilizou-se concentrações maiores que $0,25 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Dessa forma, pode-se dizer que está havendo algum tipo de interação entre a ZnPc e a CB[7] que provoca o aumento da citotoxicidade, inviabilizando a utilização do complexo em altas concentrações. Diante disso, determinou-se a concentração utilizada nos experimentos, $0,25 \mu\text{g.mL}^{-1}$. A viabilidade celular na concentração de $0,25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para ZnPc, CB[7] e complexo CB[7]:ZnPc são respectivamente 97,5% ($\pm 1,5$), 90,1% ($\pm 2,8$) e 80,3% ($\pm 0,7$) em relação ao controle.

10. Determinação da toxicidade das formulações lipossomais na ausência de luz

Da mesma forma que foi realizado o estudo de toxicidade para as variáveis livres, foi avaliada também a toxicidade das formulações lipossomais na concentração estabelecida de $0,25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (Figura 27), como descrito no item anterior.

Nos resultados da Figura 27 são apresentadas as viabilidades celulares em função das diferentes formulações lipossomais. A viabilidade celular foi de 97,9% ($\pm 1,6$), 92,9% ($\pm 2,2$), 96,6% ($\pm 2,4$) e 84,9% ($\pm 1,6$) em relação ao controle, para o lipossoma vazio, lipossoma contendo CB[7], lipossoma contendo ZnPc e lipossoma contendo o complexo de inclusão, respectivamente. Como pode ser observado, as formulações lipossomais não apresentaram efeito tóxico na ausência da luz e na

concentração de $0,25 \mu\text{g.mL}^{-1}$, viabilizando assim a utilização dessas formulações nos estudo *in vitro*.

Figura 27: Ensaio *in vitro* de citotoxicidade do Lipossoma vazio (Vazio-Lp), do lipossoma contendo a CB[7]-Lp, do lipossoma contendo o fármaco (ZnPc-Lp) e do lipossoma contendo complexo de inclusão (CB:ZnPc-Lp) na concentração de $0,25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ em células B16-F10 após 3 h de incubação e CT é o controle. A significância estatística foi determinada pelo teste de análise de variância *One-way* ANOVA seguido do pós-teste Newman-Keuls para múltiplas comparações (* $p < 0,01$). Cada SEM representa o desvio padrão ($\pm$ SD) para $n = 3$.

11. Determinação da toxicidade dos lipossomas magnéticos na ausência do estímulo luminoso e do campo magnético

Antes de avaliar o efeito do campo magnético e da luz de maneira sinérgica no lipossoma contendo FM e o FS, foi preciso avaliar a toxicidade dos lipossomas magnéticos na ausência dessas variáveis.

A concentração do complexo utilizada foi de $0,25 \mu\text{g.mL}^{-1}$, mantendo a concentração estabelecida anteriormente, e a do fluido magnético foi de $1,0 \times 10^{15}$

partículas.mL⁻¹. A toxicidade dos lipossomas magnéticos em células B16-F10 está apresentada na Figura 28.

Figura 28: Ensaio *in vitro* de citotoxicidade do lipossoma de fluido magnético (ML), do lipossoma com o complexo e o fluido magnético (CB:ZnPc-ML) na concentração de 0,25 µg.mL⁻¹ e 1,0 x 10¹⁵ partículas.mL⁻¹ em células B16-F10 após 3 horas de incubação, onde CT é o controle. A significância estatística foi determinada pelo teste de análise de variância *One-way* ANOVA seguido do pós-teste Newman-Keuls para múltiplas comparações ($p < 0,01$). Cada SEM representa o desvio padrão ($\pm$ SD) para $n = 3$.

Na Figura 28 pode-se observar que da mesma forma que ocorreu com as formulações sem fluido magnético, a presença desse na formulação não provocou alterações significativas na porcentagem de células viáveis (viabilidade de 91,1% ($\pm$ 0,54), 89,4% ($\pm$ 1,1), respectivamente) em relação ao controle. Esse estudo preliminar mostra o importante potencial de aplicação do lipossoma CB:ZnPc-ML na utilização da TFD por apresentar baixa toxicidade no escuro.

12. Determinação fototoxicidade do complexo livre (CB[7]:ZnPc), do lipossoma contendo o complexo (CB:ZnPc-Lp) do lipossoma contendo o complexo e o fluido magnético (CB:ZnPc-ML)

No estudo de fototoxicidade foi avaliada, primeiramente, a toxicidade do complexo livre e do lipossoma contendo o complexo (CB:ZnPc-Lp) frente a várias doses de irradiação utilizando a linhagem celular B16-F10, de modo a avaliar o lipossoma como um sistema carreador de fármaco. Os resultados estão apresentados na forma de gráfico de porcentagem da viabilidade celular em função da dose de laser (Figuras 29, 30 e 31).

Figura 29: Ensaio *in vitro* de fototoxicidade complexo livre em células B16-F10 após ser submetido a diferentes doses de irradiação. A significância estatística foi determinada pelo teste de análise de variância *One-way* ANOVA seguido do pós-teste Newman-Keuls para múltiplas comparações (* $p < 0,001$). Cada SEM representa o desvio padrão ($\pm$ SD) para $n = 3$.

Nos resultados apresentados na Figura 29 observa-se que não houve mudança significativa na porcentagem de células viáveis quando o complexo livre foi submetido

a diferentes doses de luz (viabilidade de 49,4% ($\pm 0,5$), 48,6% ($\pm 0,5$), 51,6% ($\pm 1,1$), 43,7% ($\pm 1,9$) e 52,2% ($\pm 1,3$) respectivamente). Esse resultado mostra que independente da dose de luz utilizada, a viabilidade celular ficou em torno de 50%, 30% a mais de morte celular, comparado com o resultado obtido com o complexo livre na ausência de luz (Figura 27).

Para avaliar o sistema lipossomal como um sistema eficiente de carregamento de fármacos, o lipossoma contendo o complexo de inclusão (CB:ZnPc-Lp) foi submetido a diferentes doses de luz, de maneira a se comparar com os resultados obtidos com o complexo livre na mesmas condições.

Figura 30: Ensaio *in vitro* de fototoxicidade do lipossoma contendo o complexo (CB:ZnPc-Lp) em células B16-F10 após ser submetido a diferentes doses de irradiação. A significância estatística foi determinada pelo teste de análise de variância *One-way* ANOVA seguido do pós-teste Newman-Keuls para múltiplas comparações (* $p < 0,001$). Cada SEM representa o desvio padrão ($\pm$ SD) para $n = 3$.

Na Figura 30 observa-se que o lipossoma CB:ZnPc-Lp frente a diferentes doses de luz apresentou resultados melhores do que aqueles com o complexo livre. Os resultados apresentados mostraram diferenças significativas na porcentagem de células

viáveis quando se utilizou doses de irradiação acima de 2 J.cm^{-2} . Na dose de 3 J.cm^{-2} ocorreu a morte de aproximadamente 70% das células em estudo ($28,7\% \pm 2,7$) e com a dose de 5 J.cm^{-2} ocorreu morte de 91% das células ($8,8\% \pm 1,4$), em relação ao controle.

O maior desafio da TFD é superar a solubilidade em água da maioria das moléculas fotossensíveis e sua tendência em agregar sob condições fisiológicas. De fato, devido à própria estrutura química da ZnPc, a agregação em meio aquoso é resultado da tendência do esqueleto hidrofóbico da molécula em evitar o contato com a água, levando a uma forte interação hidrofóbica entre as moléculas de ZnPc, a qual afetaria suas propriedades fotofísicas (diminuição de $^1\text{O}_2$) e, consequentemente, fotobiológicas. Portanto, a menor atividade fotodinâmica da ZnPc livre comparada com a ftalocianina nanoencapsulada seria principalmente devido à agregação dessa molécula livre, o que limitaria sua capacidade em absorver a irradiação e, assim, diminuiria o rendimento quântico em oxigênio singlete, sendo considerada a principal espécie reativa de oxigênio capaz de destruir as células neoplásicas (PASZKO et al., 2011).

Depois de ter comprovado a eficiência do lipossoma como um sistema de liberação de fármacos, iniciaram-se os estudos com o lipossoma CB:ZnPc-ML. Primeiramente, avaliou-se a fototoxicidade do lipossoma CB:ZnPc-ML num intervalo menor de dose de luz (de $0,5$ a $2,0 \text{ J.cm}^{-2}$) (Figura 31), de modo que seja possível, posteriormente, ser observada as diferenças quando utilizados a luz e o campo magnético juntos.

Figura 31: Ensaio *in vitro* de fototoxicidade do lipossoma CB:ZnPc-ML em células B16-F10 após ser submetido a diferentes doses de irradiação. A significância estatística foi determinada pelo teste de análise de variância *One-way* ANOVA seguido do pós-teste Newman-Keuls para múltiplas comparações (* $p < 0,05$). Cada SEM representa o desvio padrão ($\pm$ SD) para $n = 3$.

Na figura 31 pode ser observado que o lipossoma CB:ZnPc-ML apresenta o mesmo comportamento que o lipossoma sem o fluido (CB:ZnPc-Lp), quanto maior a dose de luz, menor a porcentagem de células viáveis. A viabilidade foi de 78,2% ($\pm 1,3$); 65,7% ($\pm 0,5$) e 30,9% ($\pm 0,06$) para as doses de luz 0,5, 1,0 e 2,0 J.cm⁻², respectivamente. Dessa forma, tem-se que o lipossoma CB:ZnPc-ML além de apresentar baixa toxicidade no escuro, possui um efeito dose dependente, ou seja, quanto maior a dose de energia, maior o seu efeito tóxico. Para constatar o potencial deste lipossoma na ação sinérgica da TFD e da HPT, ainda foi preciso avaliar sua ação sob a influência do campo magnético.

13. Determinação da toxicidade do lipossoma contendo o complexo de inclusão e o fluido magnético na presença de campo magnético

Como foi avaliado o efeito da luz sobre o lipossoma contendo o complexo de inclusão e o FM (CB:ZnPc-ML), foi preciso avaliar também sua toxicidade na presença somente do campo magnético. Neste estudo foi avaliado o efeito do campo magnético nas células incubadas com os lipossomas que apresentam o fluido magnético em sua composição, utilizando-se um aparelho portátil, operando a 1MHz com amplitude de campo de 40 Oe, como descrito no item 5.2.9 da Seção III.

O tempo de 3 minutos de aplicação de campo magnético foi previamente definido por Guedes e colaboradores (GUEDES et al., 2005), uma vez que a aplicação de até 3 minutos de campo magnético, não provoca alterações significativas de processos inflamatórios e nem efeitos genotóxicos na ausência de FM.

A Figura 32 nos mostra os resultados da toxicidade com aplicação de campo magnético nas células incubadas apenas com os lipossomas que contém o fluido magnético (ML e CB:ZnPc-ML).

Comparando os resultados das Figuras 28 e 32, foi possível observar uma diminuição significativa na viabilidade das células B16-F10, quando as formulações lipossomais contendo o FM foram submetidos somente ao campo magnético.

O lipossoma CB:ZnPc-ML apresentou uma viabilidade celular de 89,4% ($\pm 1,1$) na ausência de luz e uma viabilidade de 64,8% ($\pm 1,1$) na presença do campo magnético, ou seja, o campo magnético provocou uma diminuição na porcentagem de células viáveis, o que condiz com o seu propósito.

Figura 32: Ensaio *in vitro* de citotoxicidade dos lipossomas ML e CB:ZnPc-ML na presença do campo magnético em células B16-F10, onde CT é o controle. A significância estatística foi determinada pelo teste de análise de variância *One-way* ANOVA seguido do pós-teste Newman-Keuls para múltiplas comparações (* $p < 0,001$). Cada SEM representa o desvio padrão ($\pm$ SD) para $n = 3$.

Esses resultados, juntamente com os estudos de toxicidade e fototoxicidade, formam um importante indicativo da potencialidade do lipossoma CB:ZnPc-ML para atuar de maneira sinérgica na TFD e na HPT.

14. Determinação da toxicidade do lipossoma contendo o complexo de inclusão na presença de luz e de campo magnético

O principal objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de um sistema que atuasse sinergicamente envolvendo a combinação da TFD e HPT e que pudesse potencializar os efeitos terapêuticos, provocando assim uma considerável regressão da massa tumoral, se comparado com a utilização de uma destas modalidades terapêuticas separadamente. Para tanto, o estudo da toxicidade *in vitro* frente a utilização de mínimas doses de luz laser e de campo magnético nas células B16-F10, após a incubação com o lipossoma CB:ZnPc-ML foi realizado.

Na Figura 33 estão apresentados os resultados de toxicidade obtidos após irradiação com dose de luz entre 0,5 e 2,0 J.cm⁻² de energia e com a aplicação de 3 minutos de campo magnético. Os resultados estão apresentados na forma de gráfico de porcentagem da viabilidade celular em função da dose de irradiação e aplicação de campo magnético.

Com os resultados obtidos foi possível observar uma significativa diminuição na viabilidade celular após a aplicação da luz laser e de campo magnético sobre as células B16-F10 quando incubadas com o lipossoma CB:ZnPc-ML (13,6% ± 0,2 de células vivas), se comparado com as células incubadas com o lipossoma CB:ZnPc-Lp, na ausência de FM (30,9% ± 0,06 de células viáveis). Esse resultado nos mostra, que as aplicações da luz e do campo magnético em conjunto conseguem ser mais eficazes do que os mesmos aplicados separadamente. Isso pode ser comprovado quando são analisados os resultados obtidos nas Figuras 31 e 32.

Figura 33: Ensaio *in vitro* de fototoxicidade do lipossoma CB:ZnPc-ML com aplicação de luz laser e de campo magnético em células B16-F10, onde CT é o controle. A significância estatística foi determinada pelo teste de análise de variância *One-way* ANOVA seguido do pós-teste Newman-Keuls para múltiplas comparações (* $p < 0,001$). Cada SEM representa o desvio padrão ($\pm$ SD) para $n = 3$.

Este resultado indica claramente que esta nova classe de materiais permite a ação combinada da TFD e da HPT, projetadas para trabalhar sinergicamente, podendo levar a uma considerável regressão do tumor após mínimas doses de dissipação de calor e/ou fotossensitização pela luz.

V. CONCLUSÕES

São recentes os estudos que utilizam a cucurbiturila[7] na formação de complexos de inclusão, por esse motivo, houve a necessidade de padronizar o método de preparação do complexo utilizando a β -ciclodextrina, a qual é bastante utilizada para esta finalidade. Essa padronização nos permitiu estabelecer as condições ideais para a formação do complexo entre a CB[7] e a ZnPc.

Com a caracterização físico-química do complexo de inclusão CB[7]:ZnPc foi possível determinar a proporção na qual o complexo estava sendo formado. A simulação molecular ajudou a visualizar as possíveis configurações de formação do complexo de inclusão. Além disso, foi possível visualizar modificações nas estruturas das moléculas de ZnPc e de CB[7] que possibilitaram uma interação entre elas e consequentemente a formação do complexo de inclusão.

Pelo fato de não sabermos o comportamento ou o possível efeito colateral do complexo de inclusão livre no organismo humano, houve a necessidade de nanoencapsulá-lo em um sistema de liberação já estabelecido, de modo a torná-lo biocompatível. Sendo assim, o uso do lipossoma possibilitou uma interação favorável do complexo em meio biológico, uma vez que esse sistema de liberação se mostrou mais eficaz do que o complexo livre na indução à regressão do tumor com doses mínimas de luz e tempo de aplicação do campo magnético.

Com os resultados obtidos neste estudo, puderam ser observadas características da formulação lipossomal contendo o fármaco fotossensibilizante e o complexo de inclusão (CB:ZnPc-MI), tais como tamanho das vesículas, índice de polidispersão,

potencial zeta e uma baixa toxicidade no escuro, que possibilitaram sua aplicação de maneira sinérgica na PDT e na HPT.

A partir do exposto, pôde-se concluir que a nanotecnologia inserida no contexto da terapia fotodinâmica e da hipertermia celular, mediada por uma formulação lipossomal contendo o complexo de inclusão e o fluido magnético, no tratamento de câncer de pele em modelos experimentais *in vitro* é altamente efetiva, mantendo características desejáveis dessas modalidades terapêuticas.

Este estudo nos possibilitou confirmar a eficiência do complexo de inclusão em solubilizar compostos que apresentam alta hidrofobicidade, como é o caso da ftalocianina de zinco. Dessa forma, assim como a β -ciclodextrina, a cucurbiturila[7] se enquadra como um “drug delivery systems”, podendo ser empregada com sucesso na administração e liberação de fármacos por várias vias e/ou locais de administração, como oral, nasal, oftálmica, pulmonar, dérmica e transdérmica.

VI. 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, **Ca-A Cancer Journal for Clinicians**, v. 61, p. 250-281, 2011.

ALLISON, R. R.; DOWNIE, G. H.; CUENCA, R.; CHILDS, C. J. H.; SIBATA, C. Photosensitizers in clinical PDT, **Photodiagn Photodyn. Therapy**, v. 1, p. 27-42, 2004.

ARUMAINAYAGAM, N.; MOORE, C. M.; AHMED, H. U.; EMBERTON, M. Photodynamic therapy for focal ablation of the prostate, **World Journal of Urology**, v. 28, p. 571-576, 2010.

ATKINS, P.; ELUMALAI, P.; DE PAULA, J. **Atkins Physical Chemistry**, Oxford University Press 2002.

BARBATO, F.; CAPPELLO, B.; LA ROTONDA, M. I.; MIRO, A.; QUAGLIA, F. Diclofenac/beta-cyclodextrin binary systems: A study in solution and in the solid state, **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v. 46, p. 179-185, 2003.

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, 2010.

BARNES, L. D.; GIULIANO, E. A.; OTA, J.; COHN, L. A.; MOORE, C. P. The effect of photodynamic therapy on squamous cell carcinoma in a murine model: Evaluation of time between intralesional injection to laser irradiation, **Veterinary Journal**, v. 180, p. 60-65, 2009.

BARNI, S.; PONTIGGIA, E.; BERTONE, V.; PONTIGGIA, P.; MATHE, G. Analysis of cell proliferation and cell death, during in situ hyperthermic treatment of neoplastic cells: a case report of human non-Hodgkin lymphoma, **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 60, p. 227-232, 2006.

BERNAL, C.; COUTO, A. B.; BREVIGLIERI, S. T.; CAVALHEIRO, E. T. G. Influence of some experimental parameters on the results of differential scanning calorimetry - DSC, **Química Nova**, v. 25, p. 849-855, 2002.

BONNETT, R. Photosensitizers of porphyrin and Phtalocyanine Series for Photodynamic Therapy, **Chemical Society Reviews**, 19-33, 1995.

BUBOLTZ, J. T.; FEIGENSON, G. W. A novel strategy for the preparation of liposomes: Rapid solvent exchange, **Biophysical Journal**, v. 76, p. A59, 1999.

CASTANO, A. P.; DEMIDOVA, T. N.; HAMBLEM, M. R. Mechanisms in photodynamic therapy: part one - photossensitizers, photochemistry and cellular localization, **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 1, p. 279-293, 2004.

CONNORS, K. A. The stability of cyclodextrin complexes in solution, **Chemical Reviews**, v. 97, p. 1325-1357, 1997.

DADASHZADEH, S.; MIRAHMADI, N.; BABAEI, M. H.; VALI, A. M. Peritoneal retention of liposomes: Effects of lipid composition, PEG coating and liposome charge, **Journal of Controlled Release**, v. 148, p. 177-186, 2010.

DE JESUS, M. B.; PINTO, L. D. M. A.; FRACETO, L. F.; TAKAHATA, Y.; LINO, A. C. S.; JAIME, C.; DE PAULA, E. Theoretical and experimental study of a praziquantel and beta-cyclodextrin inclusion complex using molecular mechanic calculations and H-1-nuclear magnetic resonance, **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 41, p. 1428-1432, 2006.

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.

DE ROSA, M. C.; CRUTCHLEY, R. J. Photosensitized singlet oxygen and its applications, **Coordination Chemistry Reviews**, v. 233, p. 351-371, 2002.

DEL VALLE, E. M. M. Cyclodextrins and their uses: a review, **Process Biochemistry**, v. 39, p. 1033-1046, 2004.

DEMETS, G. J. F. Cucurbiturils, **Química Nova**, v. 30, p. 1313-1322, 2007.

DEVARAKONDA, B.; HILL, R. A.; LIEBENBERG, W.; BRITS, M.; DE VILLIERS, M. M. Comparison of the aqueous solubilization of practically insoluble niclosamide by polyamidoamine (PAMAM) dendrimers and cyclodextrins, **International Journal of Pharmaceutics**, v. 304, p. 193-209, 2005.

DRAGOVICH, T.; MENDELSON, D.; KURTIN, S.; RICHARDSON, K.; VON HOFF, D.; HOOS, A. A phase 2 trial of the liposomal DACH platinum L-NDDP in patients with therapy-refractory advanced colorectal cancer, **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 58, p. 759-764, 2006.

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

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.

FICHEUX, H. Photodynamic therapy: principles and therapeutic indications, **Ann. Pharm. Fr**, v. 67, p. 32-40, 2009.

FIGUEIRAS, A.; CARVALHO, R.; RIBEIRO, L.; TORRES-LABANDEIRA, J.; VEIGA, J. Solid-state characterization and dissolution profiles of the inclusion complexes of omeprazole with native and chemically modified B -cyclodextrin, **Eur. J. Pharm. Biopharm**, v. 67, p. 531-539, 2007.

FREITAS, M. R.; ROLIM, L. A.; SOARES, M. F.; ROLIM-NETO, P. J.; ALBUQUERQUE, M. M.; SOARES-SOBRINHO, J. L. Inclusion complex of methyl-B-cyclodextrin and olanzapine as potential drug delivery system for schizophrenia, **Carbohydrate Polymers**, v. 89, p. 1095-1100, 2012.

GUEDES, M. H. A.; SADEGHIANI, N.; PEIXOTO, D. L. G.; COELHO, J. P.; BARBOSA, L. S.; AZEVEDO, R. B.; KUCKELHAUS, S.; DA SILVA, M. D.; MORAIS, P. C.; LACAVA, Z. G. M. Effects of AC magnetic field and carboxymethyl-dextran-coated magnetite nanoparticles on mice peritoneal cells, **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 293, p. 283-286, 2005.

HOWE, L.; ZHANG, J. Z. The effect of biological substrates on the ultrafast excited-state dynamics of zinc phthalocyanine tetrasulfonate in solution, **Photochemistry and Photobiology**, v. 67, p. 90-96, 1998.

IDOWU, M.; NYOKONG, T. Photophysical and photochemical properties of zinc and aluminum phthalocyanines in the presence of magnetic fluid, **Journal of Photochemistry and Photobiology A-Chemistry**, v. 188, p. 200-206, 2007.

JOGUPARTHI, V.; ANDERSON, B. D. Effect of cyclodextrin complexation on the liposome permeability of a model hydrophobic weak acid, **Pharmaceutical Research**, v. 25, p. 2505-2515, 2008.

JORI, G. Tumor photosensitizers: approaches to enhance the selectivity and efficiency of photodynamic therapy, **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 36, p. 87-93, 1996.

KEMP, S.; WHEATE, N. J.; STOOTMAN, F. H.; ALDRICH-WRIGHT, J. R. The host-guest chemistry of Proflavine with cucurbit[6,7,8]urils, **Supramolecular Chemistry**, v. 19, p. 475-484, 2007.

KRATZ, F.; MULLER, F.; RYPPA, C.; WARNECKE, A.; Prodrug strategies in anticancer chemotherapy, **Chemmed chem.**, v. 3, p. 20-53, 2008.

KÜCKELHAUS, S.; REIS, S. C.; CARNEIRO, M. F.; TEDESCO, A. C.; OLIVEIRA, D. M.; LIMA, E. C. D.; MORAIS, P. C.; AZEVEDO, R. B.; LACAVA, Z. G. M. In vivo investigation of cobalt ferrite-based magnetic fluid and magnetoliposomes using morphological tests, **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 272-276, p. 2402-2403, 2004.

LASIC, D. D. Novel applications of liposomes, **Trends in Biotechnology**, v. 16, p. 307-321, 1998.

LIRA, M. C. B.; FERRAZ, M. S.; DA SILVA, D. G. V. C.; CORTES, M. E.; TEIXEIRA, K. I.; CAETANO, N. P.; SINISTERRA, R. D.; PONCHEL, G.; SANTOS-MAGALHAES, N. S. Inclusion complex of usnic acid with beta-cyclodextrin: characterization and nanoencapsulation into liposomes, **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v. 64, p. 215-224, 2009.

LIU, W.; JENSEN, T. J.; FRONCZEK, F. R.; HAMMER, R. P.; SMITH, K. M.; VICENTE, M. G. H. Synthesis and cellular studies of nonaggregated water-soluble phthalocyanines, **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 48, p. 1033-1041, 2005.

LOFTSSON, T.; DUCHENE, D. Cyclodextrins and their pharmaceutical applications, **International Journal of Pharmaceutics**, v. 329, p. 1-11, 2007.

LONGO, J. P. F.; LOZZI, S. P.; SIMIONI, A. R.; MORAIS, P. C.; TEDESCO, A. C.; AZEVEDO, R. B. Photodynamic therapy with aluminum-chloro-phthalocyanine induces necrosis and vascular damage in mice tongue tumors, **Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology**, v. 94, p. 143-146, 2009.

MACDONALD, I. J.; DOUGHERTY, T. J. Basic principles of photodynamic therapy, **Journal of Porphyrins and Phthalocyanines**, v. 5, p. 105-129, 2001.

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.

MAMOON, AM.; GAMAL-ELDEEN, A. M.; RUPPEL, M. E.; SMITH, R. J.; TSANG, T.; MILLER, L. M. In vitro efficiency and mechanistic role of indocyanine green as photodynamic therapy agent for human melanoma, **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 6, p. 105-116, 2009.

MANOLIKAR, M. K.; SAWANT, M. R. Study of solubility of isoproturon by its complexation with beta-cyclodextrin, **Chemosphere**, v. 51, p. 811-816, 2003.

MISRA, R.; ACHARYA, S.; SAHOO, S. K. Cancer nanotechnology: application of nanotechnology in cancer therapy, **Drug Discovery Today**, v. 15, p. 842-850, 2010.

MORAIS, P. C.; GARG, V. K.; OLIVEIRA, A. C.; SILVA, L. P.; AZEVEDO, R. B.; SILVA, A. M. L.; LIMA, E. C. D. Synthesis and characterization of size controlled cobalt ferrite-based ionic ferrofluids, **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 225, p. 37-40, 2001.

MOSMANN, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival - Application to Proliferation and Cyto-Toxicity Assays, **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

MROZ, P.; HAMBLIN, M. R. The immunosuppressive side of PDT, **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 10, p. 751-758, 2011.

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.

O'CONNOR, A. E.; GALLAGHER, W. M.; BYRNE, A. T. Porphyrin and Nonporphyrin Photosensitizers in Oncology: Preclinical and Clinical Advances in Photodynamic Therapy, **Photochemistry and Photobiology**, v. 85, p. 1053-1074, 2009.

OLIVEIRA, D. M. Estudos sinérgicos de fármacos fotossensibilizadores utilizados na terapia fotodinâmica e fluidos magnéticos utilizados em hipertermia celular, 2006.

OLIVEIRA, D. M.; LACAVA, Z. G. M.; LIMA, E. C. D.; MORAIS, P. C.; TEDESCO, A. C. Zinc phthalocyanine/magnetic fluid complex: A promising dual nanostructured system for cancer treatment, **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 6, p. 2432-2437, 2006.

OZOEMENA, K.; KUZNETSOVA, N.; NYOKONG, T. Photosensitized transformation of 4-chlorophenol in the presence of aggregated and non-aggregated metallophthalocyanines, **Journal of Photochemistry and Photobiology A-Chemistry**, v. 139, p. 217-224, 2001.

PARK, S. I.; HWANG, Y. H.; LIM, J. H.; KIM, J. H.; YUN, H. I.; KIM, C. O. Biological and thermic effects of magnetic fluids for photodynamic therapy and hyperthermia, **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 304, p. e403-e405, 2012.

PARKER, J. G.; STANBRO, W. D. Optical Determination of the Collisional Lifetime of Singlet Molecular Oxygen[O₂(1-Δ-G)] in Acetone and Deuterated Acetone, **Journal of the American Chemical Society**, v. 104, p. 2067-2069, 1982.

PASZKO, E.; EHRHARDT, C.; SENGE, M. O.; KELLEHER, D. P.; REYNOLDS, J. V. Nanodrug applications in photodynamic therapy, **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 8, p. 14-29, 2011.

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

PRIMO, F. L.; RODRIGUES, M. M. A.; SIMIONI, A. R.; BENTLEY, M. V. L. B.; MORAIS, P. C.; TEDESCO, A. C. In vitro studies of cutaneous retention of magnetic nanoemulsion loaded with zinc phthalocyanine for synergic use in skin cancer treatment, **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 320, p. E211-E214, 2008.

RIBEIRO, L.; LOFTSSON, T.; FERREIRA, D.; VEIGA, F. Investigation and physicochemical characterization of vinpocetine-sulfobutyl ether beta-cyclodextrin binary and ternary complexes, **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 51, p. 914-922, 2003.

ROBERTSON, C. A.; EVANS, D. H.; ABRAHARNSE, H. Photodynamic therapy (PDT): A short review on cellular mechanisms and cancer research applications for PDT, **Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology**, v. 96, p. 1-8, 2009.

RODRIGUES, M. M. A.; SIMIONI, A. R.; PRIMO, F. L.; SIQUEIRA-MOURA, M. P.; MORAIS, P. C.; TEDESCO, A. C. Preparation, characterization and in vitro cytotoxicity of BSA-based nanospheres containing nanosized magnetic particles and/or photosensitizer, **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 321, p. 1600-1603, 2009.

SCHNEIDER, R.; SCHMITT, F.; FROCHOT, C.; LOURETTE, N.; GUILLEMIN, F. Design, synthesis and biological evaluation of folic acid targeted tetraphenylporphyrin as novel photosensitizers for seletive photodynamic therapy, **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 13, p. 2799-2808, 2008.

SZEJTLI, J. Cyclodextrin complexed generic drugs are generally not bio-equivalent with the reference products: Therefore the increase in number of marketed drug/cyclodextrin formulations is so slow, **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v. 52, p. 1-11, 2005.

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

TAVARES, L. C. QSAR: The Hansch's approach, **Quimica Nova**, v. 27, p. 631-639, 2004.

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, L. R.; SINISTERRA, R. D.; VIEIRA, R. P.; DORETTO, M. C.; BERALDO, H. Inclusion of benzaldehyde semicarbazone into beta-cyclodextrin produces a very effective anticonvulsant formulation, **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v. 47, p. 77-82, 2003.

TORCHILIN, V. P. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers, **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 4, p. 145-160, 2005.

TRIESSCHEIJN, M.; BAAS, P.; SCHELLENS, J. H. M.; STEWART, F. A. Photodynamic therapy in oncology, **Oncologist**, v. 11, p. 1034-1044, 2006.

UZUNOVA, V. D.; CULLINANE, C.; BRIX, K.; NAU, W. M.; DAY, A. I. Toxicity of cucurbit[7]uril and cucurbit[8]uril: an exploratory in vitro and in vivo study, **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 8, p. 2037-2042, 2010.

VANHILLEGGERSBERG, R.; KORT, W. J.; WILSON, J. H. P. Current Status of Photodynamic Therapy in Oncology, **Drugs**, v. 48, p. 510-527, 1994.

VEMURI, S.; RHODES, C. T. Encapsulation of a Water-soluble drug in a liposome preparation-removal of free drug by washing, **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 21, p. 1329-1338, 1995.

VOINEA, M.; SIMIONESCU, M. Designing of 'intelligent' liposomes for efficient delivery of drugs, **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 6, p. 465-474, 2002.

WANG, R.; WYMAN, I. W.; WANG, S.; MACARTNEY, D. H. Encapsulation of a B-carboline in cucurbit[7]uril, **J. Incl. Phenom Macrocycl Chem**, 2009.

WHEATE, N. J. Improving platinum(II)-based anticancer drug delivery using cucurbit[n]urils, **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 102, p. 2060-2066, 2008.

WONGSAGONSUP, R.; SHOBSNGOB, S.; OONKHANOND, B.; VARAVINITA, S. Zeta potential (zeta) analysis for the determination of protein content in rice flour, **Starch-Starke**, v. 57, p. 25-31, 2005.

XU, X.; KHAN, M. A.; BURGESS, D. J. Predicting hydrophilic drug encapsulation inside unilamellar liposomes, **International Journal of Pharmaceutics**, v. 423, p. 410-418, 2012.

YANASE, M.; SHINKAI, M.; HONDA, H.; WAKABAYASHI, T.; YOSHIDA, J.; KOBAYASHI, T. Intracellular hyperthermia for cancer using magnetite cationic liposomes: An In vivo study, **Japanese Journal Cancer Research**, v. 89, p. 463-469, 1998.

ZINGONE, G.; RUBESSA, F. Preformulation study of the inclusion complex warfarin-beta-cyclodextrin, **International Journal of Pharmaceutics**, v. 291, p. 3-10, 2005.

VII. ANEXOS

ANEXO I: Espectro de RMN ^1H (500 MHz MeOD) do composto Ftalocianina de Zinco (ZnPc).

ANEXO II: Espectro de RMN ^1H (500 MHz MeOD) do composto Cucurbiturila[7] (CB[7]).

ANEXO III: Espectro de RMN ^1H (500 MHz MeOD) do complexo de inclusão CB[7]:ZnPc (1:1).

ANEXO IV: Espectro de RMN ^1H (500 MHz MeOD) do complexo de inclusão CB[7]:ZnPc (2:1).