UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

“Estudos de sistemas nanocarreadores para o ácido 5- aminolevulínico (5-ALA) e seu éster derivado (8- ALA) aplicados na Eletroquimioterapia e Terapia Fotodinâmica contra câncer de pele”

Daniela Maranhão Ferreira

Ribeirão Preto
2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

“Estudos de sistemas nanocarreadores para o ácido 5- aminolevulínico (5-ALA) e seu éster derivado (8- ALA) aplicados na Eletroquimioterapia e Terapia Fotodinâmica contra câncer de pele”

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas para obtenção do Título de
Doutor em Ciências

Área de Concentração: Medicamentos e
Cosméticos

Orientada: Daniela Maranhão Ferreira

Orientador: Prof. Dr. Antonio Claudio Tedesco

Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas no dia 01/06/2012. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto
2012

FICHA CATALOGRÁFICA

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTES TRABALHOS, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ferreira, Daniela Maranhão

“Estudos de sistemas nanocarreadores para o ácido 5-aminolevulínico (5-ALA) e seu éster derivado (8-ALA) aplicados na Eletroquimioterapia e Terapia Fotodinâmica contra câncer de pele”

Ribeirão Preto, 2012.

74p.; 30cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Medicamentos e Cosméticos.

Orientador: Tedesco, Antonio Claudio

1. Terapia Fotodinâmica.
2. Nanopartículas de quitosana.
3. 5-ALA.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Daniela Maranhão Ferreira

Estudos de sistemas nanocarreadores para o ácido 5- aminolevulínico (5-ALA) e seu éster derivado (8- ALA) aplicados na Eletroquimioterapia e Terapia Fotodinâmica contra câncer de pele

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas para obtenção do Título de
Doutor em CIÊNCIAS

Área de Concentração: Medicamentos e
Cosméticos

Orientador: Prof. Dr. Antonio Claudio
Tedesco

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

À minha família

Ao meu marido JOSÉ HONORATO por ser minha inspiração, a razão da minha felicidade e meu verdadeiro amor.

Aos meus pais, ALCIDES e DEISY, por serem meu porto seguro, pelo amor imensurável e pelas orientações que regem minha vida pelo caminho à felicidade.

Aos meus irmãos, DU, ANA e DINHO por serem meus anjos da guarda, pela amizade e pelo imenso amor.

Agradecimentos

A Deus pela vida e força diária necessária neste caminho.

Em especial, ao prof. Dr. Antonio Claudio Tedesco por todos os ensinamentos oferecidos, por confiar no meu crescimento profissional e pela amizade nestes anos.

Agradeço as minhas amigas: Paty, Paulete, Dani Manfrim, Renata Galvão, Gisele e Camila pela convivência e alegria durante estes anos de companheirismo.

Ao meu amigo Yves pela imensa ajuda na parte experimental deste trabalho, pela excelente convivência e amizade.

Aos amigos Gilsan e Fernando, pelos conselhos e por sempre estarem dispostos a me ajudar.

À Olímpia pelo profissionalismo e pela ajuda diária.

A todos os amigos do Laboratório de Fotobiologia e Fotomedicina André, Priscila, Fernanda, Andrielle, Leonardo, Hugo, Aldo, Natália, Patrícia, Júlia, João, Daniela e Ana Carolina pela convivência e todos os momentos de alegria durante a realização deste trabalho.

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

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

Epígrafe

“O correr da vida embrulha tudo. A vida é assim; esquenta e esfria, aperta e depois afrouxa, sossega e depois desinquieta. O que ela quer da gente é coragem. O que Deus quer é ver a gente aprendendo a ser capaz de ficar alegre e amar, no meio da tristeza. Todo caminho da gente é resvaloso. Mas também cair não prejudica demais. A gente levanta, a gente sobe, a gente volta.”

(João Guimarães Rosa em “Grande Sertão Veredas”, 1956)

RESUMO

Ferreira, D.M. **Estudos de sistemas nanocarreadores para o ácido 5- aminolevulínico (5-ALA) e seu éster derivado (8-ALA) aplicados na Eletroquimioterapia e Terapia Fotodinâmica contra câncer de pele.** 2012. 74f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

Neste trabalho foi investigada a ação fotodinâmica dos pró-fármacos 5-ALA e 8-ALA incorporados em nanopartículas de quitosana, através da incidência de luz em células de melanoma, utilizando sinergicamente a Eletroquimioterapia e a Terapia Fotodinâmica. O ácido 5-aminolevulínico (5-ALA) e seus ésteres derivados são precursores metabólicos da protoporfirina IX (PpIX) e apresentam uma penetração limitada no estrato córneo. Portanto, o objetivo desse trabalho foi desenvolver, caracterizar e avaliar o efeito fotodinâmico das nanopartículas de quitosana contendo os pró-fármacos 5-ALA e seu éster derivado 8-ALA e investigar a produção efetiva de PpIX. Concomitantemente, o efeito sinérgico da Eletroquimioterapia (ECT) com a TFD também foi estudado com a finalidade de aumentar a permeação dos fármacos fotossensibilizantes através da pele, aumentando a eficiência da TFD no tratamento de neoplasias cutâneas. As nanopartículas de quitosana foram obtidas pelo método de gelificação ionotrópica, produzindo nanopartículas em tamanho nanométrico ($636,0 \text{ nm} \pm 6,5$), com uma distribuição de tamanho homogênea (0,37), além de apresentar um potencial zeta significativamente positivo $+ 35,3 \text{ mV} (\pm 2,21)$. Seu perfil de liberação e capacidade de incorporação de 80% dos pró-fármacos também foi determinado. Os estudos de citotoxicidade na ausência de luz demonstraram o caráter biocompatível das nanopartículas de quitosana desenvolvidas, assim como a produção significativa de PpIX e foi possível comprovar o excelente efeito fototóxico da formulação desenvolvida. Os estudos de sinergismo da ECT com a TFD comprovaram que a combinação das nanopartículas de quitosana contendo os pró-fármacos, com aplicação de microcorrentes de $400 \mu\text{A}$ e dose de luz de 3 J/cm^2 , nestas condições apresentou uma morte celular significativa.

Palavras-chave: Terapia Fotodinâmica, Eletroquimioterapia, Nanopartículas de quitosana, 5-ALA, 8-ALA.

ABSTRACT

Ferreira, D.M. **Studies of nanocarriers systems for 5-aminolevulinic acid (5-ALA) and its ester derivative (8-ALA) applied in Photodynamic Therapy and Electrochemotherapy against skin cancer.** 2012. 74f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

This study investigated the photodynamic action of the prodrug 5-ALA and 8-ALA into chitosan nanoparticles, through the light incidence in melanoma cells, using synergistically the Electrochemotherapy and Photodynamic Therapy. The 5-aminolevulinic acid (5-ALA) and its ester derivatives are metabolic precursors of protoporphyrin IX (PpIX) and have a limited penetration in the stratum corneum. Therefore, the objective of this study was to develop, characterize and evaluate the photodynamic effect of chitosan nanoparticles containing the prodrug 5-ALA and its ester derivative 8-ALA. Besides, was investigated the effective production of PpIX. Concomitantly, the synergistic effect of Electrochemotherapy (ECT) with PDT was also studied for the purpose of increasing the permeation of drugs through the skin, enhancing the efficiency of the PDT in the treatment of skin cancers. Chitosan nanoparticles were obtained by the ionotropic gelation producing nanoparticles in nanosize (636.0 ± 6.5 nm), with a homogenous size distribution (0.37), and present a significantly positive zeta potential $+ 35.3$ mV (± 2.21). Release profile and ability to incorporate 80% of the prodrug was also determined. The cytotoxicity studies demonstrated in the absence of light the biocompatible nature of chitosan nanoparticles developed, as well as the significant production of PpIX and it was possible to demonstrate the excellent effect of phototoxic formulation developed. The synergism studies of ECT with PDT have shown that the combination of chitosan nanoparticles containing prodrugs, applying microcurrents 400 μ A and light dose of 3 J/cm² under these conditions showed a significant cell death.

Keywords: Photodynamic Therapy, Electrochemotherapy, Chitosan Nanoparticles, 5-ALA, 8-ALA.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Princípio básico da Terapia Fotodinâmica (TFD). O fármaco é administrado no paciente e após a acumulação seletiva e preferencial deste no tecido tumoral, uma luz laser de baixa potência é irradiada através de uma sonda de fibra óptica e focalizada sobre o tumor. A luz ativa o fármaco que libera agentes citotóxicos e destroem as células tumorais	2
Figura 2: Estruturas químicas do 5-ALA e da PpIX	5
Figura 3: Biossíntese do grupo heme e formação da protoporfirina IX.....	6
Figura 4: Fórmulas estruturais dos pró-fármacos.....	9
Figura 5: Exemplos de nanocarreadores mais utilizados	11
Figura 6: Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas	12
Figura 7: Estruturas químicas dos componentes das nanopartículas	13
Figura 8: Princípio básico da Eletroquimioterapia (ECT).....	16
Figura 9: Esquema de preparação das nanopartículas de quitosana	21
Figura 10: Esquematização da célula de Franz	25
Figura 11: Representação esquemática da reação de derivação do 5-ALA com acetilcetona e formaldeído e a formação do composto fluorescente.....	26
Figura 12: Sistema de irradiação utilizado nos estudos de fototoxicidade ($\lambda = 630 \text{ nm}$)	33
Figura 13: A) Sistema de Rejuvenescimento Estético Triasystem ligado a placa; B) Eletrodos disponibilizados em cada poço da placa de 6 poços e C).Eletrodos disponibilizados em cada poço da placa de 24	34
Figura 14: Diagrama ternário de fases de formação das nanopartículas de quitosana em função das frações mássicas dos componentes.....	38
Figura 15: Diagrama ternário de fases. A) região que mostra nanopartículas apresentando uma distribuição de tamanho variando de 500 a 700 nm; B) região que apresenta os índices de polidispersividade das partículas, variando de 0,2 a 0,4 e C) sobreposição dos dois parâmetros físico-químicos	39
Figura 16: Estudo de estabilidade avaliando-se o tamanho diâmetro hidrodinâmico das partículas. Sendo (■) nanopartícula vazia, (■) nanopartículas contendo 5-ALA e (■) nanopartículas contendo 8-ALA.....	42

- Figura 17:** Estudo de estabilidade avaliando-se o potencial Zeta em função do tempo. Sendo (■) nanopartícula vazia, (■) nanopartículas contendo 5-ALA e (■) nanopartículas contendo 8-ALA 43
- Figura 18:** Perfil de liberação das nanopartículas de quitosana contendo (■)5-ALA 1 mg/mL incorporado e (■)livre 44
- Figura 19:** Perfil de liberação das nanopartículas de quitosana contendo (■)8-ALA 0,01 mg/mL incorporado e (■)livre 45
- Figura 20:** Curva padrão de calibração para quantificação do pró-fármaco 5-ALA em PBS pH 5 ($n = 5$); $y = 2068,4x + 12,856$; $R^2 = 0,995$, $\lambda_{exc} = 378$ nm, fendas espectrais = 2,5/2,5 nm 47
- Figura 21:** Curva padrão de calibração para quantificação do pró-fármaco 8-ALA em PBS pH 5 ($n = 5$); $y = 194279 x + 161,82$; $R^2 = 0,999$, $\lambda_{exc} = 378$ nm, fendas espectrais = 10/10 nm 48
- Figura 22:** Curva padrão de calibração para quantificação da PpIX em metanol e água 9:1, 0,5 a 100 ng/mL. ($n = 3$); $y = 0,9607 x + 4,7117$; $R^2 = 0,999$, $\lambda_{exc} = 400$ nm, fendas espectrais = 5/10 nm 49
- Figura 23:** Ensaio *in vitro* de citotoxicidade do pró-fármaco 5-ALA nos 3 tipos de linhagem celular. **A:** B16-F10, **B:** OSCC e **C:** Fibroblasto. CT = controle; 0,5; 1; 2; 2,5; 3; 4, 5 e 10 = concentração de 5-ALA em PBS (mg/mL); (* $p < 0,05$, ** $p < 0,001$), ($n = 3$) 51
- Figura 24:** Ensaio *in vitro* de toxicidade do pró-fármaco 8-ALA nos 3 tipos de linhagem celular. **A:** B16-F10, **B:** OSCC e **C:** Fibroblasto. CT = controle; 0,01; 0,02; 0,03; 0,04 e 0,05 = concentração de 8-ALA em PBS (mg/mL); (* $p < 0,05$, ** $p < 0,001$), ($n = 3$) 52
- Figura 25:** Ensaio *in vitro* de toxicidade da NP de quitosana em cultura de B16-F10. 2,0; 2,5 e 3,0 mg/mL de quitosana; (* $p < 0,05$), ($n = 3$) 54
- Figura 26:** Produção de PpIX pelas nanopartículas de quitosana contendo 0,1; 0,3; 0,5; 0,75 e 1 mg/mL de 5-ALA 55
- Figura 27:** Produção de PpIX pelas nanopartículas de quitosana contendo 0,001; 0,002; 0,005 e 0,01 mg/mL de 8-ALA 55
- Figura 28:** Ensaio *in vitro* de fototoxicidade do pró-fármaco 5-ALA (1 mg/mL) em linhagem celular B16-F10. CT = controle; 1; 2; 3; 4; 5 e 6 = doses de luz avaliadas (J/cm^2); (* $p < 0,05$), ($n = 3$) 57
- Figura 29:** Ensaio *in vitro* de fototoxicidade dos pró-fármacos 5-ALA e 8-ALA livres e incorporados às nanopartículas em 2 tipos de linhagem celular. **A:** B16-F10, **B:** OSCC. CT = controle; NPv = nanopartículas vazias; 5-ALA = livre 1 mg/mL; NP 5-ALA = nanopartículas contendo 5-ALA 1 mg/mL; 8-ALA = livre 0,01 mg/mL; NP 8-ALA = nanopartículas contendo 8-ALA 0,01 mg/mL; (* $p < 0,001$), ($n = 3$) 59

Figura 30: Ensaio *in vitro* de citotoxicidade do sistema de aplicação de microcorrentes em diferentes tempos. CT = controle; 2; 5; 10 e 15 minutos são os tempos de exposição às microcorrentes; (* $p < 0,05$), ($n = 3$).....60

Figura 31: Ensaio *in vitro* de aplicação das microcorrenets e fototoxicidade dos pró-fármacos 5-ALA e 8-ALA livres e incorporados às nanopartículas em B16-F10 TFD (■), TFD-ECT (■); (* $p < 0,001$), ($n = 3$).....61

LISTA DE TABELAS

Tabela I: Classificação dos sistemas	37
Tabela II: Tamanho de partículas e potencial zeta para as nanopartículas	41
Tabela III: Coeficiente de difusão (D) do 5-ALA e 8-ALA em nanopartículas de quitosana.....	45
Tabela IV: PpIX produzida e porcentagem de encapsulação	56

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

ANOVA	análise de varância
5-ALA	ácido 5-aminolevulínico
8-ALA	ácido 8-aminolevulínico
B16-F10	linhagem celular de melanoma metastático pigmentada
CT	controle
<i>D</i>	coeficiente de difusão
DDS	drug delivery system
ECT	Eletroquimioterapia
EP	Eletroporação
EROS	espécies reativas de oxigênio
FDA/USA	Food and Drug Administration
FS	fármaco fotossensibilizante
IPd	Índice de polidispersão
LED	Light Emiting Diode
m/m	massa/massa
MTT	3[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-brometo difenil tetrazólico
NP	nanopartícula de quitosana
NP 5-ALA	nanopartícula de quitosana contendo 5-ALA
NP 8-ALA	nanopartícula de quitosana contendo 8-ALA
$^1\text{O}_2$	oxigênio singlete
$\text{O}_2^\bullet$	radical superóxido
$\text{OH}^\bullet$	radical hidroxila
OSCC	linhagem celular de carcinoma epidermóide de boca humano
PpIX	protoporfirina IX
QS	Quitosana
SBF	soro fetal bovino
TFD	Terapia Fotodinâmica
TPP	sal poliânion trifosfato pentabásico de sódio
μA	Microampère

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract.....	ii
Lista de Figuras.....	iii
Lista de Tabelas	vi
Lista de símbolos e abreviaturas.....	vii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Terapia Fotodinâmica.....	1
1.2 Ácido 5-aminolevulínico e ésteres derivados	4
1.3 Sistemas nanoestruturados.....	10
1.4 Eletroquimioterapia	14
2. OBJETIVOS.....	17
3. MATERIAIS E MÉTODOS	18
3.1 Materiais.....	18
3.2 Equipamentos	19
3.3. Métodos.....	20
3.3.1. Preparação das nanopartículas.....	20
3.3.1.1. Desenvolvimento e caracterização das melhores condições para obtenção das nanopartículas de quitosana.....	21
3.3.1.2. Incorporação do 5-ALA e do éster derivado 8-ALA	22
3.3.2. Caracterização físico-química	23
3.3.2.1. Determinação do tamanho de partícula por espalhamento dinâmico da luz	23
3.3.2.2. Determinação do potencial Zeta.....	23
3.3.2.3. Avaliação da estabilidade físico-química em função do tempo	24
3.3.2.4. Determinação do perfil de liberação dos pró-fármacos	24
3.3.3. Processos Analíticos	26
3.3.3.1. Método analítico para quantificação do 5-ALA e 8-ALA	26
3.3.3.2. Método analítico para quantificação da PpIX	27
3.3.4. Estudos <i>in vitro</i>	28
3.3.4.1 Crescimento e manutenção da cultura de células da linhagem neoplásica de melanoma de camundongo (B16-F10), carcinoma epidermóide de boca (OSCC) e fibroblastos gengivais.....	28
3.3.4.2 Controle da integridade da membrana celular.....	28

3.3.4.3 Ensaio de citotoxicidade: avaliação da atividade mitocondrial através do teste de MTT	29
3.3.4.4 Avaliação da toxicidade do 5-ALA e do 8-ALA em tampão fosfato nas 3 linhagens celulares diferentes (B16-F10, OSCC e Fibroblastos)	30
3.3.4.5 Determinação da toxicidade das nanopartículas de quitosana	31
3.3.4.6 Quantificação da produção endógena de PpIX em células B16-F10, OSCC e fibroblastos gengivais pelos pró-fármacos em tampão fosfato e incorporados às nanopartículas.....	31
3.3.4.7 Determinação da porcentagem de encapsulação das nanopartículas correlacionada à quantidade de PpIX produzida.....	32
3.3.4.8 Avaliação da dose de luz utilizada nos estudos fotobiológicos	32
3.3.4.9 Estudo de fototoxicidade das nanopartículas de quitosana contendo 5 ou 8-ALA	33
3.3.5. Determinação da toxicidade do sistema ECT.....	33
3.3.5.1 Avaliação do efeito sinérgico da aplicação da ECT e TFD.....	34
3.3.6. Análise estatística e softwares	35
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
4.1. Preparo e caracterização físico-química das nanopartículas	36
4.1.1. Investigação das condições de formação das nanopartículas de quitosana ...	36
4.1.2. Determinação do tamanho de partícula e do potencial Zeta por espalhamento dinâmico da luz	40
4.1.3. Avaliação da estabilidade físico-química em função do tempo	42
4.1.4. Determinação do perfil de liberação dos pró-fármacos	43
4.1.5. Método analítico para quantificação do 5-ALA, 8-ALA e PpIX	46
4.2. Estudos <i>in vitro</i>	49
4.2.1. Avaliação da citotoxicidade do 5-ALA e do 8-ALA em tampão fosfato nas 3 linhagens celulares diferentes (B16-F10, OSCC e Fibroblastos)	49
4.2.2. Determinação da toxicidade das nanopartículas de QS.....	53
4.2.3. Quantificação da produção endógena de PpIX em células B16-F10, OSCC e fibroblastos gengivais pelos pró-fármacos em tampão fosfato e incorporados às nanopartículas.....	54
4.2.4. Avaliação da dose de luz utilizada nos estudos fotobiológicos	57
4.2.5. Estudo de fototoxicidade das nanopartículas de QS contendo 5 ou 8-ALA	58

4.2.6. Determinação da toxicidade do sistema ECT.....	59
4.2.7. Avaliação do efeito sinérgico da aplicação da Eletroquimioterapia e Terapia Fotodinâmica.....	60
5. CONCLUSÕES	62
6. REFERÊNCIAS.....	63
7. ANEXOS	74

1. INTRODUÇÃO

1.1 Terapia Fotodinâmica

A Terapia Fotodinâmica (TFD) é uma modalidade terapêutica alternativa e promissora no tratamento de diversas doenças desde o começo da década de 80 (SCHUITMAKER et al., 1996). É uma opção de tratamento adequada para várias patologias cutâneas, já utilizada na terapia de diversas doenças como queratose actínica, carcinoma basocelular superficial, doença de Bowen, psoríase, entre outras (SIDOROFF e THALER, 2010; SILVA et al., 2008; SOUZA et al., 2009). Além de tratamentos cutâneos, a TFD atua em outras áreas clínicas, como tratamento alternativo de artrite reumatoide (TRAUNER e HASAN, 1996), degeneração macular (AHMAD et al., 2008) e aterosclerose (KOSSODO e LAMURAGLIA, 2001; PARK et al., 2010). Atualmente vem sendo muito explorada também nos tratamentos estéticos para fotorejuvenescimento e acne (BISSONNETTE, 2011; COLIC et al., 2004).

Esta terapia apresentou, na última década, uma grande expansão na aplicabilidade em casos de lesões pré-malignas, atuando como uma alternativa às terapias convencionais. Trata-se de uma modalidade terapêutica minimamente invasiva, segura e com um risco mínimo de originar cicatrizes. Dessa forma, pode ser aplicada sucessivamente em curtos espaços de tempo entre um tratamento e outro, sem comprometer a área aplicada, ou seja, sem danificar os tecidos saudáveis ao redor da massa tumoral. Todas essas características a tornam um método seletivo na destruição do tecido doente (BOIY, ROELANDTS e DE WITTE, 2011; KURWA e BARLOW, 1999).

O tratamento consiste basicamente na administração sistêmica, transdérmica ou tópica de um composto, chamado fármaco fotossensibilizante (FS), e subsequente exposição da região tumoral a uma luz de comprimento de onda adequado, usualmente na região do visível do espectro eletromagnético. Essa exposição resulta na regressão tumoral, caracterizada por processos de morte celular. O fármaco e a luz sozinhos não apresentam toxicidade alguma ao organismo, mas quando combinados (na presença de oxigênio) levam a uma

sequência de etapas que resultam na destruição seletiva do tumor (LUNARDI e TEDESCO, 2005; OCHSNER, 1997).

Na Figura 1 está ilustrado o princípio básico e essencial para o tratamento por TFD.

Figura 1: Princípio básico da Terapia Fotodinâmica (TFD). O fármaco é administrado no paciente e após a acumulação seletiva e preferencial deste no tecido tumoral, uma luz laser de baixa potência é irradiada através de uma sonda de fibra óptica e focalizada sobre o tumor. A luz ativa o fármaco que libera agentes citotóxicos e destroem as células tumorais.

Na maioria dos casos utiliza-se luz monocromática oriunda de um sistema Laser, LED ou de luz monocromática propriamente dita, a qual é direcionada sobre a lesão por um conjunto de fibras ópticas. Com este equipamento é possível irradiar os tumores situados mais internamente, não sendo o método restrito apenas a tumores que estão próximos ou sobre a superfície corporal.

O FS ou a luz isoladamente não apresentam qualquer citotoxicidade para o tecido. O mecanismo de regressão fotoinduzida do tumor na TFD frequentemente está associado à participação do oxigênio singleto gerado, aos processos

fotoativados de transferência eletrônica e abstração de hidrogênio do fármaco no estado excitado e à formação de outras espécies radicalares. As espécies reativas de oxigênio ($^1\text{O}_2$, $\text{O}_2^\bullet$, $\text{OH}^\bullet$, denominadas EROS), quando geradas no meio biológico, agem nos centros específicos dos sistemas celulares, desencadeando a morte dos tecidos por processos de necrose e/ou apoptose celular (SOBOLEV, JANS e ROSENKRANZ, 2000) e a presença dos fotossensibilizadores neste meio é capaz de potencializar a produção destas espécies reativas.

Há, pelo menos, dois meios pelos quais a morte celular ocorre: por necrose e/ou apoptose (CASTANOA, DEMIDOVA e HAMBLIN, 2005). A primeira acontece acidentalmente e a segunda faz parte muitas vezes de um tipo especial de morte – a morte programada. No processo por necrose a célula incha e certas enzimas (fosfolipases) atacam e dissolvem a membrana, permitindo que ela se esvazie. Na morte por apoptose, por sua vez, a célula condenada se separa das outras, encolhe e em seu interior uma enzima (nuclease) parte o DNA do núcleo. Com o tempo, a célula se fragmenta e seus pedaços são englobados por células encarregadas de recolher os resíduos nos tecidos, por um processo típico de fagocitose.

A dualidade desse tratamento leva a uma maior seletividade na destruição dos tecidos afetados, pois somente células que são expostas simultaneamente ao fármaco e à luz na presença do oxigênio conseguem induzir a formação dos agentes citotóxicos. Isso gera dupla seletividade: há uma incorporação preferencial do fármaco no tecido tumoral bem como a possibilidade de confinar a atuação do fármaco à região tumoral, restringindo-se a iluminação na região específica. Deste modo, a TFD permite a erradicação exclusiva do tecido tumoral enquanto poupa as células saudáveis vizinhas.

Considerando que o principal agente ativador para o processo fotodinâmico ocorrer é a utilização de um FS, este composto deve possuir várias propriedades físico-químicas, farmacológicas e fotobiológicas que o qualifiquem como um FS para a TFD, minimizando os possíveis efeitos colaterais. Dentre os FS mais estudados destacam-se as porfirinas, ftalocianinas, clorinas e bacterioclorinas.

O objetivo principal da TFD consiste, portanto, em induzir a morte celular do tecido neoplásico por um processo de fotossensibilização, com redução da massa tumoral, que minimize ao máximo os danos aos tecidos vizinhos (especificidade) e os efeitos colaterais indesejáveis ao tratamento. Seu uso após a aplicação tópica de fármacos fotossensibilizantes ou de precursores conhecidos como pró-fármacos,

como o ácido aminolevulínico, tornam esses compostos capazes de induzirem a produção endógena de protoporfirinas fotoativas, responsáveis pela significativa eficiência no tratamento de neoplasias cutâneas (SOUZA et al., 2009; VENA et al., 2004; WANG et al., 2010).

1.2 Ácido 5-aminolevulínico e ésteres derivados

Vários fármacos fotossensibilizantes têm sido estudados nas últimas décadas e utilizados em TFD, porém poucos conseguem atingir o estágio clínico. Encontram-se na primeira geração de FS os derivados da hematoporfirina, conhecida comercialmente como Photofrin I® e Photofrin II®, (éter/éster de dihematoporfirina), a qual foi aprovada pela FDA/USA (*Food and Drug Administration*) desde 1998, para o tratamento do câncer de bexiga e pele utilizando a TFD. Surgiram também novos compostos que apresentaram melhorias nas propriedades fotofísicas e fotoquímicas em relação ao Photofrin®, chamados de FS de segunda geração (ftalocianinas, clorinas e bacterioclorinas) e de terceira geração (compostos fotossensíveis de segunda geração modificados: Foscan®, Visudyne® e outros) (BONNETT, 1995).

Na década de 90 já procuravam-se fármacos fotossensibilizantes que fossem eficazes no tratamento pela TFD e que pudessem ser compostos endógenos. Assim, as protoporfirinas assumiram uma posição de destaque, uma vez que apresentavam baixa toxicidade quando na ausência de luz e poucas interações com outros fármacos. Além disso, sua produção natural está inserida na rota de biossíntese do grupo heme, de fundamental importância biológica.

O grupo heme é um composto químico que está presente em todas as células sanguíneas, transporta o oxigênio e confere a cor vermelha ao sangue. No principal ponto de ramificação da sua via de biossíntese ocorre a formação natural de um derivado da protoporfirina, a protoporfirina IX (PpIX), que é um potente fármaco fotossensibilizante. Desta forma, para que ocorra a fotossensibilização das células-alvo por essa protoporfirina é necessária a administração de compostos que induzam sua produção endógena e acúmulo. Nesse caso os pró-fármacos responsáveis por esse efeito são o ácido 5-aminolevulínico (5-ALA) e seus ésteres derivados.

Pesquisadores demonstraram que ao irradiar os tecidos previamente tratados com o 5-ALA foi possível induzir a produção dessa protoporfirina e, com doses de luz adequadas, foi possível alcançar efeitos fotodinâmicos significativos com a produção de radicais livres, levando à destruição de lesões cutâneas (KENNEDY e POTTIER, 1990). Portanto, para que aconteça esse acúmulo endógeno da PpIX no alvo biológico, é imprescindível que ocorra a administração do pró-fármaco, causando excesso deste componente na rota biossintética. Esta descoberta gerou uma nova modalidade de TFD, a TFD-ALA, um tratamento clássico no combate às neoplasias cutâneas.

5-ALA, cuja nomenclatura química é ácido 5-amino-4-oxopentanoico, foi considerado, portanto, um pró-fármaco potencial para o uso na TFD tópica por estimular a formação *in situ* da PpIX e é conhecido comercialmente por Levulan® Kerastick (Figura 2).

Figura 2: Estruturas químicas do 5-ALA e da PpIX.

A produção do 5-ALA (Figura 3) ocorre em condições normais a partir da reação de condensação entre glicina e succinil-CoA. É controlada pela ação da enzima 5-ALA sintase, sendo a biossíntese do heme regulada de tal forma que nunca ocorre acúmulo de concentrações fotossensibilizantes de PpIX (KENNEDY e POTTIER, 1990; KENNEDY e POTTIER, 1992). No entanto, estudos da biossíntese do grupo heme revelaram que quando ocorre um acúmulo natural de heme livre (Fe^{2+} não complexado), a enzima 5-ALA sintase deixa de sintetizar o 5-ALA, o que resulta num mecanismo de “feedback” negativo, onde a presença do heme livre inibe

sua síntese. Desta forma, pode se dizer que a síntese do heme é principalmente regulada pela inibição da enzima 5-ALA sintase. (CAIRNDUFF et al., 1994).

Não obstante, após a administração de excesso de 5-ALA “exógeno” ocorre a inibição da ação da enzima ferroquelatase resultando, novamente, em um mecanismo de “feedback” negativo, uma vez que esta enzima deixa de complexar o Fe^{2+} na PpIX para formar o heme. Consequentemente, o 5-ALA atravessa a epiderme anormal e supera o mecanismo de inibição por feedback, sendo metabolizado dentro da mitocôndria e resultando em um acúmulo de porfirinas endógenas, principalmente a PpIX, que se concentra no tecido canceroso. Além da conversão de PpIX em heme ser relativamente lenta, as células do tecido canceroso possuem um metabolismo mais acelerado que as células normais portanto conseguem acumular PpIX em concentrações fotossensibilizantes adequadas ao tratamento (KENNEDY e POTTIER, 1990; ARAÚJO, THOMAZINE e LOPEZ, 2010; WOLF, FINKPUCHES e KERL, 1995).

Figura 3. Biossíntese do grupo heme e formação da protoporfirina IX.

Kennedy e colaboradores (KENNEDY e POTTIER, 1990) iniciaram esses estudos referente ao 5-ALA e, até hoje, a TFD-ALA demonstra a eficácia da combinação no tratamento de carcinomas (DONNELLY et al., 2006; MORTON et al., 1998), doença de Bowen (STABLES et al., 1997) e várias outras patologias (WANG et al., 2008).

As aplicações clínicas utilizando o 5-ALA como precursor da produção de PpIX não se limitam somente à administração tópica, ou ocasionalmente sistêmica, para aplicação em dermatologia. Vários estudos clínicos vêm sendo realizados nas áreas de gastroenterologia, urologia, comprometimentos vasculares e ginecologia (KRAMMER e PLAETZER, 2008), além de atuar também na detecção de neoplasia intestinal (YANG et al., 2009; YANG et al., 2011). Atualmente, o Levulan® Kerastick tem a aprovação da FDA/USA para o tratamento de lesões de pele, na face e queratose actínica (BOIY, ROELANDTS e DE WITTE, 2011).

Desde 1995, o grupo de pesquisa em Fotobiologia e Fotomedicina da FFCLRP-USP, coordenado pelo Prof. Dr. Antonio Claudio Tedesco, vem estudando a técnica de TFD e suas variáveis terapêuticas para os mais diversos tipos de câncer. As linhas de pesquisa abrangem estudos que avaliam as propriedades fotoquímicas, fotofísicas e fotobiológicas de agentes fotossensibilizantes e sistemas de liberação destes FS aplicados na terapêutica oncológica (VENA et al., 2004; TURCHIELLO et al., 2003; SIMIONI, PRIMO e TEDESCO, 2012; PRIMO, BENTLEY e TEDESCO, 2008b; OLIVEIRA et al., 2006; MARANHO et al., 2009; DE ROSA et al., 2000; BARBUGLI et al., 2010), além do uso da luz de baixa potência para a bioestimulação de tecidos aplicáveis à engenharia tecidual (ZANCANELA et al., 2011; PRIMO et al., 2011).

Desde 2000, o grupo alcançou a fase clínica dos estudos, após parceria com os profissionais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto e da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, ambas instaladas no campus da USP de Ribeirão Preto, utilizando o 5-ALA como precursor metabólico da porfirina endógena no tratamento de neoplasias cutâneas através da TFD-ALA (VENA et al., 2004; TURCHIELLO et al., 2003; SOUZA et al., 2009).

Em 2006, tiveram início os trabalhos que utilizam a TFD no tratamento de câncer de pele e boca no Hospital Regional da Asa Norte (HRAN) em colaboração com a UNB (Universidade de Brasília) e com a USP (Grupo de Pesquisa em Fotobiologia e Fotomedicina da FFCLRP), que integram o Instituto Nacional de

Ciências e Tecnologia de Nanobiotecnologia. Já no ano de 2007, foi inaugurado o Ambulatório de Terapia Fotodinâmica na Unidade de Cosmiatria, Cirurgia e Oncologia (UNICO), ligada ao Departamento de Dermatologia da Unifesp (Universidade Federal de São Paulo).

O 5-ALA, por ser uma molécula pequena, pode facilmente penetrar no estrato córneo lesado, mas apresenta maior dificuldade de penetração no epitélio íntegro (LOPEZ et al., 2003; STEFANIDOU et al., 2000). Além disso, é uma molécula hidrofílica e carregada (possui carga positiva no grupamento amino e negativa no grupamento carboxílico), apresentando dificuldades em atravessar as barreiras biológicas, que são compostas por moléculas lipofílicas (como é o caso das membranas celulares, estrato córneo da pele, epiderme e derme). Considerando-se que atravessar as barreiras biológicas é uma condição vital para o 5-ALA ser convertido em PpIX e exercer seu efeito terapêutico (KLOEK e VAN HENEGOUWEN, 1996), observou-se a necessidade da utilização de métodos para a modificação de sua estrutura química e outras estratégias que pudessem aumentar sua biodisponibilidade.

Para atingir níveis clinicamente relevantes de PpIX, é necessário administrar uma dose elevada de 5-ALA (LEVECKIS et al., 1994; LOH et al., 1993), o que geralmente acarreta efeitos colaterais como dor, irritação e em alguns casos mais graves até uma fraca neurotoxicidade para o organismo (KRAMMER e PLAETZER, 2008). A toxicidade do 5-ALA passou a ser avaliada, sendo constatado que aplicações tópicas em quantidades de até 0,2 g/cm² não induzem acúmulo sistêmico significativo de porfirinas (KRAMMER e PLAETZER, 2008; PENG et al., 1997).

Como o tratamento tópico com 5-ALA é limitado às lesões localizadas superficialmente, a eficácia de TFD-ALA pode ser melhorada e otimizada pelo desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos ou por meio de técnicas que permitam modular a permeabilidade cutânea. Existe ainda outra vertente que busca mudanças estruturais na molécula de ALA, proporcionando um aumento de sua penetração e, portanto, da concentração de PpIX nos tecidos tumorais (VENA et al., 2004; SOUZA et al., 2009; DE ROSA et al., 2003; DE ROSA et al., 2004).

Nos últimos anos, uma alternativa que vem sendo utilizada para superar esta barreira se baseia na alteração da estrutura química do 5-ALA através de uma reação de esterificação do 5-ALA com adição de alcoóis com cadeias alifáticas de

comprimentos variados, formando ésteres como o hexil, octil, decil e dodecil-éster. A utilização de ésteres derivados, que são mais lipofílicos, aumenta o processo de difusão ao redor da membrana celular, acarretando num maior acúmulo de PpIX na célula-alvo (DE ROSA et al., 2003; TURCHIELLO et al., 2003; UEHLINGER et al., 2000). No ano de 2010, houve a aprovação do ácido metil-aminolevulínico, mais conhecido como MAL ou Metvix®, em tratamentos clínicos de câncer de pele do tipo não melanoma. Até o presente momento, esse é o único éster derivado do 5-ALA empregado em estudos clínicos que está sendo amplamente utilizado, principalmente na Europa (BOIY, ROELANDTS e DE WITTE, 2011; NOVAK, SCHULTEN e LUBBERT, 2011).

O éster derivado escolhido para este trabalho trata-se de um derivado ainda novo, o octil-éster (8-ALA) (Figura 4). Estudos anteriores demonstraram que o 6-ALA e o 8-ALA foram capazes de produzir níveis relevantes de PpIX em células humanas de pulmão e bexiga, com concentrações bem menores que o 5-ALA (UEHLINGER et al., 2000). Vena e colaboradores (2004) também verificaram que os mesmos ésteres derivados apresentaram melhor capacidade de induzir o acúmulo da PpIX *in vitro* em células de melanoma de camundongo B16-F10 quando comparado ao 5-ALA (TURCHIELLO et al., 2003; VENA et al., 2004).

Figura 4: Fórmulas estruturais dos pró-fármacos.

Assim, essas estratégias proporcionam à TFD-ALA formas alternativas de aumentar a biodisponibilidade dos pró-fármacos nas células alvo, o que garante um efeito fotodinâmico significativo e contribui cada vez mais para o sucesso dessa terapia no tratamento de diversas patologias.

1.3 Sistemas nanoestruturados

Para que ocorram os processos fotodinâmicos esperados no tratamento por TFD, FS deve ser administrado de forma adequada, favorecendo sua biocompatibilidade e biodistribuição no alvo biológico (FARAJI e WIPF, 2009; SOBOLEV, JANS e ROSENKRANZ, 2000).

Diferentes estratégias vêm sendo desenvolvidas ao longo destes anos favorecendo esta abordagem. Em tratamentos dermatológicos, faz-se uso de métodos químicos, como a utilização de agentes promotores de permeação, com dimetilsulfóxido (DMSO), com o objetivo de desestruturar o estrato córneo (DE ROSA et al., 2000; PRIMO, BENTLEY e TEDESCO, 2008a) e métodos físicos, utilizando a iontoforese (LOPEZ et al., 2003). Existem também outros métodos mais invasivos e atuais que utilizam as microagulhas para favorecer a penetração de vacinas, por exemplo (KIM et al., 2009). Além destes métodos, existe um amplo estudo em relação aos sistemas de liberação de fármacos que vêm sendo empregados nos diferentes tipos de vias de administração (CATTANEO et al., 2010; FARAJI e WIPF, 2009; PAUTLER e BRENNER, 2010).

O desenvolvimento desses sistemas de liberação controlada envolve uma abordagem científica multidisciplinar, representando atualmente uma das principais áreas das ciências biológicas. Estes sistemas são desenvolvidos para permitir que o fármaco seja liberado de forma controlada e/ou sustentada e possa atingir níveis terapêuticos no alvo biológico, evitando possíveis reações tóxicas inerentes ao princípio ativo.

Esses sistemas apresentam muitas vantagens quando comparados a sistemas de liberação convencionais, como aumento da eficácia terapêutica, com liberação progressiva e controlada do fármaco; redução da toxicidade do tratamento; maior tempo de permanência na circulação sanguínea; administração segura (redução das

reações inflamatórias locais) e conveniente (menor número de doses); direcionamento a alvos específicos e possibilidade de incorporação tanto de substâncias lipofílicas como hidrofílicas (ORIVE et al., 2005).

Os sistemas de liberação são produzidos em escala nanométrica, abrangendo uma tecnologia definida como a engenharia e a produção de materiais utilizando componentes em escala atômica e molecular, denominada nanotecnologia.

A nanotecnologia tem sido utilizada na medicina para tratamento de uma variedade de doenças (FARAJI e WIPF, 2009). Seu uso está principalmente veiculado ao desenvolvimento desses novos dispositivos terapêuticos (sistemas de liberação de drogas “inteligentes”), capazes de melhorar a eficácia dos tratamentos existentes atualmente. Entre os veículos em nanoescala mais utilizados estão os lipossomas (MARANHO et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2006), nanoesferas biodegradáveis (SIMIONI et al., 2011), nanoemulsões (DE PAULA et al., 2012), nanocápsulas (FALQUEIRO et al., 2011), nanoesferas (VILA et al., 2004), entre outros (Figura 5).

Figura 5: Exemplos de nanocarreadores mais utilizados (Adaptado de SCHAFFAZICK et al., 2003).

A presença de nanopartículas nos tratamentos que envolvem as terapias contra o câncer apresenta um diferencial, pois esses sistemas de liberação de fármacos ou *drug delivery systems* (DDS) contribuem para levar a uma melhor localização do fármaco nos tecidos alvo e, portanto, aumentar seu acúmulo seletivo nos tecidos neoplásicos (FARAJI e WIPF, 2009; SOBOLEV, JANS e ROSENKRANZ, 2000). Dentre os sistemas carreadores de fármacos, as nanopartículas preparadas a partir de polímeros biodegradáveis ocupam posição de destaque, devido a suas potencialidades terapêuticas, maior estabilidade nos fluidos biológicos e armazenamento prolongado. A obtenção desses sistemas coloidais aquosos com diâmetro de partícula ultrafino constitui uma estratégia interessante na área de formulação farmacêutica (DURÁN; MATTOSO e MORAIS, 2006; GALVIN et al., 2012).

As nanopartículas poliméricas são sistemas carreadores de fármacos que apresentam diâmetro inferior a 1 μm . O termo nanopartícula é uma expressão coletiva usada para designar tanto nanoesferas quanto nanocápsulas, as quais diferem entre si de acordo com a composição e organização estrutural. As nanocápsulas são constituídas por um invólucro polimérico disposto ao redor de um núcleo oleoso, permitindo que o fármaco esteja dissolvido neste núcleo e/ou adsorvido à parede polimérica. Por outro lado, as nanoesferas, que não apresentam óleo na sua composição, são formadas por uma matriz polimérica compacta, na qual o fármaco pode ficar retido ou adsorvido, como mostra a Figura 6.

Figura 6: Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas (Adaptado de Nature Reviews/ Microbiology 2010).

Estudos mostram que polímeros como o polissacarídeo quitosana, com características hidrofílicas, combinado com diferentes monômeros, e polímeros pré-formados como poli(ácido láctico) PLA ou poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) PLGA, por exemplo, têm mostrado grande eficiência quando veiculam proteínas como a soro albumina bovina, BSA (CALVO et al., 1997; ZHANG et al., 2009), hormônios (FÉRNANDEZ-URRUSUNO et al., 1999), vacinas contra tétano (VILA et al., 2004), fármacos no tratamento de doenças oculares (FUENTE et al., 2010) e proteínas terapêuticas e antígenos (AMIDI et al., 2010).

A quitosana é um polissacarídeo catiônico (Figura 7) com propriedades importantes como mucoadesividade, biocompatibilidade e não toxicidade, tornando-se útil para aplicações farmacêuticas. Atualmente, quando comparada a outros polímeros biológicos, a quitosana é a que apresenta uma distribuição de carga que lhe confere um caráter catiônico, permitindo assim uma aproximação mais fácil de membranas celulares. Possui propriedades de mucoadesão que levam quase sempre a um prolongamento do seu tempo de retenção nas regiões de interesse. Além disso, a quitosana é biocompatível e não induz reações alérgicas ou rejeições por parte do sistema imunológico, além de conseguir facilmente a formação de ligações iônicas com poliânions multivalentes (YANG et al., 2011). As preparações e encapsulamento dos ativos de interesse nas nanopartículas de quitosana podem ser manipuladas em solução aquosa sem o uso de solventes orgânicos, o que é uma grande vantagem considerando os efeitos adversos dos resíduos orgânicos nas preparações.

Quitosana

TPP

Figura 7: Estruturas químicas dos componentes das nanopartículas (Adaptado de WU et al., 2005).

As nanopartículas de quitosana são formadas espontaneamente quando à sua solução é misturada uma solução do sal de poliânion de fosfato (TPP) (Figura 7). Neste sistema há a formação de ligações intra e intermoleculares entre os grupamentos amino da quitosana e os grupos fosfatos do TPP (CALVO et al., 1997). O processo consiste na mistura de duas fases aquosas, em condições moderadas, a temperatura ambiente, sem uso de solventes orgânicos e demonstra um comportamento pH dependente (GAN et al., 2005; VYAS, SARAF e SARAF, 2010). Todas essas propriedades e procedimentos usados na sua preparação tornam essas nanopartículas um importante tipo de DDS, com grande potencial para diversos tipos de vias de administração de moléculas como peptídeos, vacinas, genes e fármacos.

1.4 Eletroquimioterapia

Em paralelo às vias tradicionais de administração, tem ocorrido nas últimas décadas o desenvolvimento de novos métodos estratégicos que visam aumentar a

permeação destes sistemas nanocarreadores, em especial para administração cutânea, de forma a maximizar o acúmulo nas células-alvo.

A Eletroquimioterapia (ECT) consiste na aplicação de pulsos elétricos apropriados em tecidos tumorais, afetando a organização das moléculas de lipídeos da membrana plasmática, gerando poros transitórios com características hidrofílicas que resultam num aumento da interiorização dos fármacos. Esses estudos, utilizados na TFD, potencializam a ação dos FS na presença de luz, maximizando as atividades fotodinâmicas (KRASSOWSKA e FILEV, 2007; LABANAUSKIENEA, GEHLB e DIDZIAPETRIENEA, 2007; TRAITCHEVA e BERG, 2010).

A ECT é um método de tratamento bastante explorado, pois favorece a entrega do fármaco no interior das células, sendo sua abordagem restrita ao tecido submetido aos pulsos elétricos, com uma intensidade de campo elétrico suficiente para atingir a permeabilização celular. Consequentemente, a ECT é um tratamento local. Quando se trata de terapia para tratamento de câncer, essa abordagem é adequada para a erradicação de nódulos localizados, mas não é conveniente ser utilizada como único tratamento para se obter um combate eficaz de uma patologia disseminada.

É importante lembrar que, nessa abordagem, os pulsos elétricos são apenas um meio de facilitar o *uptake* celular. A intensidade desses pulsos não deve danificar as células tumorais a ponto de destruí-las, uma vez que neste caso a pele e os tecidos normais circundantes dos tumores também seriam destruídos, impedindo qualquer utilização clínica dessa abordagem. Assim sendo, a finalidade dessa tecnologia é permeabilizar as células transientemente (MIR, 2009; SPUGNINI et al., 2007b).

Nessa terapia, a absorção celular de um fármaco pouco permeável pode ser aumentada, permitindo sua utilização em diferentes sistemas de veiculação. A técnica apresenta uma importante vantagem sobre as outras: a possibilidade de aumentar a seletividade no tratamento, uma vez que a taxa de transporte de fármacos é elevada apenas na área de aplicação dos pulsos elétricos, permanecendo inalterada nas outras regiões (KULBACKA et al., 2011).

O princípio da técnica consiste na aplicação de pulsos elétricos apropriados em tumores sólidos ou lesões cutâneas, juntamente com o fármaco de interesse suportado em um sistema de liberação, ocorrendo assim a permeabilização do fármaco nas células eletropulsadas. Consequentemente, observa-se aumento da

incorporação do fármaco dentro das células, particularmente nos casos em que a membrana plasmática é a principal barreira que limita o acesso ao interior das células (Figura 8).

Figura 8: Princípio básico da Eletroquimioterapia (ECT) (Adaptado de SPUGNINI et al., 2007b).

Atualmente, essa técnica é mais utilizada em estudos em animais, como no tratamento de carcinomas da pele de gatos (SPUGNINI et al., 2007a; SPUGNINI et al., 2007b) e em diferentes modelos tumorais (SERSA et al., 1994; SERSA et al., 2007). Além destas neoplasias, esse procedimento atua no tratamento de câncer de mama, sendo aplicada simultaneamente com a TFD (TRAITCHEVA e BERG, 2010; LARKIN et al., 2007), tendo sido avaliada também em modelos de tumores cerebrais (LINNERT e GEHL, 2009). Dessa forma, a ECT vem sendo utilizada juntamente com a TFD, permitindo maior interiorização dos fármacos utilizados, potencializando sua ação na presença de luz (LABANAUSKIENEA, GEHLB e DIDZIAPETRIENEA, 2007; TRAITCHEVA e BERG, 2010).

Seguindo esta linha de sinergismo, neste projeto de pesquisa de doutorado foi proposta a utilização da técnica de ECT associada à TFD para que os sistemas nanocarreadores contendo os ativos de interesse atinjam as células-alvo de maneira mais específica, acumulando a concentração dos fármacos no sítio de ação.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

Avaliar o efeito *in vitro* dos pró-fármacos 5-ALA e seu éster derivado 8-ALA associados às nanopartículas de quitosana como o sistema de liberação, sobre modelo de células de melanoma, utilizando sinergicamente a ECT e TFD no combate de neoplasias cutâneas.

2.2 Objetivos Específicos

- i. Preparar e caracterizar do ponto de vista físico-químico, nanopartículas de quitosana como sistema de liberação para 5-ALA e o éster derivado 8-ALA;
- ii. avaliar sua biocompatibilidade e eficiência na produção de PpIX sobre as linhagens celulares;
- iii. avaliar a eficiência fotodinâmica nos testes biológicos, utilizando a TFD e a ECT.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

Os reagentes a seguir foram adquiridos com alto grau de pureza e utilizados sem nenhum tipo de tratamento prévio. Todos os solventes utilizados foram de alta pureza com grau analítico.

Ácido 5-aminolevulínico (Dye Pharmaceuticals, Brasil), 8-ALA foi sintetizado em nosso laboratório com adaptações do método de preparação descrito por Kloek e van Henegouwen (KLOEK e VAN HENEGOUWEN, 1996), quitosana de baixo peso molecular (Aldrich), poliânion trifosfato pentabásico de sódio (Sigma-Aldrich).

Foram usados ainda protoporfirina IX (Sigma), ácido acético glacial (Synth), formaldeído 38% (Mallinckrodt), acetilcetona 2,4-pentadieno (Aldrich), etanol (J.T. Baker), metanol grau HPLC (Mallinckrodt), acetona (J.T. Baker), octanol (J.T. Baker), cloreto de tionila (Vetec).

No cultivo das linhagens celulares foram utilizados fosfato de potássio monobásico (UCB), fosfato de sódio dibásico (Nuclear), cloreto de sódio (Sigma), cloreto de potássio (Sigma), bicarbonato de sódio (Sigma), HEPES (Sigma). Meio de cultura RPMI 1640 (Gibco BRL), meio de cultura Dupleco Eagle's Minimum Essential Medium (DMEM) (Gibco BRL), anfotericina (Cultilab), antibiótico – penicilina/streptomicina (Cultilab), L-glutamina (Invitrogen), tripsina-EDTA (Gibco BRL), soro fetal bovino inativado estéril (Gibco BRL).

Foram utilizados nos estudos fotobiológicos o protocolo de contagem e avaliação da viabilidade celular o 3[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-brometo difenil tetrazólico (MTT, Sigma) e o corante azul de tripan (Gibco BRL).

Os estudos celulares foram realizados com culturas de células B16-F10 originadas de linhagem neoplásica de camundongos C57BL/6JD/D e OSCC-3 proveniente de carcinoma epidermóide de boca humano adquiridas pela American Type Culture Collection (ATCC, USA).

Os fibroblastos gengivais foram obtidos de pacientes saudáveis, através de cultura primária realizada pela Profa Dra Sylvie Seguer (Hospital Saint-Louis, Paris, França) durante missão internacional CAPES/COFECUB. Os ensaios clínicos foram realizados junto ao Departamento de Cirurgia, Traumatologia Buco-Maxilo-Facial e Periodontia da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (Ribeirão

Preto), aprovados previamente pelo comitê de ética em pesquisa com humanos da FCFRP-USP. Os lotes das matrizes celulares foram estocados em galões de nitrogênio líquido (aproximadamente a 77K) após cultura primária.

Todas as soluções aquosas foram preparadas com água ultrapura, obtida através do sistema de água Direct-Q 3 (Sistema de purificação de água – Millipore).

3.2 Equipamentos

Para o preparo das formulações foi empregado o homogeneizador Ultra-Turrax T8 (IKA-WERKE), centrífuga refrigerada modelo 5810 R (Eppendorf). Na determinação do tamanho de partículas e potencial Zeta utilizou-se o equipamento Zetasizer modelo Nano ZS ZEN3600 da Malvern-UK. Esse equipamento 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), e possui a capacidade de determinar tamanho de partículas no intervalo de 2 nm a 3 μ m.

Para aquisição dos espectros de emissão de fluorescência nos experimentos de doseamento foi utilizado o espectrofluorímetro F4500 Fluorescence Spectrophotometer e espectrofluorímetro *Fluorolog-3* da *Jobin Ivon-SPEX*. Nos estudos espectroscópicos utilizou-se o espectrofotômetro no UV-visível *Lambda 20* da *Perkin Elmer*, com feixe duplo e opção para controle de temperatura e agitação magnética.

Os trabalhos rotineiros com culturas celulares foram realizados em sala asséptica utilizando capelas de fluxo laminar modelo Pachane 400 (Pachane) e modelo Airstream 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.

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

O sistema laser utilizado nos ensaios fotobiológicos foi um diodo-laser modelo Heron 2w com feixe de excitação à 630 nm da Quantum Tech, São Carlos, Brasil.

Nos experimentos utilizando a ECT foi utilizado o Sistema de Rejuvenescimento Estético Triasystem como fonte de energia cedida pela empresa Industra Technologies Ind. e Com. LTDA, São Carlos, Brasil.

Foram também utilizados os seguintes aparelhos nos estudos de cultura e crescimento celular: microscópio invertido CK2 da Olympus (para análise de forma, tamanho e crescimento de cultura) e microscópio convencional axiovert 40 CFL da Zeiss.

Além desses sistemas citados, foram utilizados os seguintes equipamentos: balança eletrônica A-200 DS (Denver Instrument Company), sistema vortex modelo Genie 2, ultrassom marca Branson modelo 2210, pHmetro modelo QX-1500 (Qualxtron) e agitador de tubos modelo 56 da Phoenix.

3.3. Métodos

3.3.1. Preparação das nanopartículas

As nanopartículas utilizadas nesse trabalho de pesquisa foram preparadas segundo o método de gelificação ionotrópica, com adaptações e aperfeiçoamentos para posterior associação dos pró-fármacos, do método originalmente descrito por Calvo e colaboradores (CALVO et al., 1997),

Inicialmente preparou-se uma solução de ácido acético 0,1 mol/L na qual foram dissolvidas concentrações de quitosana variando de 0,1 a 1% (p/v) por 3 horas. Em 25,0 mL da dispersão de quitosana preparada foram adicionadas concentrações variadas de TPP entre 0,1 a 2% (p/v) com auxílio de uma seringa, mantendo o sistema sob agitação na faixa de 15000 a 25000 rpm por 5 minutos utilizando o equipamento Ultra-Turrax modelo T-8 (IKA-WERKE), conforme ilustrado na Figura 9.

Após esse procedimento, as suspensões obtidas foram avaliadas e através da construção de um diagrama ternário de fases foi possível determinar a proporção ideal dos componentes na formulação, obtendo um sistema nanoparticulado.

Figura 9: Esquema de preparação das nanopartículas de quitosana

3.3.1.1. Desenvolvimento e caracterização das melhores condições para obtenção das nanopartículas de quitosana

Um diagrama ternário de fases foi construído com o objetivo de determinar a melhor razão de massas entre a quitosana e o TPP, de forma a obter um sistema de liberação nas condições físico-químicas ideais para posterior veiculação dos pró-fármacos 5 e 8-ALA.

Foram realizadas mais de 100 combinações conforme citado no item anterior, variando as concentrações da quitosana e do TPP. As suspensões obtidas foram inspecionadas visualmente, analisadas através de um microscópio de luz polarizada (Carl Zeiss, Axiovert 40- CFL, Alemanha) e classificadas conforme seu aspecto físico.

A partir da variação das concentrações de quitosana e TPP e após a primeira classificação com relação à aparência das amostras, foi possível demarcar a maior região no diagrama ternário de fases.

Após a delimitação da região mais abrangente no diagrama, foram realizadas análises com técnicas mais sensíveis como medida de distribuição de tamanho das amostras descrita posteriormente. Dessa forma, as suspensões que apresentaram tamanho de 500 a 700 nm restringiram em aproximadamente 20 possíveis combinações de quitosana e TPP. Delimitando, portanto, a região de possível formação das nanopartículas, a região centralizada no diagrama.

Concomitantemente, foram determinados os índices de polidispersividade das partículas nesta faixa de intervalo, buscando valores da ordem de 0,2 a 0,4, delimitando assim uma pequena região no diagrama. Analisando os dois parâmetros físico-químicos e sobrepondo esses dados no diagrama, foi possível determinar a proporção ideal dos componentes na formulação que atendessem as características típicas de nanopartículas poliméricas.

3.3.1.2. Incorporação do 5-ALA e do éster derivado 8-ALA

Para compor o sistema de liberação proposto foi incorporado 5-ALA ou 8-ALA às nanopartículas de quitosana. Estes pró-fármacos diferenciam-se na estrutura química, tornando possível a comparação de seus efeitos biológicos *in vitro*.

Durante o processo de preparo das nanopartículas por gelificação ionotrópica, foi adicionada a solução de 5-ALA ou 8-ALA em tampão fosfato pH 7,3, nas concentrações de 1 mg/mL e 0,01 mg/mL respectivamente, à 25 mL da solução de quitosana 0,5 % (p/v). Acrescentando-se em seguida gota a gota com auxílio de uma seringa 5 mL da solução de TPP 1,0 % (p/v), mantendo o sistema sob agitação na faixa de 15000 a 25000 rpm por 5 minutos utilizando o equipamento Ultra-Turrax modelo T-8 (IKA-WERKE). Como produto foi obtido uma suspensão opalescente. A amostra foi então transferida para um tubo de centrifugação contendo 0,5 mL de glicerol e centrifugada a 15000 g por 30 minutos. O precipitado obtido foi ressuspenso em 1,0 mL de água ultra-purificada, obtendo assim o sistema nanoparticulado com os pró-fármacos incorporados.

3.3.2. Caracterização físico-química

3.3.2.1. Determinação do tamanho de partícula por espalhamento dinâmico da luz

Utilizando medidas de espalhamento de luz pode-se determinar o tamanho das partículas e distribuição de tamanho das mesmas no sistema de veiculação.

Foram avaliados os tamanhos das nanopartículas na ausência e presença dos pró-fármacos, verificando assim se houve ou não influência direta na incorporação do 5-ALA ou 8-ALA no sistema de liberação.

As amostras foram preparadas em água ultra-pura usando um fator de diluição de 1:100 para cada análise. As leituras foram realizadas utilizando os conjuntos de cubetas de acrílico padronizadas do próprio equipamento.

Para melhor adequação do protocolo experimental, foram considerados os parâmetros físico-químicos de ajuste para o movimento Browniano, sendo utilizada a viscosidade do dispersante (água ultra-pura a temperatura ambiente) e a viscosidade da formulação calculada previamente ($\eta = 1,40$ cP). Para cada medida foi empregado um número de repetição igual a 3, para cada 15 medidas. Além da distribuição de tamanhos de partículas, registraram-se também o índice de polidispersidade para um coeficiente de correlação de no mínimo 10^5 .

3.3.2.2. Determinação do potencial Zeta

O potencial Zeta das partículas coloidais foi determinado seguindo o protocolo experimental semelhante ao descrito no item anterior para determinação do tamanho das nanopartículas (3.3.2.1). Entretanto, o equipamento foi ajustado para o módulo de obtenção de potencial de membrana, sendo utilizada uma cubeta eletroforética especial adaptada com eletrodos externos para medida da voltagem (mV).

As medidas foram realizadas em triplicatas, sendo os resultados avaliados por um teste algorítmico do próprio software da *Malvern* a fim de aprovação e adequação dentro dos critérios de confiabilidade.

3.3.2.3. Avaliação da estabilidade físico-química em função do tempo

A estabilidade das três diferentes formulações preparadas foi avaliada através da determinação dos valores de tamanho de partícula e potencial Zeta. As amostras foram armazenadas durante 3 meses a uma temperatura de 4 °C. Essas análises foram realizadas a cada semana para acompanhar possíveis variações dos parâmetros analisados.

3.3.2.4. Determinação do perfil de liberação dos pró-fármacos

O perfil de liberação de fármacos é um estudo de extrema importância, uma vez que evidencia a capacidade de sustentar os fármacos estudados, cumprindo dessa forma com sua função de sistemas de veiculação. Sendo assim estes estudos demonstraram a quantidade de pró-fármaco liberado em função do tempo. Para tanto utilizou-se um sistema com células de Franz (Figura 10) que é uma célula de difusão estática – o volume da amostra doadora é limitado – e possui um compartimento receptor com um volume muito maior para que a solução receptora seja capaz de diluir o pró-fármaco que atravessa a membrana e seja homogênea.

Figura 10: Esquematização da célula de Franz (Adaptado de Hanson Corporation) .

Os experimentos foram conduzidos utilizando uma célula de Franz (área de difusão de 1,77 cm²) com 7,0 mL de PBS pH 5,8 no compartimento da solução receptora, e compartimento doador contendo as amostras de 0,50 mL de 5-ALA, ou 8-ALA incorporados, ou amostras com os pró-fármacos livres em PBS– em concentrações de 1,00 mg/mL e 0,01 mg/mL. Durante 12 horas o compartimento receptor foi mantido sob agitação constante de 400 rpm a 37 °C e com o auxílio de uma seringa amostras de 1,00 mL foram coletadas e quantificou-se o 5-ALA e 8-ALA presentes através do método descrito em 3.3.3.1.

O coeficiente de difusão D dos pró-fármacos nas nanopartículas foi calculado de acordo com a Equação 1:

$$Q = 2C_0 \sqrt{\frac{D \cdot t}{\pi}} \quad (1)$$

sendo Q a quantidade do fármaco liberado por área, C_0 a concentração inicial de fármaco nas nanopartículas e t o tempo de todo experimento.

3.3.3. Processos Analíticos

3.3.3.1. Método analítico para quantificação do 5-ALA e 8-ALA

O 5-ALA e seus ésteres derivados não apresentam emissão de fluorescência. Sendo assim, para que se possa fazer a caracterização por fluorescência é usual que os mesmos sejam submetidos a uma reação de derivação, que resulta na formação de um composto fluorescente. Essa reação de derivação foi baseada numa modificação da metodologia originalmente desenvolvida por Hantzsch, na qual compostos amínicos reagem com acetilcetona e formaldeído, resultando num composto fluorescente identificado como sendo 2,6-diacetil-1,5-dimetil-7-(2-carboxietil)-3H-pirrolizina, conforme representado na Figura 11 (OISHI et al., 1996; KAJIWARA et al., 1993).

A solução de acetilcetona foi obtida misturando-se 15,0 mL de acetilcetona, 10,0 mL de etanol, e 75,0 mL de água destilada, sob agitação a 600 rpm em agitador magnético, ao abrigo da luz, por 5 minutos. A solução de formaldeído 10% (v/v) foi preparada diluindo-se 1,0 mL de formaldeído 100% em 9,0 mL de água destilada, sendo a mesma estocada ao abrigo da luz, por um período não superior a 4 semanas.

Figura 11: Representação esquemática da reação de derivação do 5-ALA com acetilcetona e formaldeído e a formação do composto fluorescente.

A reação de derivação foi realizada em tubos de vidro protegidos da luz, aos quais se adicionaram 3,5 mL de acetilcetona, 0,45 mL de solução de formaldeído

10% e 50,0 μL de solução contendo 5-ALA ou 8-ALA, numa faixa de concentração que variou de 1×10^{-5} a 0,2 mg/mL e 1×10^{-7} a 0,008 mg/mL respectivamente. Para cada concentração estabelecida, a mistura (volume final de 4,0 mL) foi agitada por aproximadamente 3 segundos, e aquecida em banho seco a 100°C , por 10 minutos. Os tubos foram então resfriados à temperatura ambiente e mantidos ao abrigo da luz até o momento da leitura no espectrofluorímetro. A intensidade de emissão de fluorescência foi medida no comprimento de onda de emissão em 466 nm, com excitação fixa em 378 nm. A curva de calibração padrão para o 5-ALA e 8-ALA foi obtida plotando-se os valores das concentrações dos mesmos em função da intensidade de emissão de fluorescência. O tempo máximo decorrido desde o término da reação de derivação e leitura, de cada composto fluorescente, foi em média de 3 horas, o que garante a estabilidade do composto fluorescente formado.

3.3.3.2. Método analítico para quantificação da PpIX

A PpIX produzida pelos pró-fármacos também foi avaliada. Foi construída uma curva analítica a partir da emissão de fluorescência do composto padrão. A curva analítica foi feita com diferentes concentrações de PpIX em uma solução de metanol e água 9:1, variando a concentração de 0,5 a 100 ng/mL. As medidas foram feitas com comprimento de onda de excitação em 400 nm e a emissão de fluorescência foi analisada entre 500-700 nm, com excitação fixa em 630 nm. Para todas as análises espectrofluorimétricas foram usadas células de quartzo de quatro faces (10 mm). Além disso, todas as medidas avaliadas foram feitas no equipamento F4500 Fluorescence Spectrophotometer.

3.3.4. Estudos *in vitro*

3.3.4.1 Crescimento e manutenção da cultura de células da linhagem neoplásica de melanoma de camundongo (B16-F10), carcinoma epidermóide de boca (OSCC) e fibroblastos gengivais

As linhagens metastáticas de melanoma murino B16-F10, linhagens epidermóide de carcinoma de boca humano OSCC e linhagem de fibroblastos gengivais, estocadas em nitrogênio líquido ($0,5 \times 10^6$ células/mL) foram descongeladas a 37°C e adicionadas a um frasco de cultura estéril de 75 cm² (Corning) contendo 10,0 mL do seu respectivo meio de cultura: RPMI 1640 para B16-F10 e DMEM para OSCC e Fibroblastos, contendo 10% de soro fetal bovino. O frasco de cultura foi colocado em uma incubadora a 37°C com 5,0 % de CO₂ durante 48 horas. Após este período, realizou-se a primeira repicagem de células.

As células cresceram aderidas às garrafas de cultura celular, portanto, no processo de repicagem, inicialmente o meio de cultura foi descartado e a garrafa de cultura foi lavada com PBS, foram então utilizados 3,0 mL de uma solução de tripsina durante 4 minutos para soltar as células. Em seguida, 6,0 mL de meio de cultura foram adicionados à garrafa para neutralizar a ação da tripsina. O conteúdo da garrafa de cultura foi vertido em um tubo de 15,0 mL P15 para ser centrifugado a 25°C em velocidade de 1200 rpm durante 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* suspenso e homogeneizado em meio completo, e distribuídas em frascos de cultura celular novos de 75 cm². A troca de meio destas células foi realizada sempre que necessário.

3.3.4.2 Controle da integridade da membrana celular

Este procedimento é fundamental para os estudos subsequentes que possuem como fator determinante o número total de células aderidas.

Após centrifugação, ressuspendeu-se o *pellet* celular com o meio de cultura completo, aliquotou-se 100 µL da suspensão homogênea de células e fez-se uma diluição 1:1 com uma solução de Azul de Tripan 0,4%. Após misturar e

homogeneizar as soluções anteriores, cerca de 10 µL foram aplicados na câmara de Neubauer. Este corante é específico para se testar a integridade de membrana celular, cujo mecanismo de interação é baseado na carga residual negativa do corante que atua diretamente, por afinidade iônica, na região citoplasmática intracelular de membranas alteradas, como descrito por Freshney em 1986 (FRESHNEY, 1986).

Para todos os ensaios in vitro de toxicidade e fototoxicidade foi padronizada uma concentração de 1×10^5 células/poço, as quais foram semeadas em placas de cultura de 24 poços.

3.3.4.3 Ensaio de citotoxicidade: avaliação da atividade mitocondrial através do teste de MTT

Outro método para avaliar a atividade celular, é o método baseado no uso do corante (3[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-brometo difenil tetrazolium), conhecido como teste do MTT. O ensaio foi realizado conforme protocolos descritos por Denizot e Lang (1986). Esse ensaio baseia-se na capacidade que as células viáveis possuem em captar e converter o sal tetrazólio MTT em um produto de coloração roxa (formazan), o qual é insolúvel em meio aquoso. Essa conversão é mediada pela enzima succinato-desidrogenase presente nas mitocôndrias.

Inicialmente, após 24 h do tratamento das células com a formulação avaliada, adicionou-se 420 µL de meio de cultura RPMI 1640 sem vermelho de fenol, livre de soro fetal bovino, e 80 µL de solução de MTT (5 mg/mL) a cada poço. As células foram re-incubadas por 4h em uma incubadora a 37°C com 5,0 % de CO₂. Após esse período retirou-se a solução de MTT e adicionou-se 500 µL de 2-propanol para completa solubilização do formazan formado.

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 Safire² (TECAN Group, Grödig, Áustria). Os resultados são apresentados como porcentagem em relação ao controle calculados segundo a Equação 2:

$$\text{Células viáveis (\%)} = (\text{Absorbância}_{\text{amostra}} / \text{Absorbância}_{\text{controle}}) \times 100 \quad (2)$$

3.3.4.4 Avaliação da toxicidade do 5-ALA e do 8-ALA em tampão fosfato nas 3 linhagens celulares diferentes (B16-F10, OSCC e Fibroblastos)

A citotoxicidade dos pró-fármacos 5-ALA e 8-ALA foi avaliada pelo método de MTT descrito anteriormente no item 3.3.4.3. Nos experimentos, as células foram incubadas com diferentes concentrações dos pró-fármacos. Para avaliação do 5-ALA em PBS foram utilizadas concentrações na faixa de 0,5 a 5,0 mg/mL, dependendo da linhagem celular, por 4 horas. Com relação ao 8-ALA, foram utilizadas concentrações variando de 0,01 a 1 mg/mL permanecendo o mesmo tempo de incubação, descrito acima para 5-ALA.

3.3.4.5 Determinação da toxicidade das nanopartículas de quitosana

A viabilidade celular das nanopartículas de quitosana foi realizada pelo método de MTT, conforme descrito no item 3.3.4.3.

O tratamento foi realizado utilizando-se as nanopartículas vazias (NP), dessa forma variou-se a concentração de quitosana de 2,0 a 3,0 mg/mL, estando esse componente em proporção em massa de 5:2 com o TPP. O objetivo deste estudo foi avaliar a quantidade máxima de NP que não seria tóxica para as células.

3.3.4.6 Quantificação da produção endógena de PpIX em células B16-F10, OSCC e fibroblastos gengivais pelos pró-fármacos em tampão fosfato e incorporados às nanopartículas

Foram realizados estudos fluorimétricos para a quantificação da PpIX produzida pelas amostras avaliadas. As células foram incubadas com concentrações

variadas na faixa de 1 a 5 mg/mL do 5-ALA em PBS e incorporado às nanopartículas para as células B16-F10 e OSCC, e na faixa de 0,5 a 2,5 mg/mL para a linhagem de fibroblastos. Para o éster derivado 8-ALA foram utilizadas concentrações variando de 0,01 a 0,05 mg/mL em PBS ou incorporado às nanopartículas para as células B16-F10 e OSCC e 0,01 a 0,04 mg/mL para a linhagem de fibroblastos. Após o período de incubação de 4 horas a 37°C com 5,0 % de CO₂, as placas contendo as culturas celulares foram lavadas com PBS e as células foram removidas com tripsina. Em seguida, esta suspensão celular foi centrifugada a uma velocidade de 1200 rpm durante 5 minutos, sendo a seguir ressuspensa em uma solução de metanol e água 9:1, agitada em vortex por alguns segundos e novamente centrifugada. O sobrenadante foi retirado cuidadosamente e a produção de PpIX foi quantificada através das medidas da emissão de fluorescência dessa solução. O comprimento de onda de excitação utilizado foi 400 nm e a emissão com monitoramento em 630 nm, na temperatura de 37°C. A quantidade de PpIX produzida foi determinada correlacionando as intensidades de emissão de fluorescência à equação da reta determinada pela curva analítica previamente obtida a partir de solução de PpIX em metanol e água 9:1, na faixa de concentração de 0,5 a 100 ng/mL.

3.3.4.7 Determinação da porcentagem de encapsulação das nanopartículas correlacionada à quantidade de PpIX produzida

O objetivo deste estudo foi desenvolver um novo método em que fosse possível relacionar a quantidade de pró-fármaco encapsulado com a quantidade de PpIX produzida por eles. Desta forma, relacionou-se a quantidade de PpIX produzida pelo pró-fármaco livre (em PBS) como sendo 100%, com a quantidade de PpIX produzida pelo pró-fármaco incorporado às nanopartículas de quitosana. Assim foi possível determinar a porcentagem de pró-fármaco encapsulado. Para provar a robustez do método, esse protocolo foi avaliado em pelo menos 3 linhagens celulares diferentes (B16-F10, OSCC e Fibroblastos), utilizando a mesma metodologia em todas as culturas de células estudadas.

3.3.4.8. Avaliação da dose de luz utilizada nos estudos fotobiológicos

Nos estudos de fototoxicidade investigou-se inicialmente qual dose de luz foi necessária para causar o efeito terapêutico esperado. Essa avaliação foi realizada sobre células B16-F10, utilizando o pró-fármaco 5-ALA na concentração de 1 mg/mL em PBS. Nestes estudos, as células foram incubadas por 4 horas com a solução de 5-ALA e meio de cultura RPMI 1640 sem fenol. Para avaliação da luz irradiou-se o sistema usando um laser diodo *Eagle* modelo Heron da Quantum Tech (São Carlos-SP, Brasil) como mostra Figura 12. O equipamento operou numa potência de no máximo 300 mW (irradiância de 42 mW/cm²), com tempos de irradiação ajustados de maneira a obter densidades de energias variando de 1 a 6 J/cm². Em seguida, foi avaliada a viabilidade mitocondrial pelo método de MTT (seção 3.3.2.3).

Figura 12: Sistema de irradiação utilizado nos estudos de fototoxicidade ($\lambda = 630 \text{ nm}$).

3.3.4.9 Estudo de fototoxicidade das nanopartículas de quitosana contendo 5 ou 8-ALA

Esses estudos foram realizados utilizando células B16-F10 e OSCC. As células foram incubadas com os pró-fármacos livres e incorporados às nanopartículas de quitosana nas concentrações de 1 mg/mL para o 5-ALA e de 0,01

mg/mL para o 8-ALA. As células foram irradiadas com uma dose de luz de 3 J/cm^2 , utilizando uma potência de 300 mW, com tempo de irradiação de aproximadamente 1 minuto. Em seguida, foi realizado o ensaio de viabilidade celular padrão MTT como descrito no item 3.3.4.3.

3.3.5. Determinação da toxicidade do sistema ECT

Nos experimentos com aplicação de microcorrentes foi utilizado o Sistema de Rejuvenescimento Estético Triasystem da Industra Technologies (São Carlos-SP, Brasil) como fonte de energia e foram desenvolvidos dispositivos específicos para os estudos de estimulação *in vitro*. Os eletrodos foram disponibilizados em cada poço das placas de cultura celular garantindo assim uma aplicação uniforme e direta em todo o sistema, como mostra a Figura 13.

Figura 13: A) Sistema de Rejuvenescimento Estético Triasystem ligado a placa; B) Eletrodos disponibilizados em cada poço da placa de 6 poços e C).Eletrodos disponibilizados em cada poço da placa de 24.

Nesse experimento foi avaliada a toxicidade do sistema de aplicação das microcorrentes sobre a cultura de células, para assegurar que o dispositivo desenvolvido não iria apresentar influência com relação à viabilidade celular,

podendo interferir nos resultados futuros. As células foram plaqueadas em placas 24 poços. Assim que atingiram a confluência, foi aplicada uma corrente de 400 μA , com frequência de 50 Hz variando o tempo de exposição de 2 a 15 minutos. Após a aplicação, as células foram lavadas novamente com tampão fosfato e adicionou-se meio de cultura completo. Em seguida, foi realizado o ensaio de viabilidade celular padrão MTT descrito no item 3.3.4.3.

3.3.5.1. Avaliação do efeito sinérgico da aplicação da ECT e TFD

Neste experimento foi avaliado o efeito da aplicação das microcorrentes e posterior aplicação da luz sobre a cultura de células B16-F10. As células foram plaqueadas em placas de 24 poços (Figura 3B). Para este estudo, foram utilizadas as condições pré-determinadas pelo equipamento, frequência 50 Hz e corrente alternada de 400 μA , por 10 minutos. As células foram primeiramente incubadas com os pró-fármacos livres e incorporados às nanopartículas de quitosana nas concentrações de 1 mg/mL para o 5-ALA e de 0,01 mg/mL para o 8-ALA e logo em seguida foi aplicada a eletroquimioterapia. Após o período de incubação de 4 horas, foi aplicada a dose de luz de 3 J/cm^2 , numa potência de 300 mW em 630 nm. A resposta celular foi avaliada pelo método de MTT descrito no item 3.3.4.3.

3.3.6. Análise estatística e softwares

Os valores obtidos experimentalmente foram tratados empregando-se o programa Excel Microsoft 2007 e as análises estatísticas foram realizadas no programa Prism 3.0 através dos testes de análise de variância (One-way Anova) sendo Newman-Keuls o pós-teste aplicado. Todos os espectros obtidos nos estudos fotofísicos foram construídos utilizando-se o software *Igor-Pro*® *Wavemetrics* 3.16 β 01 (versão científica).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Preparo e caracterização físico-química das nanopartículas

4.1.1. Investigação das condições de formação das nanopartículas de quitosana

O sucesso da associação do 5-ALA e seus ésteres derivados com a TFD, aplicada no tratamento tópico de câncer de pele e outros tipos de neoplasias, depende principalmente da capacidade do pró-fármaco, bem como do DDS selecionado, de penetrar na pele e se difundir através dos tecidos ou órgão alvo (no caso de tratamento sistêmico). A utilização de um DDS bem delineado, capaz de proporcionar um aumento na capacidade de penetração e uma maior concentração do fármaco fotossensibilizante ou do pró-fármaco nos tecidos tumorais faz parte das estratégias que visam aumentar a concentração local do fármaco, levando a um efeito fotodinâmico significativo no tecido alvo. Sistemas nanoestruturados podem favorecer esse acúmulo e melhor biodistribuição, bem como diminuir os efeitos secundários indesejáveis, dependendo do seu tamanho e dos componentes da formulação.

Sistemas de liberação baseados no polissacarídeo quitosana (QS) e em seus derivados são amplamente utilizados, principalmente em superfícies mucosas. Polímeros como QS são mucoadesivos e capazes de abrir as fortes ligações existentes entre as células epiteliais. Ambas as propriedades ajudam a estimular a absorção e *uptake* celular das micro ou nanopartículas. A QS contém grupos funcionais (OH e NH₂) que permitem modificações químicas da molécula e de suas propriedades físicas (AMIDI et al., 2010; YANG et al., 2011).

As nanopartículas de QS são polieletrólitos carregados positivamente, produzidos através de um processo de gelificação induzida, por meio do qual há interação controlada com o poliânion TPP (CALVO et al., 1997). Assim, espera-se que as ligações intra e intermoleculares formadas entre TPP e os grupos amino carregados positivamente da cadeia de QS ajudem na formação das nanopartículas (PAN et al., 2002).

Para investigar a formação das nanopartículas de QS por gelificação ionotrópica foi adotado um protocolo similar ao desenvolvido por Calvo e

colaboradores (1997) (CALVO et al., 1997). Neste estudo, um diagrama ternário de fases foi construído com o objetivo de encontrar a razão ideal entre os componentes para a formação do sistema nanoparticulado. As amostras obtidas pela combinação de diferentes proporções das moléculas ativas, alterando as massas dos componentes de cada formulação, foram classificadas por meio da inspeção visual e da microscopia de luz polarizada (Carl Zeiss, Axiovert 40-CFL, Alemanha), resultando nas seguintes categorias: solução (região que não se observa formação de precipitado), opalescente (região de interesse e com maior probabilidade de formação das nanopartículas) e agregado (região que se observa formação de precipitado). As concentrações de QS e do TPP que delimitam essa formação e a classificação das soluções são apresentadas na Tabela I.

Tabela I: Classificação dos sistemas como: S (solução), OP (suspensão opalescente) e A (agregado).

QS	0,10%					0,25%					0,50%					1%				
TPP (mL)	0,25	0,5	1	2	2,5	0,25	0,5	1	2	2,5	0,25	0,5	1	2	2,5	0,25	0,5	1	2	2,5
0,10%	S	S	S	S	OP	S	OP	OP	OP	OP	OP	OP	OP	OP	OP	OP	OP	OP	OP	OP
0,25%	S	OP	OP	A	A	OP	OP	OP	OP	OP	OP	OP	OP	OP	OP	OP	OP	OP	OP	OP
0,50%	OP	OP	A	A	A	OP	OP	OP	A	A	OP	OP	OP	OP	OP	OP	A	A	A	A
1%	OP	A	A	A	A	OP	OP	A	A	A	OP	OP	OP	OP	OP	A	A	A	A	A
2%	A	A	A	A	A	OP	A	A	A	A	OP	A	A	A	A	A	A	A	A	A

Após essa classificação, o diagrama ternário de fases foi delineado, utilizando as razões de massa de QS e TPP (KRAULAND e ALONSO, 2007; PAN et al., 2002), conforme demonstra a Figura 14.

Figura 14: Diagrama ternário de fases de formação das nanopartículas de QS em função das frações mássicas dos componentes.

Uma vez determinada a região de interesse, técnicas mais refinadas como a medida do tamanho de partícula e determinação do índice de polidispersão das amostras foram utilizadas. Por meio da medida de distribuição de tamanho, foi possível restringir a maior região onde as amostras apresentaram tamanhos entre 500 e 700 nm. Essa região do diagrama revelou razões de massa entre 5:1 e 5:4 QS/TPP (m/m), tal como estabelecido na Figura 15A.

Figura 15: Diagrama ternário de fases. A) região que mostra nanopartículas apresentando uma distribuição de tamanho variando de 500 a 700 nm (região delimitada pela cor marrom ■ NP = nanopartículas); B) região que apresenta os índices de polidispersividade das partículas, variando de 0,2 a 0,4 (região delimitada pela cor vermelha ■ NP = nanopartículas) e C) sobreposição dos dois parâmetros físico-químicos.

Além disso, as determinações do índice de polidispersão permitiram uma restrição adicional da região, por meio da seleção das áreas que exibiram índice de polidispersão variando entre 0,2 e 0,4 (Figura 15B). Essa região apresentou uma formulação mais uniforme e estável.

Com base no exposto, fica evidente que a sobreposição do diagrama da primeira análise com o da segunda ofereceu uma definição exata da região circundante de formação das nanopartículas de QS, como mostra a Figura 15C. Dessa forma, a razão ideal de massa QS / TPP encontrada foi de 5:2 (m/m), sendo

considerada então a taxa ótima de moléculas ativas que proporcionaram a formulação de nanopartículas de QS avaliada neste trabalho.

4.1.2. Determinação do tamanho de partícula e do potencial Zeta por espalhamento dinâmico da luz

As nanopartículas de QS apresentam-se como nanoesferas, definidas como sistemas poliméricos matriciais (monolíticos) nos quais o fármaco pode estar fisicamente distribuído através da matriz polimérica e/ou adsorvido à superfície da partícula. Além disso, são biodegradáveis e possuem uma grande capacidade de incorporar ampla variedade de fármacos. Estas características conferem ao sistema vantagens consideráveis em comparação com outros sistemas de liberação, como os lipossomas, que são menos estáveis, quando armazenados, e de difícil processo de escalonamento (YANG et al., 2011).

Os sistemas nanométricos conferem à tecnologia farmacêutica um amplo leque de opções para o aperfeiçoamento de terapias convencionais, as quais frequentemente apresentam limitações devido às reações adversas inerentes a determinados fármacos (BARBUGLI et al., 2010; FALQUEIRO et al., 2011; SIMIONI, PRIMO e TEDESCO, 2012).

Inicialmente caracterizou-se o sistema desenvolvido determinando-se a distribuição de tamanho de partícula. A técnica do espalhamento de luz tem como objetivo auxiliar na caracterização dos sistemas de veiculação preparados, garantindo que eles apresentem dimensões nanométricas. Os principais parâmetros físico-químicos determinados neste estudo foram diâmetro médio das partículas (diâmetro hidrodinâmico), índice de polidispersão (Pdl) e Potencial Zeta (carga de superfície) das nanopartículas vazias e das nanopartículas contendo o 5-ALA e 8-ALA. As análises foram feitas em triplicata e a estabilidade do sistema foi observada por cerca de 3 meses consecutivos. A Tabela II sumariza os principais valores de parâmetros físico-químicos analisados.

Tabela II: Tamanho de partículas e potencial zeta para as nanopartículas

Nanopartículas	Tamanho médio (nm)	Índice de polidispersão	Potencial Zeta (mV)
Vazia	636,0 ± 6,5	0,37	35,3 ± 2,21
5-ALA	573,0 ± 5,7	0,37	36,6 ± 2,82
8-ALA	652,0 ± 4,7	0,32	35,5 ± 3,35

Os resultados da Tabela II indicam a formação de partículas em tamanho nanométrico, preparadas por meio do método de geleificação ionotrópica, com uma distribuição de tamanho médio pouco variada para as nanopartículas vazias ou contendo os pró-fármacos. A polidispersividade também não apresentou uma variação significativa, demonstrando o caráter homogêneo das formulações obtidas.

O potencial zeta (ζ) é um indicador útil da carga superficial líquida da partícula e pode ser usado para prever e controlar a estabilidade de suspensões e emulsões coloidais. É definido como o potencial eletrocinético da fronteira hidrodinâmica do plano de cisalhamento de uma carga da partícula adjacente para uma superfície exposta em um líquido (WONGSAGONSUP et al., 2005). Este potencial reflete a carga efetiva nas partículas e se correlaciona com a repulsão eletrostática entre elas e com a estabilidade da suspensão. Valores de potencial zeta superiores a +30 mV ou inferiores a -30 mV conferem uma estabilidade a suspensão, uma vez que as partículas carregadas se repelem umas às outras e essa força de repulsão supera a tendência natural à agregação das vesículas ou gotículas coloidais.

Os resultados apresentados na Tabela II demonstram-se dentro de uma faixa de +35 a +37 (mV) para as formulações estudadas, sendo estes valores positivos, resultado do balanço de cargas superficiais da QS (polissacarídeo positivo). Esses valores encontram-se dentro da faixa de estabilidade para este parâmetro físico-químico e é considerada uma característica importante, porque este valor de carga não só permite a previsão da estabilidade da formulação, mas também é responsável pela interação das nanopartículas com a pele ou o tecido alvo.

4.1.3. Avaliação da estabilidade físico-química em função do tempo

A avaliação da estabilidade de sistemas de liberação é um estudo essencial, pois leva em consideração fatores como a possível alteração proveniente de aditivos externos acrescentados à formulação e a interação química entre os fármacos veiculados com 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 partículas e potencial Zeta durante 3 meses consecutivos (Figura 16 e 17).

Figura 16: Estudo de estabilidade avaliando-se o tamanho diâmetro hidrodinâmico das partículas, sendo (■) nanopartícula vazia, (■) nanopartículas contendo 5-ALA e (■) nanopartículas contendo 8-ALA.

Figura 17: Estudo de estabilidade avaliando-se o potencial Zeta em função do tempo, sendo (■) nanopartícula vazia, (■) nanopartículas contendo 5-ALA e (■) nanopartículas contendo 8-ALA.

Pelos resultados obtidos, pode-se concluir que o sistema de veiculação desenvolvido apresenta uma estabilidade termodinâmica apropriada, permanecendo as medidas de tamanho das partículas e potencial Zeta dentro da mesma faixa por todo o período avaliado. Desta forma, a formulação apresentou uma estabilidade apropriada e um alto grau de reprodutibilidade na sua produção. Portanto, o uso das nanopartículas de QS como sistema de liberação dos pró-fármacos pode ser aprovado para a continuidade dos estudos.

4.1.4. Determinação do perfil de liberação dos pró-fármacos

A demonstração do perfil de liberação dos pró-fármacos é um estudo fundamental na caracterização das nanopartículas, uma vez que avalia a capacidade deste sistema em sustentar a liberação dos fármacos veiculados em condições biológicas, podendo mimetizar o comportamento das nanopartículas quando submetidas a estudos *in vivo*. Além deste comportamento, este estudo pode dar informações adicionais a respeito da estrutura dos sistemas nanoestruturados quando interagem com um modelo de membrana.

Os perfis de liberação dos pró-fármacos 5-ALA e 8-ALA incorporados às nanopartículas é mostrado respectivamente nas Figuras 18 e 19. É possível perceber que a difusão dos pró-fármacos, quando incorporados a nanopartículas, é visivelmente menor, ou seja, o sistema carreador provavelmente diminuiu a taxa de difusão de seus conteúdos, tornando ao mesmo tempo o aumento da taxa de difusão do 5-ALA e 8-ALA mais constante que em suas respectivas formas livres. Percebe-se também que o 8-ALA, ao final de um período de quatro horas, possui uma quantidade maior liberada, cerca de 10%, indicando um aumento na sua mobilidade, provavelmente causado pelo seu caráter lipofílico, o que pode estar relacionado a sua maior eficácia nos estudos posteriores com células.

Figura 18: Perfil de liberação das nanopartículas de QS contendo (■) 5-ALA 1 mg/mL incorporado e (■) livre.

Figura 19: Perfil de liberação das nanopartículas de QS contendo (■) 8-ALA 0,01 mg/mL incorporado e (●) livre.

O coeficiente de difusão (D) foi calculado para todas as formulações testadas, conforme Equação 1 descrita na seção 3.3.2.4. Pela Tabela III pode-se observar que o valor de D das nanopartículas contendo os pró-fármacos é menor quando comparado ao valor obtido para o 5 e 8-ALA em PBS. Este comportamento indica uma difusão mais lenta, favorecendo um maior controle e sustentação na liberação dos fármacos.

Tabela III: Coeficiente de difusão (D) do 5-ALA e 8-ALA em nanopartículas de QS.

Formulações	D (cm ² /s)
5-ALA PBS	$18,40 (\pm 0.33) \times 10^{-6}$
NP 5-ALA	$7,29 (\pm 0.48) \times 10^{-6}$
8-ALA PBS	$3,58 (\pm 0.17) \times 10^{-9}$
NP 8-ALA	$0,77 (\pm 0.26) \times 10^{-9}$

Portanto, a partir desses dados com relação ao seu papel de sistema de liberação de fármacos (DDS), comprovou-se a capacidade das nanopartículas de

QS de veicular os pró-fármacos de interesse e manter sua liberação sustentada para atingir um efeito fotodinâmico esperado.

4.1.5. Método analítico para quantificação do 5-ALA, 8-ALA e PpIX

A sensibilidade e seletividade do método fazem com que as medidas de emissão de fluorescência se apresentem como uma ferramenta valiosa nas análises de produtos alimentícios, farmacêuticos, naturais e amostras clínicas, desde que os mesmos apresentem um fluoróforo.

Muitas vezes compostos não fluorescentes podem ser convertidos em moléculas fortemente fluorescentes através de reações de derivação como, por exemplo, esteroides que podem produzir fluorescência quando aquecidos na presença de ácido sulfúrico. Os aminoácidos são, em sua maioria, não fluorescentes, mas reagem com o reagente fluorescamina para formar compostos altamente fluorescentes, os quais são usados em bioquímica para detectar quantidades na ordem de nanogramas (MASUHARA et al., 2011).

Conforme já mencionado na seção 3.3.3.1, a reação de derivação foi utilizada na quantificação dos pró-fármacos, uma vez que o 5-ALA e seus ésteres derivados não apresentam fluorescência intrínseca associada a um forte espalhamento da luz na formulação na região de absorção dos pró-fármacos (<300 nm), impossibilitando que as medidas de absorção destes compostos incorporados nas nanopartículas fossem realizadas diretamente.

O método baseado na reação de derivação do 5-ALA e determinação do composto fluorescente por espectroscopia de emissão de fluorescência foi primeiramente introduzido no Japão e a estrutura do composto fluorescente obtido a partir desta reação foi identificado por Kajiwara et al (KAJIWARA et al., 1993) como sendo 2,6-diacetil-1,5-dimetil-7-(2-carboxietil)-3H-pirrolizina, com um máximo de absorção em 378 nm e um máximo de emissão fluorescente em 466 nm.

As Figuras 20 e 21 ilustram, respectivamente, as curvas de calibração do composto fluorescente resultante da reação de derivação do 5-ALA (1×10^{-5} a 0,2 mg/mL) e do 8-ALA (1×10^{-7} a 0,008 mg/mL) em PBS pH 5, sendo que a escolha

deste tampão como solvente para elaboração da curva baseou-se na maior solubilidade dos pró-fármacos.

Observa-se com as curvas de calibração que os derivados fluorescentes apresentaram um comportamento linear para a faixa de concentração escolhida, tanto para o 5-ALA como para o 8-ALA, emitindo a fluorescência na região de 462 a 466 nm, como foram identificados na literatura (KAJIWARA et al., 1993). Pode-se observar também que os pontos experimentais apresentam um comportamento linear para a faixa de concentração dos pró-fármacos estudados.

Figura 20: Curva padrão de calibração para quantificação do pró-fármaco 5-ALA em PBS pH 5 ($n = 5$); $y = 2068,4x + 12,856$; $R^2 = 0,995$, $\lambda_{exc} = 378$ nm, fendas espectrais = 2,5/2,5 nm

Figura 21: Curva padrão de calibração para quantificação do pró-fármaco 8-ALA em PBS pH 5 ($n = 5$); $y = 194279 x + 161,82$; $R^2 = 0,999$, $\lambda_{exc} = 378$ nm, fendas espectrais = 10/10 nm

Por meio da quantificação de PpIX produzida pelos pró-fármacos, foi possível estabelecer uma relação entre a produção de PpIX pelos pró-fármacos incorporados às nanopartículas de QS e a PpIX alcançada por eles quando livres. A quantidade da protoporfirina gerada foi obtida por meio da curva analítica construída com as medidas de emissão de fluorescência com diferentes concentrações do composto padrão em uma solução de metanol e água 9:1, que variou de 0,5 a 100 ng/mL. As medidas foram feitas com λ de excitação em 400 nm e emissão em 630 nm. A Figura 22 mostra a curva analítica de emissão de fluorescência da PpIX.

Figura 22: Curva padrão de calibração para quantificação da PpIX em metanol e água 9:1, 0,5 a 100 ng/mL. ($n = 3$); $y = 0,9607 x + 4,7117$; $R^2 = 0,999$, $\lambda_{exc} = 400\text{nm}$, fendas espectrais = 5/10 nm

4.2. Estudos in vitro

A avaliação citotóxica é um importante ensaio que demonstra diretamente a biocompatibilidade de formulações farmacêuticas, além de determinar a faixa de concentração adequada para administração *in vitro* do fármaco dentro de um intervalo de segurança biológica e com eficácia no tratamento do alvo biológico. Estes estudos foram realizados empregando-se o teste de viabilidade celular com MTT para avaliação da atividade mitocondrial, como descrito anteriormente (3.3.4.3).

4.2.1. Avaliação da citotoxicidade do 5-ALA e do 8-ALA em tampão fosfato nas 3 linhagens celulares diferentes (B16-F10, OSCC e Fibroblastos)

Com o objetivo de investigar a produção de PpIX pelos pró-fármacos incorporados às nanopartículas, foi necessário assegurar inicialmente que as concentrações avaliadas não apresentavam citotoxicidade, uma vez que este fato pode influenciar no resultado final, pois a produção de PpIX é diretamente dependente da quantidade de células viáveis.

A escolha dos 3 tipos diferentes de linhagem celular para os estudos *in vitro* foi baseada na possível diferença de metabolismo entre elas, comparando-se posteriormente a quantidade de PpIX produzida pelas nanopartículas de QS carregadas com os pró-fármacos. Dessa forma, foi possível estabelecer a quantidade de pró-fármaco incorporada nesse sistema, definindo-se uma nova metodologia de quantificação do ALA e seus ésteres derivados associados aos DDS, conforme discutido nos estudos relatados na seção 4.2.4. A repetição do comportamento em 3 linhagens celulares diferentes indica o nível de confiabilidade do método, comparando com o método clássico (SCHAFFAZICK et al., 2003).

A citotoxicidade dos pró-fármacos 5-ALA e 8-ALA livres foi avaliada utilizando concentrações na faixa de 0,5 a 10,0 mg/mL e de 0,01 a 1 mg/mL, respectivamente, de acordo com linhagem celular em estudo.

Na Figura 23 observa-se o comportamento do pró-fármaco 5-ALA para a linhagem de melanoma B16-F10 (Figura 23A). As concentrações utilizadas foram de 0,5 a 5 mg/mL e não apresentaram toxicidade significativa com relação ao controle. Para as concentrações maiores que 5 mg/mL observou-se uma citotoxicidade significativa em relação ao controle., inviabilizando o estudo com concentrações acima dessa faixa. O mesmo comportamento foi observado para linhagem de carcinoma OSCC (Figura 23B). Já para a linhagem de fibroblastos gengivais (Figura 23C), células normais de cultura primária, a toxicidade foi significativa para concentrações superiores a 2,5 mg/mL, comprovando a sensibilidade deste tipo de linhagem frente às outras culturas estudadas. Além disso, sabe-se que as linhagens neoplásicas apresentam naturalmente um mecanismo de ação, internalização e proteção diferentes das células sadias.

Figura 23: Ensaio *in vitro* de citotoxicidade do pró-fármaco 5-ALA nos 3 tipos de linhagem celular. A: B16-F10, B: OSCC e C: Fibroblasto. CT = controle; 0,5; 1; 2; 2,5; 3; 4, 5 e 10 = concentração de 5-ALA em PBS (mg/mL). A significância estatística das diferenças entre as concentrações de 5-ALA 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 $n = 3$.

A citotoxicidade do 8-ALA também foi avaliada. Primeiramente, realizaram-se os estudos utilizando as mesmas concentrações empregadas para o 5-ALA, mas o comportamento observado para o éster derivado foi diferente. Observou-se alta citotoxicidade em relação às concentrações superiores a 1 mg/mL, fazendo-se necessária a definição de uma nova faixa de concentração 100 vezes menor que as empregadas anteriormente para a avaliação da citotoxicidade. Sendo assim, utilizaram-se para os estudos concentrações na faixa de 0,01 a 1 para linhagem B16-F10, de 0,02 a 0,2 para linhagem OSCC e de 0,01 a 0,05 para linhagem de fibroblastos gengivais.

Na Figura 24 (A), observou-se o comportamento do 8-ALA em relação à linhagem B16-F10, apresentando uma citotoxicidade significativa com relação ao controle somente a partir de 1 mg/mL. Já a linhagem de carcinoma OSCC (B) mostrou uma sensibilidade maior, apresentando uma citotoxicidade significativa a

partir de 0,2 mg/mL. O comportamento do 8-ALA em relação aos fibroblastos gengivais (C) apresentou uma toxicidade significativa a partir de 0,01 mg/mL, mantendo maior sensibilidade frente às outras linhagens celulares.

A capacidade de atingir as células-alvo com maior facilidade que o 5-ALA está coerente com a literatura, pois o 8-ALA apresenta em sua estrutura características que lhe conferem maior lipofilicidade (DE ROSA et al., 2004). Portanto, o uso de concentrações 100 vezes menores não compromete seu uso como pró-fármaco, pois a produção de PpIX nestas concentrações é efetiva e seu efeito fotodinâmico é atingido, como será mostrado adiante.

Figura 24: Ensaio *in vitro* de toxicidade do pró-fármaco 8-ALA nos 3 tipos de linhagem celular. A: B16-F10, B: OSCC e C: Fibroblasto. CT = controle; 0,01; 0,02; 0,03; 0,04 e 0,05 = concentração de 8-ALA em PBS (mg/mL). A significância estatística das diferenças entre as concentrações de 8-ALA foi determinada pelo teste de análise de variância *One-way* ANOVA seguido do pós-teste Newman-Keuls para múltiplas comparações (* $p < 0,05$, ** $p < 0,001$). Cada SEM representa o desvio padrão ($\pm$ SD) para $n = 3$.

4.2.2. Determinação da toxicidade das nanopartículas de QS

A avaliação da citotoxicidade das nanopartículas de QS foi realizada com a finalidade de certificar sua viabilidade como sistema de liberação dos pró-fármacos, descartando possíveis interferências de seus componentes nos resultados. As nanopartículas de QS apresentam características que favorecem os estudos com relação aos ensaios biológicos como, por exemplo, a mucoadesividade, caráter hidrofílico e ausência de toxicidade basal.

As células B16-F10 foram incubadas em meio de cultura com 3% de SFB com as nanopartículas vazias, variando a concentração de QS na faixa de 2,0 a 3,0 mg/mL, estando este componente em proporção em massa de 5:2 com o TPP, proporção esta determinada como ideal para formação do sistema (CALVO et al., 1997; YANG et al., 2009).

Os resultados obtidos na avaliação da citotoxicidade das nanopartículas de QS sobre a linhagem de B16-F10 estão apresentados na Figura 25. De acordo com os resultados encontrados para as diferentes concentrações das NPs avaliadas, verificou-se uma diferença de viabilidade celular a partir da concentração de 2,5 mg/mL, ou seja, ocorreu uma morte celular da ordem de 20% nessa condição, seguida de uma morte de 80% com a concentração máxima de 3,0 mg/mL, apresentando uma diferença estatisticamente significativa.

Com base nos resultados apresentados, definiu-se como a concentração máxima de nanopartículas de QS o valor de 2,0 mg/mL a ser aplicada nos estudos *in vitro*.

Figura 25: Ensaio *in vitro* de toxicidade da NP em cultura de B16-F10. 2,0; 2,5 e 3,0 mg/mL de QS. A significância estatística das diferenças entre as concentrações de QS foi determinada pelo teste de análise de variância *One-way ANOVA* seguido do pós-teste Newman-Keuls para múltiplas comparações (* $p < 0,05$, ** $p < 0,001$). Cada SEM representa o desvio padrão ($\pm$ SD) para $n = 3$.

4.2.3. Quantificação da produção endógena de PpIX em células B16-F10, OSCC e fibroblastos gengivais pelos pró-fármacos em tampão fosfato e incorporados às nanopartículas

A quantificação da PpIX produzida pelos pró-fármacos livres e incorporados às nanopartículas de QS é um estudo importante, uma vez que comprova o comportamento esperado quanto ao uso de pró-fármacos como o 5-ALA e seus ésteres derivados. Essa avaliação foi realizada por meio de ensaios fluorimétricos de determinação da PpIX produzida pelos pró-fármacos livres e incorporados às nanopartículas.

Para que fosse significativa a relação de PpIX obtida a partir dos pró-fármacos livres com a PpIX produzida *in vitro* e *in vivo* foi realizado um estudo com base num protocolo *in vitro*, usando linhagens de melanoma murino B16-F10, carcinoma de boca humano OSCC e fibroblastos gengivais. A metodologia foi mantida em todas as linhagens estudadas, o que possibilitou obter um alto grau de reprodutibilidade com relação à extração e à quantificação da PpIX obtida ($n=3$).

A Figura 26 ilustra a produção da PpIX em nanogramas em função das concentrações crescentes de 5-ALA, variando de 0,1 a 1 mg/mL incorporadas às nanopartículas de QS frente às linhagens celulares.

Figura 26: Produção de PpIX pelas nanopartículas de QS contendo 0,1; 0,3; 0,5; 0,75 e 1 mg/mL de 5-ALA

A avaliação da PpIX produzida pelas nanopartículas contendo o 8-ALA nas concentrações de 0,001 a 0,01 mg/mL nas 3 linhagens celulares estudadas foi demonstrada na Figura 27.

Figura 27: Produção de PpIX pelas nanopartículas de QS contendo 0,001; 0,002; 0,005 e 0,01 mg/mL de 8-ALA.

A PpIX produzida e quantificada com base na curva padrão foi da ordem de nanogramas. A Tabela IV relata as quantidades alcançadas para as amostras analisadas. A produção de PpIX pelas nanopartículas de QS contendo o 5-ALA ou 8-ALA foi da mesma ordem de grandeza quando comparada com a produção de PpIX pelos pró-fármacos não veiculados, utilizando-se uma solução tampão. Tal comportamento demonstra que as nanopartículas de QS não interferem na capacidade dos pró-fármacos de produzirem a PpIX.

Além disso, quando comparamos a eficiência dos pró-fármacos em produzir PpIX, observa-se que a produção foi maior para 8-ALA quando comparada à produção via 5-ALA, tanto livres quanto incorporados. Este comportamento está em concordância com os estudos realizados anteriormente por De Rosa e colaboradores (DE ROSA et al., 2003; DE ROSA et al., 2004), que observaram um maior acúmulo de PpIX nas células devido à característica mais lipofílica do éster derivado que o 5-ALA. Vale ressaltar ainda que esse comportamento do 8-ALA foi revelado utilizando uma concentração 100 vezes menor que a utilizada para 5-ALA.

Tabela IV: PpIX produzida e porcentagem de encapsulação.

Amostras	PpIX produzida (ng/mL)	% Encapsulação
5-ALA (PBS)	31,46 ± 4,30	100
NP 5-ALA	24,80 ± 3,23	78,8
8-ALA (PBS)	34,79 ± 6,09	100
NP 8-ALA	28,80 ± 4,61	82,8

Esta nova metodologia foi desenvolvida com o intuito de minimizar o grau de incerteza na determinação clássica por reação de derivação. Adotou-se como referência que a produção de PpIX no sistema livre foi da ordem de 100%. Nota-se na Tabela IV que o sistema nanoparticulado apresenta uma taxa de incorporação da ordem de 79% para o 5-ALA e de 83% para o 8-ALA. Como se pode observar, as nanopartículas de QS apresentaram uma capacidade de incorporação dos pró-fármacos significativa, reforçando a proposta de uso de 5-ALA e de seus ésteres derivados na TFD para tratamento de neoplasias cutâneas. Além disso, a característica da QS essencial para este estudo baseou-se na sua alta

mucoadesividade, que deve sem dúvida favorecer o acúmulo dos pró-fármacos nas células, resultando num efeito fotodinâmico significativo.

4.2.4. Avaliação da dose de luz utilizada nos estudos fotobiológicos

Os efeitos esperados nos estudos de fototoxicidade estão relacionados diretamente com a concentração do pró-fármaco, a dose de luz aplicada e a concentração de oxigênio molecular dissolvido no tecido.

Para avaliar o dano celular em função da irradiação laser, foram aplicadas doses crescentes de energia. Para investigar qual dose ideal do ponto de vista terapêutico com base no efeito fotodinâmico dos sistemas investigados, foram utilizadas doses de luz variadas na faixa de 1 a 6 J/cm². Inicialmente, utilizou-se uma concentração de 5-ALA não tóxica da ordem de 1 mg/mL.

Os resultados apresentados na forma de gráfico de porcentagem da viabilidade celular em função da dose de laser são demonstrados na Figura 28.

Figura 28: Ensaio *in vitro* de fototoxicidade do pró-fármaco 5-ALA (1 mg/mL) em linhagem celular B16-F10. CT = controle; 1; 2; 3; 4; 5 e 6 = doses de luz avaliadas (J/cm²). A significância estatística das diferenças entre as doses de luz 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 $n = 3$.

Pode-se observar que as doses de luz acima de 3 J/cm^2 levaram a uma toxicidade significativa na presença do pró-fármaco livre. Nessa dose foi possível avaliar os efeitos do uso das nanopartículas de QS frente ao tratamento pela TFD. Essa dose foi escolhida uma vez que a ação fotodinâmica produzida não causou uma morte celular completa, sendo possível a investigação e detecção posterior de um efeito sinérgico com a ECT.

4.2.5. Estudo de fototoxicidade das nanopartículas de QS contendo 5 ou 8-ALA

Para demonstrar o efeito da TFD nos ensaios biológicos foram avaliados os efeitos fotodinâmicos das nanopartículas de QS contendo os pró-fármacos de interesse utilizando a dose de luz anteriormente determinada: 3 J/cm^2 .

A análise foi realizada utilizando 2 linhagens celulares, B16-F10 e OSCC, avaliando os efeitos do 5-ALA numa concentração de 1 mg/mL em PBS e incorporado nas nanopartículas de QS e do 8-ALA na concentração de $0,01 \text{ mg/mL}$ também em PBS e incorporado nos sistema de liberação.

Pela Figura 29, pode-se observar o efeito da luz sobre os pró-fármacos livres, mas principalmente o efeito das nanopartículas de QS contendo os pró-fármacos, contribuindo para uma toxicidade muito mais significativa e uma considerável morte celular, como esperado. Este comportamento pode ser observado nas 2 linhagens celulares estudadas, de melanoma murino B16-F10 e de carcinoma humano OSCC.

Além disto, deve ser ressaltado o efeito causado pelo seu éster derivado 8-ALA quando incorporado às nanopartículas de QS que, utilizado em quantidade 100 vezes menor, foi capaz de induzir uma morte celular efetiva da mesma ordem de grandeza que o 5-ALA. Esse resultado enriquece ainda mais todas as contribuições anteriores com relação aos efeitos dos ésteres derivados do 5-ALA, uma vez que diminui significativamente a dose de fármaco administrada e se alcança um efeito fotodinâmico excelente

Conclui-se que o efeito observado torna estes sistemas promissores para o tratamento de neoplasias cutâneas, consagrando o tratamento com TFD-ALA para diversos tipos de câncer.

Figura 29: Ensaio *in vitro* de fototoxicidade dos pró-fármacos 5-ALA e 8-ALA livres e incorporados às nanopartículas em 2 tipos de linhagem celular. A: B16-F10, B: OSCC. CT = controle; NPv = nanopartículas vazias; 5-ALA = livre 1 mg/mL; NP 5-ALA = nanopartículas contendo 5-ALA 1 mg/mL; 8-ALA = livre 0,01 mg/mL; NP 8-ALA = nanopartículas contendo 8-ALA 0,01 mg/mL. A significância estatística das diferenças entre as variáveis estudadas foi determinada pelo teste de análise de variância *One-way ANOVA* seguido do pós-teste Newman-Keuls para múltiplas comparações (* $p < 0,05$, ** $p < 0,001$). Cada SEM representa o desvio padrão ($\pm$ SD) para $n = 3$.

4.2.6. Determinação da toxicidade do sistema ECT

Na tentativa de estabelecer tratamentos eficazes contra diversos tipos de neoplasias, inúmeras terapias têm surgido nas últimas décadas. Dentre estas tentativas a ECT se apresenta como uma candidata a ser testada.

Essa terapia possui uma característica fundamental, pois atua diretamente no mecanismo de incorporação do fármaco fotossensibilizante sobre o alvo biológico de interesse.

Neste trabalho iniciou-se o estudo e o desenvolvimento de protocolos que viabilizassem o uso da ECT em ensaios *in vitro* com diversos tipos de linhagens celulares por meio do desenvolvimento de dispositivos específicos de aplicação da microcorrentes.

O sistema de aplicação desenvolvido foi avaliado quanto a sua toxicidade frente às células B16-F10 estudadas. Para tanto foi aplicada uma corrente de 400 μ A, variando o tempo de exposição de 2 a 15 minutos nas células em placas de 24 poços com meio de cultura 10% de SBF.

Como pode ser observado na Figura 30, o sistema não apresentou diferença significativa com relação à viabilidade celular após a aplicação de microcorrentes,

mesmo utilizando períodos de 15 minutos de aplicação. Portanto, verificou-se que o sistema desenvolvido possui uma biocompatibilidade adequada, permitindo a continuidade dos estudos posteriores.

Figura 30: Ensaio *in vitro* de citotoxicidade do sistema de aplicação de microcorrentes em diferentes tempos. CT = controle; 2; 5; 10 e 15 minutos são os tempos de exposição às microcorrentes. A significância estatística das diferenças entre os tempos de aplicação foi determinada pelo teste de análise de variância *One-way ANOVA* seguido do pós-teste Newman-Keuls para múltiplas comparações. Cada SEM representa o desvio padrão ($\pm$ SD) para $n = 3$.

4.2.7. Avaliação do efeito sinérgico da aplicação da Eletroquimioterapia e Terapia Fotodinâmica

A fase final deste trabalho foi avaliar o possível efeito sinérgico da ECT e da TFD, na tentativa de conseguir um efeito maximizado e mais eficaz no tratamento de diversos tipos de câncer, em específico o câncer de pele.

Para a avaliação desse efeito, a aplicação das microcorrentes foi feita no início do período de incubação para garantir todo o processo metabólico do ALA necessário para a produção de PpIX e para que se pudesse sentir o efeito da ECT (caso o mesmo existisse) alterando o processo de metabolização da PpIX formada.

Figura 31: Ensaio *in vitro* de aplicação das microcorrenets e fototoxicidade dos pró-fármacos 5-ALA e 8-ALA livres e incorporados às nanopartículas em B16-F10 TFD (■), TFD-ECT (■). A significância estatística das diferenças entre as variáveis estudadas foi determinada pelo teste de análise de variância *One-way ANOVA* seguido do pós-teste Newman-Keuls para múltiplas comparações. Cada SEM representa o desvio padrão ($\pm$ SD) para $n = 3$.

Pôde-se observar em todos os estudos realizados e nas condições escolhidas o efeito do sinergismo dessas duas terapias (Figura 28). Com a utilização das microcorrentes houve um maior *uptake* celular, principalmente com relação ao uso das nanopartículas. Observou-se uma morte celular mais significativa com relação às nanopartículas de 5-ALA em comparação às nanopartículas de 8-ALA. Provavelmente devido a um dano celular já expresso por essa formulação nos estudos com luz sendo necessária, portanto, uma diminuição da dose de luz para que fosse possível observar a morte celular significativa por meio do sinergismo das duas terapias estudadas com relação a essa variável apenas. Todavia, é possível observar nas outras variáveis estudadas uma morte celular significativa quando comparamos com o tratamento sem aplicação de corrente, utilizando somente a luz. Dessa forma, o sistema desenvolvido em nosso laboratório para aplicação das microcorrentes, exclusivamente para estes estudos *in vitro*, se mostrou bastante eficaz e promissor para tratamentos futuros que busquem uma melhor biodisponibilidade e interiorização dos fármacos utilizados na TFD, consolidando assim um tratamento de sucesso.

5. CONCLUSÕES

Os resultados apresentados no presente trabalho demonstraram que o desenvolvimento e caracterização das nanopartículas de quitosana como sistemas de liberação do pró-fármaco 5-ALA e seu éster derivado 8-ALA foram concluídos com êxito. A formulação desenvolvida apresentou propriedades físico-químicas de acordo com o exigido pelos princípios da tecnologia farmacêutica e conforme proposto nos objetivos do projeto de tese: tamanho em escala nanométrica, estabilidade adequada e alta compatibilidade biológica. Além disso, as nanopartículas apresentaram uma capacidade de sustentar os pró-fármacos, com um perfil de liberação controlado, comprovando seu papel como sistema de liberação.

O efeito biológico esperado dos pró-fármacos foi confirmado por meio da produção significativa da PpIX observada pelos dois compostos veiculados, determinada pelo protocolo biológico desenvolvido. Tal protocolo possibilitou também a determinação da quantidade de 5-ALA e 8-ALA presente nas nanopartículas, tornando-se uma possível forma de avaliar o sistema de liberação de interesse.

O comportamento dos pró-fármacos incorporados em nanopartículas de quitosana nos estudos *in vitro* demonstrou ser diretamente dependente da concentração total do veículo e dos pró-fármacos. Um efeito *in vitro* extremamente interessante foi obtido com as nanopartículas contendo o 8-ALA, contendo uma dose 100 vezes menor que a utilizada para o 5-ALA apresentou um comportamento efetivo nos estudos realizados.

A capacidade fotodinâmica do sistema nanoparticulado contendo os pró-fármacos também foi comprovada por meio da avaliação dos seus efeitos nos estudos *in vitro*. Além disso, esse comportamento foi ratificado com a efetiva morte celular obtida nos estudos fotobiológicos. Tais resultados apresentam este sistema como uma alternativa viável para estudos *in vivo* e posterior aplicação clínica.

Na busca por tratamentos que potencializem a ação dos pró-fármacos foi investigada também a ação sinérgica da ECT e da TFD nos estudos biológicos. As placas de cultura celular contendo eletrodos próprios desenvolvidos exclusivamente para aplicação da ECT nos estudos *in vitro* apresentaram um resultado bastante

significativo. Conclui-se, portanto, que aplicação da ECT em células neoplásicas cutâneas, juntamente com as nanopartículas contendo os pró-fármacos e posterior aplicação da luz, possibilitou um tratamento eficaz contra neoplasias cutâneas, o que faz desta associação terapêutica uma parceria promissora para o tratamento deste tipo de câncer.

6. REFERÊNCIAS

- AHMAD, S.; BEARELLY, S.; STINNETT, S. S.; COONEY, M. J.; FEKRAT, S. Photodynamic therapy for predominantly hemorrhagic lesions in neovascular, age-related macular degeneration. **American Journal of Ophthalmology**, v.145, p. 1052-1057, 2008.
- AMIDI, M.; MASTROBATTISTA, E.; JISKOOT, W.; HENNINK, W. E. Chitosan - based delivery systems for protein therapeutics and antigens. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 62, p. 59-82, 2010.
- ARAÚJO, L. M. P. C.; THOMAZINE, J. A.; LOPEZ, R. F. V. Development of microemulsions to topically deliver 5-aminolevulinic acid in photodynamic therapy. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 75, p. 48-55, 2010.
- 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, Jan.2010.
- BISSONNETTE, R. Treatment of acne with photodynamic therapy. **Giornale Italiano di Dermatologia e Venereologia**, v. 146, p. 445-456, Dec.2011.
- BOIY, A.; ROELANDTS, R.; DE WITTE, P. A. M. Photodynamic therapy using topically applied hypericin: Comparative effect with methyl-aminolevulinic acid on UV induced skin tumours. **Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology**, v. 102, p. 123-131, Feb.2011.
- BONNETT, R. Photosensitizers of porphyrin and phtalocyanine series for photodinamic therapy. **Chemical Society Reviews**, v. 24, p. 19-33, 1995.
- CAIRNDUFF, F.; STRINGER, M. R.; HUDSON, E. J.; ASH, D. V.; BROWN, S. B. Superficial photodynamic therapy with topical 5-aminolevulinic acid for superficial primary and secondary skin-sancer. **British Journal of Cancer**, v. 69, p. 605-608, Mar.1994.

CALVO, P.; REMUNANLOPEZ, C.; VILAJATO, J. L.; ALONSO, M. J. Novel hydrophilic chitosan-polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 63, p. 125-132, Jan.1997.

CASTANOA, A. P.; DEMIDOVA, T. N.; HAMBLIN, M. R. Mechanisms in photodynamic therapy: part two--cellular signaling, cell metabolism and modes of cell death. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 2, p. 1-23, 2005.

CATTANEO, A. G.; GORNATI, R.; SABBIONI, E.; CHIRIVA-INTERNATI, M.; COBOS, E.; JENKINS, M. R.; BERNARDINI, G. Nanotechnology and human health: risks and benefits. **Journal of Applied Toxicology**, v. 30, p. 730-744, Nov.2010.

CEMAZAR, M.; TOZON, N.; COR, A.; SERSA, G. Electrochemotherapy of canine mast cell tumours: comparison with surgical treatment. **Anticancer Research**, v. 28, p. 3233, Sept.2008.

COLIC, M. M.; VIDOJKOVIC, N.; JOVANOVIC, M.; LAZOVIC, G. The use of polarized light in aesthetic surgery. **Aesthetic Plastic Surgery**, v. 28, p. 324-327, 2004.

DAUD, A. I.; DECONTI, R. C.; ANDREWS, S.; URBAS, P.; RIKER, A. I.; SONDAK, V. K.; MUNSTER, P. N.; SULLIVAN, D. M.; UGEN, K. E.; MESSINA, J. L.; HELLER, R. Phase I trial of interleukin-12 plasmid electroporation in patients with metastatic melanoma. **Journal of Clinical Oncology**, v. 26, p. 5896-5903, Dec.2008.

DE PAULA, L. B.; PRIMO, F. L.; JARDIM, D. R.; MORAIS, P. C.; TEDESCO, A. C. Development, characterization, and in vitro trials of chloroaluminum phthalocyanine-magnetic nanoemulsion to hyperthermia and photodynamic therapies on glioblastoma as a biological model. **Virtual Journal of Biological Physics Research**, v. 23, p. 07B307, 2012.

DE ROSA, F. S.; LOPEZ, R. F. V.; THOMAZINE, J. A.; TEDESCO, A. C.; LANGE, N.; BENTLEY, M. V. B. In vitro metabolism of 5-ALA esters derivatives in hairless mice skin homogenate and in vivo PpIX accumulation studies. **Pharmaceutical Research**, v. 21, p. 2247-2252, 2004.

DE ROSA, F. S.; MARCHETTI, J. M.; THOMAZINI, J. A.; TEDESCO, A. C.; LOPES, M. V.; BENTLEY, B. A vehicle for photodynamic therapy of skin cancer: influence of dimethylsulphoxide on 5-aminolevulinic acid in vitro cutaneous permeation and in vivo protoporphyrin IX accumulation determined by confocal microscopy. **Journal of Controlled Release**, v. 65, p. 359-366, Apr.2000.

DE ROSA, F. S.; TEDESCO, A. C.; LOPEZ, R. F. V.; PIERRE, M. B. R.; LANGE, N.; MARCHETTI, J. M.; ROTTA, J. C. G.; BENTLEY, M. V. B. In vitro skin permeation and retention of 5-aminolevulinic acid ester derivatives for photodynamic therapy. **Journal of Controlled Release**, v. 89, p. 261-269, 2003.

DONNELLY, R. F.; MORROW, D. I. J.; MCCARRON, P. A.; JUZENAS, P.; WOOLFSON, A. D. Pharmaceutical analysis of 5-aminolevulinic acid in solution and in tissues. **Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology**, v. 82, p. 59-71, Jan.2006.

DURÁN, N.; MATTOSO, L. H. C.; MORAIS, P. C. Nanopartículas poliméricas para administração de fármacos. In: **Nanotecnologia**. 1 ed. 2006. Capítulo 9, p. 161-166.

FALQUEIRO, A. M.; PRIMO, F. L.; MORAIS, P. C.; MOSINIEWICZ-SZABLEWSKA, E.; SUCHOCKI, P.; TEDESCO, A. C. Selol-loaded magnetic nanocapsules: A new approach for hyperthermia cancer therapy. **Journal of Applied Physics**, v. 109, p. 07-11, 2011.

FARAJI, A. H.; WIPF, P. Nanoparticles in cellular drug delivery, **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 17, p. 2950-2962, 2009.

FÉRNANDEZ-URRUSUNO, R.; CALVO, P.; REMUNANLOPEZ, C.; VILAJATO, J. L.; ALONSO, M. J. Enhanced of nasal absorption of insulin chitosan nanoparticles. **Pharmaceutical Research**, v. 16, p. 1576-1581, 1999.

FRESHNEY, R. I. **Animal Cell Culture-A Practical Approach** London: IRC Press, 1986.

FUENTE, D. I. M.; RAVIÑA, M.; PAOLICELLI, P.; SANCHEZ, A.; SEIJO, B.; ALONSO, M. J. Chitosan-based nanostructures: A delivery platform for ocular therapeutics. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 62, p. 110-117, 2010.

GALVIN, P.; THOMPSON, D.; RYAN, K. B.; MCCARTHY, A.; MOORE, A. C.; BURKE, C. S.; DYSON, M.; MACCRAITH, B. D.; GUN'KO, Y. K.; BYRNE, M. T.; VOLKOV, Y.; KEELY, C.; KEEHAN, E.; HOWE, M.; DUFFY, C.; MACLOUGHLIN, R. Nanoparticle-based drug delivery: case studies for cancer and cardiovascular applications. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 69, p. 389-404, Feb.2012.

GAN, Q.; WANG, T.; COCHRANE, C.; MCCARRON, P. Modulation of surface charge, particle size and morphological properties of chitosan-TPP nanoparticles intended for gene delivery. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 44, p. 65-73, 2005.

KAJIWARA, M.; HARA, K. I.; TAKATORI, K.; MATSUMOTO, K. Revised Structure of A Delta-Aminolevulinic-Acid Derivative. **Clinical Chemistry**, v. 39, p. 1867-1871, Sept.1993.

KENNEDY, J. C.; POTTIER, D. C. Photodynamic Therapy with endogenous protoporphyrin IX: basic principles and clinical experience. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 6, p. 143-148, 1990.

KENNEDY, J. C.; POTTIER, R. H. Endogenous protoporphyrin-ix, a clinically useful photosensitizer for photodynamic therapy. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 14, p. 275-292, July1992.

KIM, Y. C.; QUAN, F. S.; YOO, D. G.; COMPANS, R. W.; KANG, S. M.; PRAUSNITZ, M. R. Improved influenza vaccination in the skin using vaccine coated microneedles. **Vaccine**, v. 27, p. 6932-6938, Nov.2009.

KLOEK, J.; VAN HENEGOUWEN, G. M. J. B. Prodrugs of 5-aminolevulinic acid for Photodynamic Therapy. **Photochemistry and Photobiology**, v. 64, p. 994-1000, 1996.

KOSSODO, S.; LAMURAGLIA, G. M. Clinical potential of photodynamic therapy in cardiovascular disorders. **American Journal Cardiovascular Drugs**, v. 1, p. 15-21, 2001.

KOTULSKA, M. Electrochemotherapy in cancer treatment. **Advances in Clinical and Experimental Medicine**, v. 16, p. 601-607, 2007.

KRAMMER, B.; PLAETZER, K. ALA and its clinical impact, from bench to bedside. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 7, p. 283-289, 2008.

KRASSOWSKA, W.; FILEV, P. D. Modeling electroporation in a single cell. **Biophysical Journal**, v. 92, p. 404-417, Jan.2007.

KRAULAND, A. H.; ALONSO, M. J. Chitosan/cyclodextrin nanoparticles as macromolecular drug delivery system. **Pharmaceutical Nanotechnology**, v. 340, p. 134-142, 2007.

KULBACKA, J.; NOWAK, M.; SKOLUCKA, N.; SACZKO, J.; KOTULSKA, M. The influence of electroporation on in vitro photodynamic therapy of human breast carcinoma cells. **Biophysical Journal**, v. 57, p. 112-118, 2011.

KURWA, H. A.; BARLOW, R. J. The role of photodynamic therapy in dermatology. **Clinical and Experimental Dermatology**, v. 24, p. 143-148, May1999.

LABANAUSKIENEA, J.; GEHLB, J.; DIDZIAPETRIENEA, J. Evaluation of cytotoxic effect of photodynamic therapy in combination with electroporation in vitro. **Bioelectrochemistry**, v. 70, p. 78-82, 2007.

LARKIN, J. O.; COLLINS, C. G.; AARONS, S.; TANGNEY, M.; WHELAN, M.; O'REILY, S.; BREATHNACH, O.; SODEN, D. M.; O'SULLIVAN, G. C. Electrochemotherapy - Aspects of preclinical development and early clinical experience. **Annals of Surgery**, v. 245, p. 469-479, Mar.2007.

LEVECKIS, J.; BURN, J. L.; BROWN, N. J.; REED, M. W. R. Kinetics of endogenous protoporphyrin-ix induction by aminolevulinic acid - preliminary studies in the bladder. **Journal of Urology**, v. 152, p. 550-553, Aug.1994.

LINNERT, M.; GEHL, J. Bleomycin treatment of brain tumors: an evaluation. **Anti-Cancer Drugs**, v. 20, p. 157-164, Mar.2009.

LOH, C. S.; MACROBERT, A. J.; BEDWELL, J.; REGULA, J.; KRASNER, N.; BOWN, S. G. Oral versus intravenous administration of 5-aminolevulinic acid for photodynamic therapy. **British Journal of Cancer**, v. 68, p. 41-51, July1993.

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

LUNARDI, C. N.; TEDESCO, A. C. Synergic photosensitizers: A new trend in photodynamic therapy. **Current Organic Chemistry**, v. 9, p. 813-821, May2005.

MARANHO, D. S.; DE LIMA, R. G.; PRIMO, F. L.; DA SILVA, R. S.; TEDESCO, A. C. Photoinduced nitric oxide and singlet oxygen release from ZnPC liposome vehicle associated with the nitrosyl ruthenium complex: synergistic effects in photodynamic therapy application. **Photochemistry and Photobiology**, v. 85, p. 705-713, May2009.

MASUHARA, Y.; JINNO, N.; HASHIMOTO, M.; TSUKAGOSHI, K. Derivatization of a protein with fluorescamine utilizing the tube radial distribution phenomenon of ternary mixed carrier solvents in a capillary tube. **Chemistry Letters**, v. 40, p. 804-805, Aug.2011.

MIR, L. M. Electroporation in cancer treatment: the antitumor electrochemotherapy. **Bulletin de l'Academie Veterinaire de France**, v. 162, p. 371-376, Oct.2009.

MORTON, C. A.; ACKIE, R. M.; HITEHURST, C.; OORE, J. V.; COLL, J. H. Photodynamic therapy for basal cell carcinoma: effect of tumour thickness and duration of photosensitizer application on response. **Archives of Dermatology**, v. 134 p. 248-249, 1998.

NOVAK, B.; SCHULTEN, R.; LUBBERT, H. δ -Aminolevulinic acid and its methyl ester induce the formation of Protoporphyrin IX in cultured sensory neurones. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol**, v. 384, p. 583-602, 2011.

OCHSNER, M. Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumors. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 39, p. 1-18, 1997.

OISHI, H.; NOMIYAMA, H.; NOMIYAMA, K.; TOMOKUNI, K. Fluorometric HPLC determination of 5-aminolevulinic acid (ALA) in the plasma and urine of lead workers: biological indicators of lead exposure. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 20, p. 106-110, 1996.

OLIVEIRA, D. M.; LACAVAL, 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, Aug.2006.

ORIVE, G.; HERNÁNDEZ, R. M.; GASCÓN, A. R.; PEDRAZ, J. L. Micro and nano drug delivery systems in cancer therapy. **Cancer therapy**, v. 3, p. 131-138, 2005.

PAN, Y.; LI, Y.; ZHAO, H.; ZHENG, J.; XU, H.; WEI, G.; HAO, J.; CUI, F. Bioadhesive polysaccharide in protein delivery system: chitosan nanoparticles improve the intestinal absorption of insulin in vivo. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 249, p. 139-147, 2002.

PARK, J. H.; MOON, Y. H.; BANG, I. S.; KIM, Y. C.; KIM, S. A.; AHN, S. G.; YOON, J. H. Antimicrobial effect of photodynamic therapy using a highly pure chlorin e_6 . **Lasers in Medical Science**, v. 25, p. 705-710, 2010.

PAUTLER, M.; BRENNER, S. Nanomedicine: promises and challenges for the future of public health. **International Journal of Nanomedicine**, v. 5, p. 803-809, 2010.

PENG, Q.; WARLOE, T.; BERG, K.; MOAN, J.; KONGSHAUG, M.; GIERCKSKY, K. E.; NESLAND, J. M. 5-Aminolevulinic acid-based photodynamic therapy. Clinical Research and Future Challenges. **Cancer**, v. 79, p. 2282-2308, 1997.

PRIMO, F. L.; BENTLEY, M. V. L. B.; TEDESCO, A. C. Photophysical studies and in vitro skin permeation/retention of Foscan®/nanoemulsion (NE) applicable to photodynamic therapy skin cancer treatment. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 8, p. 340-347, Jan.2008b.

PRIMO, F. L.; BENTLEY, M. V. L. B.; TEDESCO, A. C. Photophysical studies and in vitro skin permeation/retention of Foscan®/nanoemulsion (NE) applicable to photodynamic therapy skin cancer treatment. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 8, p. 340-347, Jan.2008a.

PRIMO, F. L.; REIS, M. B. D.; PORCIONATTO, M. A.; TEDESCO, A. C. In vitro evaluation of chloroaluminum phthalocyanine nanoemulsion and low-level laser therapy on human skin dermal equivalents and bone marrow mesenchymal stem cells. **Current Medicinal Chemistry**, v. 18, p. 3376-3381, Aug.2011.

SCHAFFAZICK, S. R.; GUTERRES, S. S. U.; FREITAS, L. D.; POHLMANN, A. R. Physicochemical characterization and stability of the polymeric nanoparticle systems for drug administration. **Quimica Nova**, v. 26, p. 726-737, Sept.2003.

SCHUITMAKER, J. J.; BASS, P.; VANLEENGOED, H. L. L. M.; VANDERMEULEN, F. W.; STAR, W. M.; VANZANDWIJK, N. Photodynamic therapy: A promising new modality for the treatment of cancer. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 34, p. 3-12, June1996.

SERSA, G.; CEMAZAR, M.; MIKLAVCIC, D.; MIR, L. M. Electrochemotherapy: variable anti-tumor effect on different tumor models. **Biochemistry and Bioenergetics**, v. 35, p. 23-27, 1994.

SERSA, G.; MIKLAVCIC, D.; CEMAZAR, M.; RUDOLF, Z.; PUCIHARB, G.; SNOJA, M. Electrochemotherapy in treatment of tumours. **EJSO The Journal of Cancer Surgery**, v. 34, p. 232-240, 2007.

SIDOROFF, A.; THALER, P. Taking treatment decisions in non-melanoma skin cancer-The place for topical photodynamic therapy (PDT). **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 7, p. 24-32, Mar.2010.

SILVA, J. N.; FILIPE, P.; MORLIERE, P.; MAZIERE, J. C.; FREITAS, J. P.; GOMES, M. M.; SANTUS, R. Photodynamic therapy: dermatology and ophthalmology as main fields of current applications in clinic. **Bio-Medical Materials and Engineering**, v. 18, p. 319-327, 2008.

SIMIONI, A. R.; PRIMO, F. L.; TEDESCO, A. C. Silicon(IV) phthalocyanine-loaded-nanoparticles for application in photodynamic process. **Journal of Laser Applications**, v. 24, p. 012004, 2012.

SIMIONI, A. R.; RODRIGUES, M. M. A.; PRIMO, F. L.; MORAIS, P. C.; TEDESCO, A. C. Effect of diode-laser and ac magnetic field of bovine serum albumin nanospheres loaded with phthalocyanine and magnetic particles. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 11, p. 3604-3608, 2011.

SOBOLEV, A. S.; JANS, A. D.; ROSENKRANZ, A. A. Targeted intracellular delivery of photosensitizers. **Progress in Biophysics & Molecular Biology**, v. 73, p. 51-90, 2000.

SOUZA, C. S.; FELICIO, L. B. A.; FERREIRA, J.; KURACHI, C.; BENTLEY, M. V. B.; TEDESCO, A. C.; BAGNATO, V. S. Long-term follow-up of topical 5-aminolaevulinic acid photodynamic therapy diode laser single session for non-melanoma skin cancer. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 6, p. 207-213, Sept.2009.

SPUGNINI, E. P.; ALDI, A.; VINCENZI, B.; BONGIORNI, F.; BELLELLI, C.; CITRO, G.; PORRELLO, A. Intraoperative versus postoperative electrochemotherapy in soft tissue sarcomas: a preliminary study in a spontaneous feline model. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 59, p. 375-381, 2007a.

SPUGNINI, E. P.; VINCENZI, B.; CITROA, G.; TONINI, G.; DOTSINSKY, I.; MUDROV, N.; BALDI, A. Electrochemotherapy for the treatment of squamous cell carcinoma in cats: A preliminary report. **The Veterinary Journal**, v. 179, p. 117-120, 2007b.

STABLES, G. I.; STRINGER, M. R.; ROBINSON, D. J.; ASH, D. V. Large patches of Bowen's disease treated by topical aminolaevulinic acid photodynamic therapy. **British Journal of Dermatology**, v. 136, p. 957-960, June1997.

STEFANIDOU, M.; TOSCA, A.; THEMLIS, G.; VAZGIOURAKI, E.; BALAS, C. In vivo fluorescence kinetics and photodynamic therapy efficacy of a-aminolevulinic acid-induced porphyrins in basal cell carcinomas and actinic keratoses implications for optimization of photodynamic therapy. **European Journal of Dermatology**, v. 10, p. 351-356, 2000.

TRAITCHEVA, N.; BERG, H. Electroporation and alternating current cause membrane permeation of photodynamic cytotoxins yielding necrosis and apoptosis of cancer cells. **Bioelectrochemistry**, v. 79, p. 257-260, Oct.2010.

TRAUNER, K. B.; HASAN, T. Photodynamic treatment of rheumatoid and inflammatory arthritis. **Photochemistry and Photobiology**, v. 64, p. 740-750, Nov.1996.

TURCHIELLO, R. F.; VENA, F. C. B.; MAILLARD, Ph.; SOUZA, C. S.; BENTLEY, M. V. B.; TEDESCO, A. C. Cubic phase gel as a drug delivery system for topical application of 5-ALA, its ester derivatives and m-THPC in photodynamic therapy (PDT). **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 70, p. 1-6, 2003.

UEHLINGER, P.; ZELLWEGER, M.; WAGNIERES, G.; JUILLERAT-JEANNERET, L.; VAN DER BERG, H.; LANGE, N. 5-Aminolevulinic acid and its derivatives: physical chemical properties and protoporphyrin IX formation in cultured cells. **Photochemistry and Photobiology, B: Biology**, v. 54, p. 72-80, 2000.

VENA, F. C. B.; TURCHIELLO, R. F.; LAVILLE, I.; PIGAGLIO, S.; BLAIS, J.; TEDESCO, A. C. 5-Aminolevulinic acid ester-induced protoporphyrin IX in a murine melanoma cell line. **Lasers in Medical Science**, v. 19, p. 119-126, Oct.2004.

VILA, A.; SÁNCHEZ, A.; JANES, K. A.; BEHRENS, I.; KISSEL, T.; VILAJATO, J. L.; ALONSO, M. J. Low molecular weight chitosan nanoparticles as new carries for nasal vaccine delivery to mice. **European Journal of Pharmaceutical and Biopharmaceutics**, v. 57, p. 123-132, 2004.

VYAS, A.; SARAF, S.; SARAF, S. Encapsulation of cyclodextrin complexed simvastatin in chitosan nanocarriers: A novel technique for oral delivery. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v. 66, p. 251-259, 2010.

WANG, J.; XU, J. A.; CHEN, J. Y.; HE, Q.; XIANG, L.; HUANG, X. M.; DING, G. R.; XU, S. M. Successful photodynamic therapy with topical 5-aminolevulinic acid for five cases of cervical intraepithelial neoplasia. **Gynecologic Oncology**, v. 282, p. 307-312, 2010.

WANG, X. L.; WANG, H. W.; GUO, M. X.; XU, S. Z. Treatment of skin cancer and pre-cancer using topical ALA-PDT - A single hospital experience. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 5, p. 127-133, June 2008.

WOLF, P.; FINKPUCHES, R.; KERL, H. Photodynamic therapy for mycosis-fungoides after topical photosensitization with 5-aminolevulinic acid - reply. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 33, p. 541, Sept. 1995.

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

YANG, S. J.; LIN, F. H.; TSAI, H. M.; LIN, C. F.; CHIN, H. C.; WONG, J. M.; SHIEH, M. J. Alginate-folic acid-modified chitosan nanoparticles for photodynamic detection of intestinal neoplasms. **Biomaterials**, v. 32, p. 2174-2182, 2011.

YANG, S. J.; SHIEH, M. J.; LIN, F. H.; LOU, P. J.; PENG, C. L.; WEI, M. F.; YAO, C. J.; LAI, P. S.; YOUNG, T. H. Colorectal cancer cell detection by 5-aminolaevulinic acid-loaded chitosan nano-particles. **Cancer Letters**, v. 273, p. 210-220, Jan. 2009.

ZANCANELA, D. C.; PRIMO, F. L.; ROSA, A. L.; CIANCAGLINI, P.; TEDESCO, A. C. The effect of photosensitizer drugs and light stimulation on osteoblast growth. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 29, p. 699-705, Oct. 2011.

ZHANG, H. L.; WU, S. H.; TAO, Y.; ZANG, L. Q.; SU, Z. Q. Preparation and characterization of water-soluble chitosan nanoparticles as protein delivery system. **Journal of Nanomaterials**, v. 2010, p. 1-5, 2009.

7. ANEXO

Anexo I- Espectros de emissão de fluorescência do derivado fluorescente do 5-ALA em PBS (λ de excitação em 378 nm e λ de emissão em 466 nm).

Anexo II- Espectros de emissão de fluorescência do derivado fluorescente do 8-ALA em PBS (λ de excitação em 378 nm e λ de emissão em 463 nm).

Anexo III- Espectros de emissão de fluorescência da PpIX em metanol e água 9:1 (λ de excitação em 400 nm e λ de emissão em 630 nm).