UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Nanocápsulas contendo selol e fluído magnético: preparação,
caracterização e avaliação da atividade antitumoral *in vitro***

André Miotello Falqueiro

Ribeirão Preto
2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Nanocápsulas contendo selol e fluído magnético: preparação,
caracterização e avaliação da atividade antitumoral *in vitro***

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas para obtenção do Título de
Mestre em Ciências

Área de Concentração: Medicamentos e
Cosméticos

Orientado: André Miotello Falqueiro

**Orientador: Prof. Dr. Antonio Cláudio
Tedesco**

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

Falqueiro, André Miotello

Nanocápsulas contendo selol e fluído magnético: preparação, caracterização e avaliação da atividade antitumoral *in vitro*.

Ribeirão Preto, 2011.

69 p.; 30cm.

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

Orientador: Tedesco, Antonio Claudio

1. Selol. 2. Fluído magnético. 3. Câncer.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do aluno: André Miotello Falqueiro

Título do trabalho: Nanocápsulas contendo selol e fluído magnético: preparação, caracterização e avaliação da atividade antitumoral *in vitro*.

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas para obtenção do Título de
Mestre 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: _____

*Aos meus pais, ao meu irmão, aos meus familiares, amigos e amigas,
que acreditam e sempre acreditaram em mim e no meu trabalho.*

Agradecimentos

Primeiramente gostaria de agradecer aos meus pais José Maurício e Sônia e aos meus familiares pelo apoio incondicional e pelo incentivo sempre, para que eu possa continuar galgando em busca dos meus objetivos.

Ao meu irmão Gabriel pela amizade, companheirismo e momentos de diversão.

Ao Professor Doutor Antonio Claudio Tedesco pelos ensinamentos e pela confiança depositada no meu trabalho durante todo esse tempo de convivência.

À todos do Laboratório de Fotobiologia e Fotomedicina pelo tempo de convívio, pelo aprendizado científico e pelos momentos de descontração, gostaria de agradecer a todos mesmo, pois cada um teve a sua parcela de contribuição para o meu desenvolvimento profissional e pessoal.

Aos grandes amigos e amigas que fiz em Ribeirão Preto, amigos da Cueca Virada, de Quintas dos Amigos, amigos nas horas de dificuldade, mas muito mais nos momentos de alegria, que foram tantos, e que fizeram com que minha adaptação em Ribeirão se tornasse muito fácil.

À Professora Doutora Clarice Aoki Osaku, por ter me encaminhado e me incentivado a cursar o mestrado nessa Universidade e a Professora Doutora Maria José Vieira Fonseca, por ter aberto as portas para que eu pudesse realizar estágio curricular em seu laboratório e conseqüentemente passar no mestrado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pela concessão da bolsa de mestrado e pelo apoio financeiro para que a realização dessa pesquisa se tornasse viável (2009/13208-3).

Aos funcionários e a Pós-Graduação em Ciências farmacêuticas pelo auxílio e ajuda durante o curso do Mestrado.

Bom mesmo é ir à luta com determinação,
abraçar a vida com paixão,
perder com classe e vencer com ousadia,
porque o mundo pertence a quem se atreve
e a vida é "muito" para ser insignificante.

Augusto Branco

RESUMO

FALQUEIRO, A. M. **Nanocápsulas contendo selol e fluido magnético: preparação, caracterização e avaliação da atividade antitumoral *in vitro***. 2011. 69 f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

O Câncer nas últimas décadas tem se tornado um evidente problema de saúde pública mundial. Os números de novos casos que surgem a cada ano e as altas taxas de mortalidade levam os pesquisadores a procurar formas de conter o avanço dessa doença. A principal forma de tratamento e que possui a maior incidência de cura é o uso de quimioterápicos, que são substâncias químicas utilizadas isoladas ou em combinação, com o objetivo de tratar as neoplasias malignas. Entretanto eles atuam sem especificidade, não destruindo seletivamente e exclusivamente as células tumorais o que causa graves efeitos colaterais aos pacientes. Com o intuito de aumentar a seletividade do tratamento, diminuir a toxicidade e aumentar o poder de cura o presente trabalho utiliza duas abordagens para o combate do câncer, a nanotecnologia (uso de sistemas de liberação de fármacos) e a hipertermia. Foram preparadas, caracterizadas e avaliadas quanto à atividade antitumoral *in vitro* nanocápsulas contendo o agente quimioterápico selol (composto semi-sintético provindo do óleo de girassol e que possui selênio na sua estrutura) e fluido magnético iônico (composto por nanopartículas magnéticas de maghemita, $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$). Ao total foram preparadas quatro diferentes formulações pelo método de nanoprecipitação descrito por Fessi com algumas modificações. As nanocápsulas apresentaram um tamanho de partícula máximo de 230,5 nm ($\pm 4,5$), com índice de polidispersividade $< 0,267$ ($\pm 0,05$) e potencial zeta que variou de -54,4 mV ($\pm 3,4$) a -28,6 mV ($\pm 4,3$). Foram realizadas análises da morfologia das nanocápsulas através de microscopia eletrônica de transmissão que confirmaram o tamanho nanométrico do sistema preparado. Todas as formulações demonstraram ser estáveis durante o tempo 3 meses quando armazenadas a temperatura de 4°C. Nos estudos celulares foram utilizadas as linhagens B16-F10 (melanoma murino) e OSCC (carcinoma epidermóide de boca humano), sendo que as mesmas mostraram diferentes comportamentos quando incubadas com as formulações em diferentes concentrações. Na linhagem B16-F10 foi observado um maior efeito de morte causado pelo selol (a viabilidade celular chegou a 52,5 % $\pm 8,4$), já quando o campo magnético foi utilizado não foi possível observar um aumento da morte celular. No estudos com a linhagem OSCC, a mesma demonstrou resistência quando foi tratada com selol e na ausência de campo magnético, já quando o campo magnético foi utilizado a viabilidade celular chegou a 33,3% ($\pm 0,3$), indicando um forte efeito hipertêmico nesta linhagem. Mais estudos devem ser realizados para entendermos o efeito do sistema preparado perante diferentes linhagens celulares, no entanto podemos confirmar o sucesso no preparo do mesmo e a capacidade de causar morte de diferentes células neoplásicas, o que indica uma importante arma para atuar futuramente no combate do câncer.

Palavras-chave: selol, fluido magnético, nanocápsulas, câncer, hipertermia.

ABSTRACT

FALQUEIRO, A. M. **Nanocapsules containing selol and magnetic fluid: preparation, characterization, and evaluation of *in vitro* antitumor activity**. 2011. 69 f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

In the latest decades, cancer has become a clear public health problem worldwide. The neoplastic diseases increase each year and high mortality rates lead researchers to develop new approaches able to contain the progress of this disease. The main treatment type which has the highest incidence of cure is based on chemotherapeutic agents used alone or in combination. However, they act without specificity and selectively destroying both tumor and normal cells causing serious side effects to patients. In order to enhance the selectivity of the treatment decreasing toxicity and increase the healing power, the present study employs two approaches to treat the cancer, nanotechnology (the use of drug delivery systems) and hyperthermia (magnetic fluid). Nanocapsules containing the chemotherapeutic agent selol (semi-synthetic compound coming from sunflower oil and that has selenium in its structure) and maghemite magnetic nanoparticles ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) were prepared, characterized, and evaluated in respect with their *in vitro* antitumor activity. Four different formulations were prepared by the nanoprecipitation method described by Fessi et al. with some modifications. The nanocapsules presented a particle size up to 230.5 nm (± 4.5) with polydispersity index of 0.267 (± 0.05), and zeta potential ranged from -54.4 mV (± 3.4) to -28.6 mV (± 4.3). The transmission electron microscopy analysis of nanocapsules confirmed the nanometric size system prepared. All formulations proved to be stable during 3 months as stored at 4°C . The cell lines studied were B16-F10 (murine melanoma) and OSCC (oral squamous cell carcinoma). These cell lines showed different behavior after incubation at different formulation concentrations. For cytotoxicity study on B16-F10 cells, it was observed a strong effect caused by Selol (cell viability reached $52.5\% \pm 8.4$). On the other hand, there was no cytotoxic effect on B16-F10 cells ($p > 0.05$) under magnetic field application. OSCC cell line showed a resistance to treatment with selol and in the absence of AC magnetic field. However, after magnetic field activation the cell viability reached $33.3\% (\pm 0.3)$ indicating a strong hyperthermic effect on OSCC cells. Therefore, it has been confirmed nanocapsules containing selol and magnetic fluid are able to destroy B16-F10 or OSCC neoplastic cells indicating an important weapon for future work in the treatment against cancer.

Keywords: Selol, magnetic fluid, nanocapsules, cancer, hyperthermia.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Processo de divisão e metástase celular (Extraído de Ache, 2011)	2
Figura 2. Estimativa de novos casos de câncer para o ano de 2010 na população brasileira. <i>Fonte: MS/Instituto Nacional de Câncer – INCA.</i>	4
Figura 3. Nanocarreadores para detecção e terapia do câncer (Adaptado de PEER et al., 2007).....	7
Figura 4. Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas.....	9
Figura 5. Estrutura química dos polímeros utilizados em nanopartículas.....	11
Figura 6. Estrutura química do Selol (5% Se).....	13
Figura 7. Representação de um sistema de liberação de droga baseado na vetorização magnética (Adaptado de PANKHURST et al., 2003).....	15
Figura 8. Fases da Hipertermia (Adaptado de Vertress, 1999).	17
Figura 9. Ilustração do aparelho de campo magnético utilizado nos ensaios de magnetotoxicidade.....	21
Figura 10. Preparação das nanopartículas de Selol + Fluido magnético iônico.....	23
Figura 11. Metabolização do MTT para o sal Formazan pelas células viáveis.....	30
Figura 12. Microscopia eletrônica de transmissão das nanocápsulas.....	38
Figura 13. Análise do tamanho de partícula em função do tempo de armazenamento das diferentes formulações a 4 °C por 3 meses.....	39
Figura 14. Análise do potencial zeta em função do tempo de armazenamento das diferentes formulações a 4 oC por 3 meses.....	40
Figura 15. Varredura do espectro de absorção UV-VIS (300-800 nm) de uma solução de Selol em diclorometano (concentração de 6,25 µg/ml).....	41

Figura 16. Ilustração da linhagem neoplásica de melanoma murino B16-F10 na fase de confluência.	48
Figura 17. Ilustração da linhagem de carcinoma epidermóide de boca humano (OSCC) na fase de confluência.	48
Figura 18. Viabilidade celular da linhagem B16-F10 tratada com as diferentes formulações e na ausência de campo magnético.	49
Figura 19. Viabilidade celular da linhagem B16-F10 tratada com as diferentes formulações e na presença de campo magnético.	51
Figura 20. Viabilidade celular da linhagem OSCC tratada com diferentes formulações na ausência de campo magnético.	53
Figura 21. Viabilidade celular da linhagem OSCC tratada com diferentes formulações na presença de campo magnético.	54

LISTA DE TABELAS

Tabela I. Tamanho de partícula, índice de polidispersividade (IPd) e potencial zeta (ζ) das diferentes formulações de nanocápsulas.....	35
Tabela II. Resultados da ANOVA unilateral para o modelo linear do método avaliado.....	42
Tabela III. Precisão intradia e interdia.....	43
Tabela IV. Resultados da exatidão para o método analisado.	44
Tabela V. Seletividade do método analisado.....	44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	análise de variância
B16-F10	linhagem celular de melanoma metastático pigmentada
CE	carcinoma epidermóide
CT	controle
DMSO	dimetilsulfóxido
DP	desvio padrão
DPR	desvio padrão relativo
E. E.	eficiência de encapsulação
EHL	equilíbrio hidrófilo-lipófilo
EPM	Erro padrão médio
FDA	Food and drug administration
FMI	fluido magnético iônico
He-Ne	Hélio-neônio
ICH	International Conference on Harmonisation (Conferência Internacional de Harmonização)
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IPd	Índice de polidispersão
LD	limite de detecção
LQ	limite de quantificação
MHz	megahertz
MS	Ministério da saúde
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MTT	(brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)2,5-difenil-2H Tetrazólico])
m/v	massa/volume
mV	milivolts

NF	Nanocápsulas + Fluido magnético iônico
nm	nanômetro
NS	Nanocápsulas + Selol
NSF	Nanocápsulas + Selol + Fluido magnético iônico
NV	Nanocápsulas Vazias
Oe	Oersteds
OMS	Organização Mundial da Saúde
OSCC	linhagem celular de carcinoma epidermóide de boca humano
PGA	poli(ácido glicólico)
PLA	poli(ácido láctico)
PLGA	copolímero poli-láctico-co-glicólico
Rpm	rotações por minuto
Se	selênio
SFB	soro fetal bovino
TFA	ácido trifluoroacético
TFD	Terapia Fotodinâmica
UV-Vis	ultravioleta-visível
v/v	volume/volume
γ -Fe ₂ O ₃	maghemita

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE FIGURAS.....	iii
LISTA DE TABELAS.....	v
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	vi
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Câncer: Considerações Gerais	1
1.2 Nanomedicina.....	5
1.3 Nanopartículas Poliméricas	8
1.4 Selol: Um composto a base de selênio	12
1.5 Nanopartículas magnéticas	14
1.6 Hipertermia.....	16
2. OBJETIVOS	19
2.1 Objetivo geral	19
2.2 Objetivos específicos.....	19
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	20
3.1 Materiais	20
3.2 Aparelhagem.....	21
3.3 Preparação das nanocápsulas.....	22
3.4 Caracterização físico-química das suspensões	23
3.4.1 Determinação do tamanho de partícula, índice de polidispersão e carga de superfície (potencial zeta) das nanocápsulas.....	23
3.4.2 Análise morfológica das nanocápsulas.....	23
3.4.3 Estudo de estabilidade das formulações	24
3.4.4 Determinação do conteúdo total e eficiência de encapsulação do selol nas nanocápsulas.....	24
3.4.5 Quantificação do selol nas nanocápsulas.....	24
3.5 Validação de método analítico espectrofotométrico para determinação do selol nas nanocápsulas.....	25
3.5.1 Determinação do comprimento de onda de absorção máxima do selol em espectrofotômetro	25
3.5.2 Linearidade	25
3.5.3 Limite de detecção e limite de quantificação	26

3.5.4 Precisão.....	26
3.5.5 Exatidão	27
3.5.6 Seletividade	27
3.6 Estudos <i>in vitro</i> (Toxicidade celular)	27
3.6.1 Linhagem metastática de melanoma murino	27
3.6.2 Linhagem de carcinoma epidermóide de boca	28
3.6.3 Manutenção das culturas celulares	28
3.6.4 Ensaio de citotoxicidade <i>in vitro</i> (ausência de campo magnético).....	29
3.6.5 Ensaio de citotoxicidade <i>in vitro</i> (presença de campo magnético)	29
3.6.6 Ensaio de viabilidade celular – Teste da atividade mitocondrial por MTT.....	30
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
4.1 Preparação e caracterização das nanocápsulas	32
4.1.1 Método de preparação	32
4.1.2 Tamanho médio das nanopartículas, índice de polidispersividade e potencial zeta.....	35
4.1.3 Análise morfológica das nanocápsulas.....	38
4.1.4 Estabilidade das formulações	39
4.2 Validação da metodologia analítica.....	40
4.2.1 Determinação do comprimento de onda de absorção máxima	41
4.2.2 Linearidade	42
4.2.3 Limite de Detecção (LD) e Quantificação (LQ).....	43
4.2.4 Precisão.....	43
4.2.5 Exatidão	43
4.2.6 Seletividade	44
4.3 Eficiência de encapsulação	45
4.4 Experimentos <i>in vitro</i>	45
4.5 Linhagens celulares estudadas.....	47
4.5.1 Ensaio de toxicidade sobre as linhagens celulares B16 e OSCC	48
5. CONCLUSÕES.....	55
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56

1. INTRODUÇÃO

1.1 Câncer: Considerações Gerais

Câncer é o termo aplicado a um conjunto de mais de 100 patologias que causa muito temor à sociedade, por ter se tornado um estigma de mortalidade e dor. A palavra câncer, de origem latina (*cancer*), significa "caranguejo", e foi empregada em analogia ao modo de crescimento invasivo, que pode ser comparado às pernas do crustáceo, que as introduz na areia ou lama para se fixar e dificultar sua remoção (Ministério da Saúde, 1971).

As células normais de todo organismo vivo coexistem em harmonia citológica, histológica e funcional, harmonia esta orientada no sentido da manutenção da vida. De acordo com suas características morfológicas e funcionais, determinadas pelo próprio código genético, e com sua especificidade, as células estão agrupadas em tecidos, os quais formam os órgãos (MERIC et al., 2003).

Sabe-se que o crescimento celular responde às necessidades específicas do corpo e é um processo cuidadosamente regulado. Esse crescimento envolve o aumento da massa celular, a duplicação do ácido desoxirribonucléico (ADN) e a divisão física da célula em duas células filhas idênticas (mitose). Tais eventos ocorrem por meio de fases conhecidas como G1 - S - G2 - M, que integram o ciclo celular (ALBERTS et al., 2008).

É certo que fatores de crescimento e hormônios, de alguma forma, estimulam as células para se dividir. Presumivelmente, apenas sua capacidade de ligar-se a receptores específicos de superfície celular os capacita a controlar os processos celulares. O mecanismo de controle do crescimento celular parece ser dependente de fatores estimulantes e inibidores e, normalmente, estaria em equilíbrio até o surgimento de um estímulo de crescimento efetivo, sem ativação do mecanismo inibidor. Tal estímulo ocorre quando há exigências especiais como, por exemplo, para reparo de uma alteração tissular. As células sobreviventes se multiplicam até que o tecido se recomponha e, a partir daí, quando ficam em íntimo contato umas com as outras, o processo é interrompido (inibição por contato) (ALBERTS et al., 2008).

Em algumas ocasiões, entretanto, ocorre uma ruptura dos mecanismos reguladores da multiplicação celular e, sem que seja necessário ao tecido, uma célula começa a crescer e dividir-se desordenadamente. Tal célula pode resultar, então, em clones de células descendentes, herdeiras dessa propensão ao crescimento e divisão anômalos, insensíveis aos

mecanismos reguladores normais, que resultam na formação do que se chama de tumor ou neoplasia, que pode ser benigno ou maligno (Figura 1) (SIMPLICIO et al., 2002).

Figura 1. Processo de divisão e metástase celular (Extraído de Ache, 2011).

As células neoplásicas são agressivas e incontroláveis e, pelo fato de se multiplicarem rapidamente, elas apresentam a capacidade de invadir de forma destrutiva os tecidos e órgãos vizinhos, bem como áreas distantes do organismo (processo metastático), levando o indivíduo à morte (LUZ, P. P., 2008). Logo, o câncer não é uma doença homogênea, trata-se de uma enorme variedade de formas de câncer, que acometem pessoas com qualquer idade, expostas a diferentes fatores de risco e que respondem de distintas maneiras aos inúmeros tratamentos, sendo, portanto, difícil englobar em um único termo o universo dos acontecimentos relativos a essa doença (WEREBE, 2000).

Diversas situações podem perturbar o comportamento normal das células, tais como: agentes ambientais (como o alcatrão e outros poluentes inalados na fumaça do cigarro, por exemplo, ou os raios ultravioletas presentes na luz solar em maior quantidade em certas horas do dia); agentes biológicos (sabe-se que a infecção por vírus oncogênico que causa verrugas genitais é um fator que predispõe para o câncer de colo do útero); ou mesmo predisposições genéticas ligadas a desordens hormonais (há certos tipos de câncer de mama que dependem de

alterações na resposta do organismo aos hormônios femininos, e essas alterações podem ocorrer mais frequentemente em pessoas da mesma família) (LUZ, P. P., 2008). Esses e outros fatores causam uma “metamorfose”, isto é, uma mudança no padrão de comportamento de certas células (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2000; COTRAN et al., 2005; SILVA, 2006).

O câncer é uma das principais causas de morbidade e de mortalidade no mundo (GARCIA, 2005). A taxa de mortalidade associada ao câncer vem crescendo nos últimos anos em função do envelhecimento populacional, resultante do processo de industrialização que implicou diretamente nas mudanças de hábitos da sociedade. Esses fatos nos apontam que essa doença é considerada, hoje em dia, um problema de saúde pública e que devemos nos mobilizar para buscarmos sua prevenção e até mesmo a cura (Santos e Cruz, 2001).

O grupo de Pesquisa do Laboratório de Fotobiologia e Fototomedia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo (FFCLRP-USP) vem, desde 1995, trabalhando com diferentes abordagens em busca de novas tecnologias e tratamentos para aumentar a sobrevida de pacientes com câncer. O grupo estuda a Terapia Fotodinâmica através do desenvolvimento de trabalhos que avaliam as propriedades fotoquímicas, fotofísicas e fotobiológicas de novos sistemas de liberação de fármacos fotossensíveis aplicados à TFD (NUNES et al., 2004; GOMES et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2006; PRIMO et al., 2008)

Em 1999, a equipe supervisionada pelo Dr. Guilherme Cestari Filho iniciou os estudos clínicos com a TFD no Hospital Amaral de Carvalho em Jaú – SP, tratando pacientes com câncer nas cordas vocais, estômago, garganta e pulmão. Além das aplicações clínicas, têm sido realizadas pesquisas científicas para o desenvolvimento de novas fontes de luz laser.

No ano seguinte, foram iniciados tratamentos de doenças de pele utilizando TFD, no Departamento de Dermatologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP, com a participação de um grupo multidisciplinar composto por farmacêuticos, químicos, médicos e físicos.

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 (ÚNICO), ligada ao Departamento de Dermatologia da Unifesp (Universidade Federal de São Paulo).

O câncer, no mundo, é responsável por 7,6 milhões de mortes, cerca de 13 % do total de mortes ocorridas em 2008. O tabagismo, o consumo abusivo de álcool, má alimentação e sedentarismo são alguns dos fatores de risco que contribuem para o seu desenvolvimento (GLOBOCAN, 2008).

No Brasil, segundo o Ministério da Saúde e o Instituto Nacional do Câncer, 489.270 novos casos de câncer surgiram em 2010. Sendo, entre esses, o câncer de próstata o tipo que mais acomete pessoas do sexo masculino, com 52.350 novos casos, e o câncer de mama o que mais acomete o sexo feminino, com 49.240 casos (Figura 2).

Localização Primária Neoplasia Maligna	Estimativa de Casos Novos		
	Masculino	Feminino	Total
Próstata	52.350	-	52.350
Mama Feminina	-	49.240	49.240
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.800	9.830	27.630
Cólon e Reto	13.310	14.800	28.110
Estômago	13.820	7.680	21.500
Colo do Útero	-	18.430	18.430
Cavidade Oral	10.330	3.790	14.120
Esôfago	7.890	2.740	10.630
Leucemias	5.240	4.340	9.580
Pele Melanoma	2.960	2.970	5.930
Outras Localizações	59.130	78.770	137.900
Subtotal	182.830	192.590	375.420
Pele não Melanoma	53.410	60.440	113.850
Todas as Neoplasias	236.240	253.030	489.270

Figura 2. Estimativa de novos casos de câncer para o ano de 2010 na população brasileira.
Fonte: MS/Instituto Nacional de Câncer – INCA.

Há várias modalidades de tratamento do câncer que podem ser divididas em: tratamento cirúrgico, radioterapia e tratamento clínico, o qual engloba quimioterapia, hormonioterapia, imunoterapia e uso de bloqueadores enzimáticos.

A cirurgia é uma das principais modalidades terapêuticas no tratamento do câncer, desde que o tumor apresente localização anatômica favorável e seja diagnosticado antes da ocorrência de um processo metastático. Pode ser curativa, quando compreende a remoção total da massa neoplásica e é diagnosticada antes de gerar metástases, e paliativa, quando a incisão reduz o tumor e retarda a evolução da doença. A cirurgia pode ser exclusiva ou combinada a outros métodos de tratamento como radioterapia e/ou quimioterapia. Em muitos casos, porém, ocorrem complicações pós-operatórias que podem gerar seqüelas físicas e funcionais (RANG et al., 2004).

A radioterapia é uma modalidade utilizada quando a neoplasia está localizada em regiões que inviabilizam a intervenção cirúrgica ou em casos de reincidência após cirurgia (MARKS et al., 1991). Baseia-se na destruição de células por meio da absorção da energia incidente. A radiação danifica a estrutura química interna das células cancerígenas impedindo-as de se multiplicarem, efeito que leva as células à morte por apoptose ou por necrose (MURAD e KATZ, 1990; COHEN-JONATHAN et al., 1999).

Já a quimioterapia é, dentre as modalidades de tratamento, a que possui maior incidência de cura, incluindo muitos dos tumores mais avançados, e a que mais aumenta a sobrevida dos portadores de câncer. O tratamento utiliza agentes químicos que interferem no processo de crescimento e divisão celular, sendo que tais agentes podem ser utilizados tanto de forma isolada quanto em combinação (FONSECA et al., 2000; TADOKORO e FONSECA, 2000; BONASSA e SANTANA, 2005).

A pesquisa quimioterápica visa, principalmente, à descoberta de novos agentes capazes de inibir especificamente a multiplicação de células neoplásicas, sem afetar a divisão celular normal (FUCHS et al., 2004). A partir da década de 40, ocorreu um enorme progresso na compreensão dos processos neoplásicos, havendo uma rápida expansão no arsenal de agentes citotóxicos disponíveis (STEWART, 2007). Entre os protocolos terapêuticos de primeira escolha atualmente empregados na terapia contra o câncer, a quimioterapia e a radioterapia são destituídos de toxicidade seletiva, provocando efeitos colaterais graves (KATZUNG, 1998; REIS, 2006; LIANG et al., 2010), dentre os quais podemos citar a inibição da resposta imunológica, a qual é crítica para a recuperação do paciente. O conceito de intensidade da dose, ou aumento da quantidade de quimioterápicos aplicados por unidade de tempo, tem sido alvo de intensa investigação (SILVA, 2006). Nesse sentido o emprego de sistemas transportadores de fármacos vem ao encontro da necessidade de diminuição da dose com a otimização dos efeitos terapêuticos, podendo assim, entre outras vantagens, aumentar a seletividade do agente antitumoral, minimizar sua toxicidade e elevar as taxas de cura (SURENDIRAN et al., 2009).

1.2 Nanomedicina

O desenvolvimento de uma nova droga biologicamente ativa envolve muito mais que a síntese de uma substância que terá determinado efeito no corpo humano. O pesquisador deve considerar como a droga será transportada para determinada parte do corpo e, uma vez, atingido o local desejado, torná-la disponível para exercer o seu efeito. Entretanto, isso não é

uma questão trivial e, em alguns casos, o desenvolvimento de um sistema de liberação adequado pode ser tão complexo quanto o desenvolvimento da droga em si (DATE et al., 2006; RAWAT et al., 2006). A terapia contra o câncer é um exemplo disso. A quimioterapia é considerada a principal arma para combater o câncer, mas apresenta desvantagens, como a pouca especificidade, o que requer a administração de altas doses e pode gerar graves efeitos colaterais sistêmicos, necessitando, assim, a interrupção do tratamento em muitos pacientes (HALEY e FRENKEL, 2008; ORIVE et al., 2005; VASIR e LABHASETWAR, 2005).

Os sistemas de liberação de drogas são os responsáveis por reduzir algumas das maiores desvantagens do tratamento quimioterápico, incluindo a toxicidade, o curto tempo de meia-vida da droga e repetidas administrações (ALLEN e CULLIS, 2004). A possibilidade de delinear diferentes sistemas de liberação para uma liberação controlada e contínua do agente terapêutico exerceu um amplo impacto na utilização dos quimioterápicos e melhorou a qualidade de vida dos pacientes.

O desenvolvimento de sistemas de liberação controlada representa uma das principais áreas das ciências biomédicas, envolvendo uma abordagem científica multidisciplinar. Um sistema de liberação controlada (“drug delivery system”) pode ser definido como um sistema que é capaz de liberar uma molécula biologicamente ativa em um local específico do corpo a uma taxa (velocidade) específica. 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 (LIU et al., 2005; ORIVE et al., 2005).

Esses sistemas de liberação podem ser produzidos em uma escala muito reduzida de tamanho, em uma abordagem denominada nanotecnologia, que pode ser definida como a engenharia e a produção de materiais utilizando componentes em escala atômica e molecular (FERRARI, 2005). A nanomedicina envolve a utilização da nanotecnologia a favor da saúde humana e do bem-estar. O uso da nanotecnologia tem revolucionado o campo da medicina, permitindo que nanopartículas com dimensões de 1 a 100 nm sejam delineadas e utilizadas para diagnóstico, terapêutica e como ferramenta biomédica em pesquisas (MEDINA et al., 2007; PRIMO et al., 2008; RODRIGUES et al., 2009; FALQUEIRO et al., 2011).

Os nanomateriais possuem uma grande área superficial em relação ao seu volume e suas propriedades físico-químicas tais como a interação com outras moléculas são distintas em relação a materiais que possuem uma escala de tamanho maior (ALEXIS et al., 2008).

O uso da nanotecnologia na medicina 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 as nanopartículas poliméricas, lipossomas, dendrímeros, nanotubos de carbono, entre outros (Figura 3).

Figura 3. Nanocarreadores para detecção e terapia do câncer (Adaptado de PEER et al., 2007).

A liberação da droga no tecido alvo pode ocorrer de duas maneiras: liberação ativa e passiva (CHO et al., 2008). A liberação passiva se aproveita da permeabilidade diferenciada do tecido tumoral. A alta vascularização que propicia o rápido crescimento do tecido, e o fato do mesmo possuir uma arquitetura “defeituosa” devido à proliferação celular descontrolada, torna fácil o acesso para ação das drogas quimioterápicas (JAIN, 2001). Alguns

medicamentos podem, ainda, ser administrados como pró-fármacos ou drogas inativas, que uma vez expostas ao ambiente tumoral, acabam se tornando ativas (SINHA et al., 2006).

A maioria das nanopartículas poliméricas se aproveita de dois fatores: o capilar endotelial do tecido maligno é descontínuo e, conseqüentemente, mais permeável a macromoléculas em comparação com o capilar de tecidos normais, o que permite o extravasamento das nanopartículas poliméricas que estão na circulação para o interstício do tumor. O outro fator que contribui para o acúmulo preferencial das nanopartículas no tecido tumoral é a drenagem linfática defeituosa da região, que irá resultar em um maior acúmulo da droga. Como resultado, a concentração das nanopartículas poliméricas na região pode atingir níveis de concentração de 10 a 100 vezes maior em comparação com a administração da droga livre. Esses efeitos foram primeiramente descritos por Maeda (MAEDA e MATSUMURA, 1989).

Já a liberação ativa é normalmente conseguida quando se conjuga ligantes na superfície da nanopartícula, permitindo, assim, um acúmulo preferencial da droga no tecido tumoral. Essa abordagem é utilizada para direcionar as nanopartículas para se ligarem a carboidratos, receptores ou antígenos contidos na superfície da célula tumoral (SINHA et al., 2006).

Em geral, o tamanho nanométrico dessas partículas permite um aumento da internalização da droga em vários tipos de células e o seu acúmulo seletivo em locais específicos (PANYAM e LABHASETWAR, 2003). Os nanocarreadores podem oferecer muitas vantagens em relação à droga livre como (PEER et al., 2007):

- proteger a droga da degradação prematura
- prevenir que a droga interaja prematuramente com o sistema biológico
- aumentar a absorção da droga em um tecido específico (por exemplo, tumoral)
- controlar a farmacocinética e o perfil de liberação da droga no tecido
- melhorar a penetração intracelular da droga

1.3 Nanopartículas Poliméricas

Nanopartículas poliméricas é uma expressão coletiva usada para designar tanto nanoesferas quanto nanocápsulas, as quais diferem entre si segundo a composição e organização estrutural. As nanoesferas são formadas por uma matriz polimérica compacta, enquanto as nanocápsulas são constituídas por um núcleo líquido (geralmente oleoso)

envolvido por uma membrana polimérica caracterizando um sistema nanovesicular do tipo reservatório (Figura 4) (QUINTANAR-GUERRERO et al., 1998; SCHAFFAZICK et al., 2003). O núcleo (ou cavidade) das nanocápsulas pode conter a substância ativa nas formas líquida ou sólida, como uma dispersão molecular. Essas nanopartículas têm recebido uma atenção especial como sistemas de liberação devido a sua estabilidade e a maior facilidade na modificação de sua superfície (VAUTHIER et al., 2003; HERRERO-VANRELL et al., 2005).

Figura 4. Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas.

Os fármacos veiculados através de nanocápsulas podem estar localizados no núcleo oleoso e/ou adsorvidos à parede polimérica externa. As vantagens das nanocápsulas em relação às nanoesferas é o baixo conteúdo de polímero e a maior capacidade de carregamento de fármacos lipofílicos (BLOUZA et al., 2006). A veiculação do princípio ativo no interior de nanocápsulas permite mudar o perfil farmacocinético (absorção, distribuição, metabolismo e excreção) e farmacodinâmico (ação terapêutica) dos compostos encapsulados com conseqüente melhoria de sua ação, biodisponibilidade e/ou redução da toxicidade (MOSQUEIRA et al., 2000; REIS et al., 2006; DE MARTIMPREY et al., 2009).

Existem vários métodos relatados na literatura para a preparação de nanopartículas poliméricas, os quais podem ser, de forma geral, classificados em métodos baseados na polimerização *in situ* de monômeros dispersos ou na precipitação de polímeros pré-formados. A nanoprecipitação, também conhecida como nanodeposição do polímero pré-formado, é um dos métodos mais utilizados para a preparação de nanopartículas e pode ser explicada pela turbulência interfacial durante a difusão, decorrente da miscibilidade entre os solventes empregados. Gotículas de solvente de tamanho nanométrico encontram-se na interface e são estabilizadas pelo agente de estabilização. Quando a difusão do solvente está completa, ocorre a agregação polimérica (QUINTANAR-GUERRERO et al., 1998). Para a preparação das nanocápsulas na fase orgânica, são adicionados o óleo, o polímero (insolúvel no óleo) e o

tensoativo lipofílico; a fase orgânica é adicionada na fase aquosa que contém o tensoativo hidrofílico e o polímero precipita na interface óleo/água. O diâmetro das nanopartículas formadas situa-se entre 100 e 500 nm (FESSI, 1989).

Os polímeros biodegradáveis utilizados podem ter origem natural ou sintética. Geralmente, os sintéticos apresentam vantagens por permitirem modificações de suas propriedades durante o processo de síntese, diferentemente dos naturais, podendo ser divididos em:

Polímeros naturais: são sempre biodegradáveis como, por exemplo, o colágeno, a celulose e a quitosana e são muito utilizados como matrizes em liberação de fármacos.

Polímeros naturais modificados: um problema encontrado em polímeros naturais é que eles freqüentemente levam muito tempo para serem degradados. Isso pode ser resolvido adicionando-se grupos polares às cadeias que, por serem mais lábeis, podem diminuir o tempo de degradação.

Polímeros sintéticos: são também largamente utilizados como, por exemplo, poli(etileno), poli(álcool vinílico), poli(ácido acrílico), poli(acrilamidas), poli(etilenoglicol) e poliésteres. No caso dos poliésteres, estes são mais utilizados e têm no poli(glicolide) o polímero alifático linear mais simples.

O critério de seleção de um polímero biodegradável considera suas propriedades mecânicas e seu índice de degradação, propriedades dependentes das características físicas e químicas do material (LU e CHEN, 2004).

O emprego dos polímeros biodegradáveis para o controle de liberação de fármacos baseia-se em propriedades de biodegradabilidade e biocompatibilidade. Homo- e copolímeros derivados de poli(ácido láctico) (PLA), poli(ácido glicólico) (PGA), poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) (Figura 5) e poli(ϵ -caprolatona) são amplamente empregados na preparação de carreadores de liberação controlada de diversos fármacos. Esses polímeros, poliésteres alifáticos, são degradados principalmente pela hidrólise da ligação éster. Muitos trabalhos têm demonstrado a importância do emprego terapêutico desses materiais poliméricos em sistemas nanocarreadores (LAMPRECHT et al., 2000; LU e CHEN, 2004; SINHA et al., 2004). O uso desses materiais para a preparação de nanopartículas permite uma liberação sustentada da droga no sítio de ação por um período de dias e até semanas.

Figura 5. Estrutura química dos polímeros utilizados em nanopartículas.

A vantagem do PLGA sobre outros polímeros biorreabsorvíveis, como o PLA, por exemplo, é o fato de requerer um menor tempo para sua completa degradação {Bergsma, 1995 42 /id}. Após administração, esses polímeros sofrem hidrólise no organismo formando subprodutos (ácido lático e ácido glicólico) biologicamente compatíveis e metabolizáveis que serão removidos do organismo pelo ciclo do ácido cítrico. Os produtos de degradação polimérica são formados lentamente e não afetam as funções normais das células. Esses polímeros têm sido testados quanto à toxicidade e segurança em modelos animais, e estão sendo empregados atualmente em humanos para suturas reabsorvíveis, implantes ósseos e implantes contraceptivos. Também são utilizados como enxerto para órgãos artificiais e, recentemente, como suportes na pesquisa de engenharia de tecidos (PANYAM e LABHASETWAR, 2003).

Os pesos moleculares dos polímeros variam de 2.000 até mais de 100.000 e as proporções de comonômeros de ácido lático e ácido glicólico para o PLGA variam de 85:15 a 50:50. Para o polímero PLGA, a diminuição da proporção lactídeo/glicolídeo gera grande influência na cristalinidade e na taxa de hidrólise do polímero e, conseqüentemente, na velocidade de liberação do fármaco através da matriz polimérica (DESHPANDE et al., 1998; MU e FENG, 2003).

Vários fatores influenciam a estabilidade das suspensões coloidais como, por exemplo, a adsorção de moléculas ativas à superfície das nanopartículas e a presença de tensoativos adsorvidos. Além disso, a avaliação da estabilidade química dos polímeros formadores dos colóides, sob diferentes condições de armazenagem, é de fundamental importância. O tamanho da partícula, o potencial zeta, a distribuição da massa molar, o teor de fármaco e o pH são geralmente os parâmetros físico-químicos que podem ser utilizados para monitorar a estabilidade das suspensões coloidais poliméricas (SCHAFFAZICK et al., 2003).

1.4 Selol: Um composto a base de selênio

O selênio (Se) é um mineral essencial para o corpo humano cujo papel biológico foi estabelecido após a descoberta de que o mesmo é incorporado às proteínas do organismo, compondo os centros ativos de importantes enzimas, como a glutathione peroxidase e as selenoproteínas P e W. O mineral também é importante na proteção metabólica do estresse oxidativo e é considerado um importante elemento no combate ao câncer {Suchocki, 2003 66 /id}.

O selênio está presente em alimentos como castanha do Pará, cereais, grãos e vegetais (RAYMAN, 2000; TAPIERO et al., 2003; FERGUSON et al., 2004) e seu papel como antioxidante e como agente contra o câncer é bem documentado na literatura (HIRAOKA et al., 2001; Wei et al., 2001; TAPIERO et al., 2003; GHOSH, 2004). Além disso, tem sido provado que uma adequada concentração de selênio pode restaurar a sensibilidade de agentes quimioterápicos da resistência citostática de células malignas {BJORKHEM-BERGMAN et al., 2002; JONSSON-VIDESATER et al., 2004}.

A primeira evidência de que o selênio pode conter a progressão tumoral foi apresentada em 1949, em um trabalho em que a adição do mineral na dieta de ratos causava significativa redução tumoral (CLAYTON e BAUMANN, 1949). Mesmo esses pesquisadores ignoraram os resultados por causa da imagem negativa que havia em relação ao selênio. Outras evidências foram apresentadas em 1957 por Schwarz e Foltz (SCHWARZ e FOLTZ, 1957) e, a partir daí, o selênio foi considerado um elemento anticarcinogênico. Entre os mecanismos sugeridos para prevenção do câncer pelo selênio, podemos citar seu efeito na morte celular programada (apoptose), efeitos no reparo do DNA, o papel nas seleno-enzimas, efeito no metabolismo carcinogênico e o efeito no sistema imune (WHANGER, 2004).

Os alimentos, em geral, contêm as formas orgânicas do Selênio como selenometionina e selenocisteína, mas a maioria dos experimentos que envolvem suplementação utilizando selênio tem utilizado as formas inorgânicas, como o selenito (SUCHOCKI et al., 2003). A absorção e o uso das duas formas são diferentes. Sabe-se que a forma inorgânica reage rapidamente com a glutathione peroxidase presente nos eritrócitos, formando selenodiglutathione, um composto que possui propriedades anticarcinogênicas e induz apoptose em células tumorais humanas (MCKENZIE et al., 1998). Entretanto, o principal problema relacionado ao uso desse composto é sua alta toxicidade e reatividade contra alguns constituintes biologicamente ativos do organismo humano. Sabe-se também que os compostos a base de selênio que possuem maior atividade de eliminação dos radicais livres e como agentes anticancer devem conter selênio com nível de oxidação +4 (SUCHOCKI et al., 2003).

Com isso, o grupo de pesquisa polonês procurou sintetizar um composto a partir de seleniotriglicerídeos contendo selênio com esse nível de oxidação capaz de gerar baixa toxicidade. Tal composto foi denominado Selol.

O Selol é um novo composto quimioterápico semissintético que possui o selênio na sua estrutura polimérica (HIRAOKA et al., 2001), sendo uma mistura de seleniotriglicerídeos obtidos a partir do óleo de girassol (Patente Pol. PL 176530 (Cl. A61K31/095)) (figura 3). O composto foi sintetizado no Departamento de Análise de Drogas da Universidade Médica de Varsóvia, na Polônia, e é bem menos tóxico que outros compostos a base de selênio (JASTRZEBSKI et al., 1995).

Figura 6. Estrutura química do Selol (5% Se).

O perfil de distribuição do selol em ratos foi avaliado após a administração do composto pelas vias oral, subcutânea e intraperitoneal, sendo que as maiores concentrações de selol administradas nas formas orais e subcutânea foram encontradas após 2 e 2,5 horas, respectivamente (JASTRZEBSKI et al., 1997), o que indica que a absorção do selol através do trato gastrointestinal é alta. Foi constatado também que o selol foi distribuído pelo corpo todo e que as maiores concentrações foram encontradas na glândula supra-renal, testículos, epidídimo, córtex cerebral e na substância branca do cérebro, o que indica que ele atravessa a barreira hemato-encefálica, sugerindo assim uma alta lipofilicidade (JASTRZEBSKI et al., 1997).

O metabolismo do Selol foi investigado e experimentos revelaram a sua completa eliminação dentro de 24 horas na urina. Os resultados também indicaram que a ação

farmacológica do Selol é mais complexa em comparação com compostos clássicos a base de selênio (ZAGRODZKI et al., 2000) e que o composto possui menor toxicidade, sendo possível a administração de maiores doses de selênio, o que pode acarretar em uma atividade anticancer mais potente.

1.5 Nanopartículas magnéticas

Nas últimas duas décadas o uso de micro e nanopartículas magnéticas em aplicações biomédicas tem se tornado cada vez mais comum (MACAROFF et al., 2006; BABINCOVA et al., 2008; DENNIS et al., 2009; DI CORATO et al., 2011). Essas partículas são utilizadas em ressonância magnética nuclear e também em imunoenaios laboratoriais. Além disso, muitos trabalhos caminham para a utilização das nanopartículas magnéticas para o tratamento do câncer através da hipertermia e para o controle e transporte vetorizado de moléculas farmacêuticas e terapia gênica (PANKHURST et al., 2003).

O nosso grupo de pesquisa do Laboratório de Fotobiologia e Fotomedicina iniciou seus trabalhos com fluidos magnéticos e terapia hipertêmica no ano de 2000, em parceria com o Professor Paulo C. de Moraes do Instituto de Física da Universidade de Brasília, responsável pela síntese e caracterização da maioria dos fluidos utilizados pelo grupo.

Na história recente do grupo, Rodrigues (2009) preparou e caracterizou nanopartículas de BSA contendo o agente fotossensibilizante silício (IV) ftalocianina e fluido magnético iônico composto por nanopartículas magnéticas de maghemita, recobertas ou não com citrato. Já Maracroff (2009) investigou as características fotofísicas e fotobiológicas de um sistema nanoparticulado no qual foram associados clorina e fluido magnético para o tratamento antitumoral por terapia fotodinâmica e magnetohipertermia *in vitro* e *in vivo*.

O princípio da vetorização magnética das nanopartículas está no potencial de reduzir ou eliminar os efeitos colaterais das drogas quimioterápicas pela redução da sua distribuição sistêmica assim como na possibilidade da administração de menores, porém mais específicas doses dos agentes citotóxicos utilizados em diversos tratamentos (DOBSON, 2006).

A idéia da utilização de micro e nanopartículas magnéticas como transportadores de agentes terapêuticos para a vetorização de determinado tratamento visando a atingir locais específicos no corpo data da década de 70 (SENYEI et al., 1978; WIDDER et al., 1978). Widder e colaboradores desenvolveram micro e nanopartículas magnéticas às quais drogas podiam ser conjugadas. O complexo era, então, administrado via intravenosa ou intra-arterial

e um campo magnético externo era gerado por ímãs permanentes e assim era possível guiar e concentrar a droga em determinados locais, onde estavam os tumores.

A vetorização magnética é baseada na atração das nanopartículas magnéticas através de um campo magnético externo. Na presença de um gradiente de campo magnético uma força de translação será exercida sobre as nanopartículas prendendo-as efetivamente no local alvo e direcionando o complexo para o ímã (Figura 7) (PANKHURST et al., 2003; GRIEF e RICHARDSON, 2005; JOHANNSEN et al., 2007; KONG et al., 2010).

Figura 7. Representação de um sistema de liberação de droga baseado na vetorização magnética (Adaptado de PANKHURST et al., 2003).

Uma vez que o sistema magnético se encontra concentrado no local do tumor ou outro tecido alvo, o agente terapêutico pode ser, então, liberado através da ação de enzimas ou através de mudanças nas condições fisiológicas como pH, osmolaridade ou temperatura levando a um aumento da internalização da droga pelo tumor no sítio alvo (ALEXIOU et al., 2000; MAH et al., 2002).

Muitos fatores devem ser considerados no delineamento de sistemas magnéticos incluindo tanto parâmetros físicos, como as propriedades magnéticas e o tamanho das partículas, a força do campo e a geometria do campo, assim como parâmetros fisiológicos, como a profundidade do alvo, a taxa de fluxo sanguíneo, o suprimento vascular e o peso corporal (GRIEF e RICHARDSON, 2005).

As nanopartículas magnéticas constituem a fase dispersa sólida dos fluídos magnéticos, que são sistemas magnéticos coloidais. Elas se encontram uniformemente distribuídas em uma fase dispersante, líquida, de natureza polar (água) ou apolar (hexano, benzeno, óleos minerais)

(GARCÍA-CERDA et al., 2001; GRAVINA, P. P., 2005). As nanopartículas são monodomínios magnéticos, usualmente esféricas, com diâmetro (D) abaixo de 15 nm e apresentando ordenamento ferromagnético (Fe, Co, Fe_xN_y) ou ferrimagnético (Fe_3O_4 , CoFe_2O_4).

As nanopartículas de óxidos de ferro são as mais empregadas em aplicações biológicas por possuírem excelentes propriedades magnéticas e não serem tóxicas. A magnetita e sua forma oxidada, a maghemita, são as fases de óxidos de ferro mais estudadas e aplicadas em biomedicina (WEISSLEDER et al., 1989).

A característica mais importante de um fluido magnético é a sua estabilidade coloidal, ou seja, a manutenção das nanopartículas em suspensão na forma de objetos isolados, evitando assim a aglomeração e subsequente precipitação. Os fatores intrínsecos associados à estabilidade coloidal referem-se a um equilíbrio envolvendo as interações atrativas e repulsivas entre as nanopartículas. O equilíbrio entre essas interações é modulado pelo movimento Browniano associado às nanopartículas magnéticas no líquido carreador. Uma amostra típica de fluido magnético contém nanopartículas na concentração de 10^{16} a 10^{17} partículas/ cm^{-3} . Assim, a distância média partícula-partícula situa-se entre 20 e 50 nm (MORAIS, 2011).

O comportamento superparamagnético de nanopartículas dispersas em um meio líquido irá permitir que seu movimento seja modulado e controlado por meio da aplicação de um gradiente de campo magnético (GUPTA e GUPTA, 2005). Isso, combinado com a penetrabilidade de campos magnéticos em tecidos humanos, abre muitas aplicações envolvendo o transporte de nanopartículas magnéticas, bem como o carregamento de entidades biológicas, tal como uma droga anticancerígena (ITO et al., 2005).

1.6 Hipertermia

A hipertermia está incluída na lista dos tratamentos convencionais aceitos pela “American Cancer Society” e continua sendo uma das mais poderosas modalidades terapêuticas para melhorar a evolução dos pacientes com câncer (OVERGAARD, 1989). A hipertermia é um procedimento terapêutico empregado para proporcionar aumento de temperatura em uma região do corpo que esteja afetada por uma neoplasia, com o objetivo de causar a lise das células cancerosas. Seu princípio de funcionamento é baseado no fato de que elevadas temperaturas têm o efeito de destruir diretamente as células tumorais, uma vez que estas são menos resistentes a aumentos bruscos de temperatura do que as células normais circunvizinhas (TARTAJ et al., 2003).

Nos seres humanos, existe uma divisão da temperatura corpórea em três grandes faixas. A elevação da temperatura corpórea até $41,8^\circ\text{C}$ é definida como “estado febril” e é

conhecida por ser um estado fisiológico básico que contribui para a defesa do nosso organismo, ativando a liberação de anticorpos e de outras substâncias de defesa, assim como inibindo o crescimento de bactérias e vírus, uma vez que nesse estado há uma alta atividade metabólica (KLUGER, 1986). Estudos têm demonstrado que para cada 1°C de aumento da temperatura corpórea, a taxa de atividade metabólica aumenta 10%. O aumento da temperatura acima de 44 °C leva a desnaturação protéica, resultando na morte celular, efeito que ocorre principalmente nos neurônios, levando-os à apoptose. A faixa de temperatura entre o estado febril (benéfico) e a hipertermia extrema (deletéria), que vai de 41,8 a 44 °C é a faixa de temperatura em que a terapia clínica através da hipertermia exerce seu efeito benéfico (definido como a destruição de tecidos-alvo resultando em mínimos efeitos ao tecido normal) (DICKSON e CALDERWOOD, 1980; DICKSON e CALDERWOOD, 1983).

A janela terapêutica hipertêmica possui quatro fronteiras que foram comprovadas após a realização de muitos estudos. O limite inferior de temperatura ocorre muito próximo do limite superior do estado febril (por volta de 41,8°C). Nessa temperatura, é preciso um tempo de exposição maior para que o efeito citotóxico seja manifestado. O limite superior ocorre a uma temperatura em que uma exposição prolongada irá acarretar sérios danos ao tecido normal (43°C), devendo o tempo de exposição ser reduzido. A linha tracejada na janela terapêutica indica a linha de iso-efeito térmico, que é definida como o intervalo de tempo/temperatura que resulta em morte celular equivalente (Figura 8).

Figura 8. Fases da Hipertermia (Adaptado de VERTRESS, 1999).

O aumento de temperatura requerido pela hipertermia pode ser atingido, entre outros métodos, pelo uso também das nanopartículas magnéticas, processo este conhecido com o nome de magneto-hipertermia ou magnetotermocitólise (TARTAJ et al., 2003; MACAROFF et al., 2006; RODRIGUES et al., 2009).

Nesse método, as nanopartículas magnéticas liberadas no tecido ou na circulação sanguínea geram calor localizado quando submetidas à ação de um campo magnético alternado, gerando dano térmico ao tumor. Quando ativadas pelo campo, as nanopartículas geram calor principalmente devido ao mecanismo de relaxamento Néel e/ou ao movimento Browniano. Partículas pequenas (10-40 nm) são preferidas nas aplicações hipertêmicas devido a sua capacidade de produzir níveis consideráveis de calor com a ação de campos magnéticos relativamente fracos (LV et al., 2005).

A possibilidade de vetorização de nanopartículas magnéticas e conseqüente geração de calor no local desejado levou ao desenvolvimento de várias técnicas de encapsulamento de partículas magnéticas de forma que os sistemas obtidos se tornassem efetivos carreadores de drogas com alta especificidade tumoral para a liberação controlada de agentes quimioterápicos (SUN e ZENG, 2002).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo geral do presente projeto de pesquisa é preparar e caracterizar nanocápsulas contendo a droga quimioterápica selol e fluído magnético iônico (nanopartículas magnéticas de maghemita), assim como avaliar a toxicidade *in vitro* do sistema proposto utilizando as linhagens celulares de melanoma metastático de camundongo (B16-F10) e de carcinoma epidermóide de boca (OSCC), na ausência e na presença de um campo magnético externo.

2.2 Objetivos específicos

- Preparação das formulações contendo selol e fluído magnético;
- Caracterização físico-química das suspensões de nanocápsulas;
- Validação do método analítico espectrofotométrico para quantificação do selol na formulação;
- Avaliação do efeito citotóxico, *in vitro*, das nanocápsulas contendo selol em cultura de células melanocíticas (B16-F10) e de carcinoma epidermóide oral humano (OSCC) na ausência e na presença de um campo magnético externo.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

A substância ativa utilizada é um novo composto semi-sintético produzido a partir de uma mistura de seleniotriglicerídeos provindos do óleo de girassol e que contêm Selênio na concentração de 5% em sua estrutura polimérica, sendo denominado selol (Patente Pol. PL 176530 (Cl. A61K31/095)). Esse composto foi sintetizado e fornecido pelo Professor Piotr Suchocki do Departamento de Análise de Drogas da Universidade Médica de Varsóvia, e pela Professora Ewa Mosiniewicz-Szablewska do Instituto de Física da Academia Polonesa de Ciência, Polônia.

Foram utilizados ainda o polímero biodegradável Poli(D, L ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA, 50:50), o surfactante não-iônico Polaxamer 188 (Pluronic F-68) e o óleo de girassol, todos obtidos da Sigma (Sigma-Aldrich co., St. Louis, MO, EUA). O fosfolípido fosfatidilcolina de soja foi obtido de Lipoïd GmbH (Ludwigshafen, Alemanha).

As nanopartículas (8.9 ± 0.1 nm de diâmetro) magnéticas de maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) utilizadas foram suspensas em fluido magnético iônico e estabilizadas em meio aquoso com baixo pH (SIMIONI et al., 2006), sendo preparadas e caracterizadas pela Professora Dra. Emilia C. D. Lima, do Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás, Goiânia-GO.

Os solventes de grau analítico utilizados foram acetona e diclorometano. O ácido trifluoroacético 99,8 % foi adquirido da Sigma.

Todas as soluções aquosas foram preparadas com água ultra pura, obtidas através do sistema de água Direct-Q 3 (Sistema de purificação de água – Millipore), utilizando filtração no módulo SMARTPAK, onde estão associados um pré-tratamento com filtro de profundidade em poliestireno e carvão ativado, um cartucho de osmose reversa com membrana de poliamida e, em uma terceira etapa, carvão ativado sintético (Organex) e leito misto de resinas de troca iônica, com filtro final Millipak de $0,22 \mu\text{m}$ de poro, resistividade $18,2 \text{ Mohm/cm}$ a 25°C e vazão de $0,5 \text{ L/min}$.

Para os estudos biológicos utilizaram-se os seguintes materiais: meio de cultura RPMI 1640, meio de cultura DMEM, antibiótico (Penicilina $10,000 \text{ U/mL}$ - Streptomicina $10,000 \mu\text{g/mL}$), soro fetal bovino, tampão Hank's, corante azul de tripan e tripsina-EDTA obtidos de (Gibco BRL). O 3[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-brometo difenil tetrazolium (MTT) foi obtido da Sigma e a L-glutamina 2.0 mmol.L^{-1} e anfotericina ($25 \mu\text{g/mL}$) foram adquiridas da Invitrogen.

A solução de soro fetal bovino utilizada no cultivo de células foi pré-aquecida a 56°C , para inativação das enzimas e em seguida estocada em frascos de 10 mL e conservadas no freezer a -20°C . O soro fetal bovino apresenta em sua composição básica insulina, hormônios e vários outros fatores, indispensáveis ao crescimento celular.

Os materiais utilizados no preparo e manutenção das culturas celulares foram: frascos de cultura, pipetas volumétricas, frascos para centrífuga, micro tubos e ponteiras para pipetas automáticas, as quais foram adquiridas da Corning e foram descartadas após o uso. Também foram utilizadas garrafas de vidro e pipetas de vidro, as quais foram autoclavadas antes de sua utilização.

Além destes materiais, estavam disponíveis diferentes solventes orgânicos.

3.2 Aparelhagem

Nos estudos espectrofotométricos foi utilizado o espectrofotômetro de absorção Lambda 20 da Perkin Elmer. Nos estudos de tamanho de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta foi utilizado o equipamento Zetasizer Nano-ZS da Malvern-UK, o qual possui um laser de He-Ne de 4 mW que opera no comprimento de onda de 633 nm, permitindo realizar medidas não invasivas por “backscatter optics” (NIBS), e possuindo a capacidade de determinar tamanho de partículas no intervalo de 2 nm a 3 μm .

A morfologia das nanopartículas foi avaliada através de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET), utilizando um equipamento da Philips modelo CM-120. As análises foram realizadas no Laboratório de Caracterização Estrutural, no Departamento de Engenharia de Materiais da Universidade Federal de São Carlos.

Nos estudos de citotoxicidade em cultura celular na presença de campo magnético foi utilizado um aparelho portátil que opera a 1 MHz e apresenta amplitude de campo de 40 Oe (figura 9), desenvolvido pelo Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Genética e Morfologia da Universidade de Brasília (UnB).

Figura 9. Ilustração do aparelho de campo magnético utilizado nos ensaios de magnetotoxicidade.

Os trabalhos em cultura de células foram realizados em sala asséptica utilizando cabine de segurança biológica Airstream Esco Class II BSC, esterilizada com luz germicida e fluxo contínuo de ar. 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), microscópio convencional axiovert 40 CFL da Zeizz, incubadora Thermo Electron Corporation – Forma Series II, centrifuga centribio e banho termostatizável Isotemp 2100.

Além desses sistemas citados, foram utilizados os seguintes equipamentos: balança eletrônica A-200 DS (Denver Instrument Company), sistema vortex modelo Genie 2, ultrason marca Branson modelo 2210, pH-metro modelo QX 1500 da Qualxtron, autoclave Clear 2001 da Termotron, banho poly science e rotaevaporador buchi. Para o controle da temperatura dos experimentos foram utilizados banhos termostatizáveis.

3.3 Preparação das nanocápsulas

Foram preparadas quatro formulações básicas, que foram utilizadas em todos os estudos: nanocápsulas vazias (branco), nanocápsulas + selol, nanocápsulas vazias + fluido iônico (branco) e nanocápsulas + selol + fluido iônico. As nanocápsulas foram produzidas pelo método de nanoprecipitação descrito por Fessi e colaboradores (1989) com algumas modificações. Para a preparação da fase orgânica primeiramente o polímero, a fosfatidilcolina de soja (lipídeo) e o selol (ou óleo de girassol no caso do branco da formulação) foram solubilizados em acetona. Para preparação da fase aquosa foi adicionado o Poloxamer 188 e o fluido iônico (no caso das formulações que contêm fluido) em água ultra pura sob agitação. Na sequência, a fase orgânica foi gotejada na fase aquosa sob agitação constante de 550 rpm a 40 °C por 20 minutos para melhor homogeneização. A seguir, o solvente orgânico e parte da água foram eliminados com o uso de um rotaevaporador a 40 °C e 120 rpm, até que o volume final atingisse cerca de 10 ml (Figura 10). As nanocápsulas vazias foram preparadas do mesmo modo, mas sem a adição do selol.

Figura 10. Preparação das nanopartículas de Selol + Fluido magnético iônico.

3.4 Caracterização físico-química das suspensões

3.4.1 Determinação do tamanho de partícula, índice de polidispersão e carga de superfície (potencial zeta) das nanocápsulas

O tamanho médio das nanopartículas e a distribuição de tamanho da suspensão coloidal (índice de polidispersão) foram determinados pela análise por espalhamento de luz dinâmico (espectroscopia de correlação de fótons, PCS), o ângulo de incidência do laser em relação à amostra foi de 173° e a temperatura de 25°C . O potencial zeta foi determinado a partir da medida da mobilidade eletroforética das amostras. Para ambas análises $30\ \mu\text{l}$ das amostras foram diluídas em 3 ml de água ultra-pura e foram avaliados três diferentes lotes de amostras usando o equipamento Zetasizer® (Nano ZS, Malvern Instruments, Reino Unido).

3.4.2 Análise morfológica das nanocápsulas

A morfologia das nanocápsulas foi avaliada através da Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM). Após a preparação das formulações uma parte da suspensão de nanocápsulas foi diluída em três partes de água deionizada e sonicada em Banho de Ultra-Som por 20 minutos, uma gota dessa solução foi adicionada em grade de cobre com suporte

de carbono e deixado secar por 24 horas. Após esse período foram realizadas as análises morfológicas das nanopartículas.

3.4.3 Estudo de estabilidade das formulações

A estabilidade das quatro diferentes formulações preparadas foram avaliadas através da determinação dos valores de tamanho de partícula e potencial zeta. As amostras foram armazenadas em frascos de vidro durante 3 meses a uma temperatura de 4 °C. As análises foram realizadas a cada semana para acompanhar possíveis variações dos parâmetros analisados.

3.4.4 Determinação do conteúdo total e eficiência de encapsulação do selol nas nanocápsulas

A determinação do conteúdo total e a eficiência de encapsulação do Selol nas nanocápsulas foram determinados utilizando o método analítico validado como descrito no item 3.5. A equação abaixo (1) foi usada para calcular a eficiência de encapsulação.

$$E.E. (\%) = \frac{CTs - CLs}{CTEs} \times 100 \quad (1)$$

CTs representa a concentração total de selol na formulação de nanocápsulas, CLs a concentração de selol livre presente no sobrenadante da amostra de nanocápsulas submetida a ultracentrifugação/ultrafiltração para separação total da fase aquosa e CTEs é a concentração teórica de selol. O procedimento experimental está descrito no item a seguir.

3.4.5 Quantificação do selol nas nanocápsulas

A determinação do conteúdo de Selol foi avaliado na formulação nanocápsulas + selol utilizando o método proposto descrito no item 3.4.4. Primeiramente para determinar o conteúdo total do quimioterápico, uma alíquota de nanocápsulas (100 µl) foi apropriadamente dissolvida em DMSO (1:1, v/v) e sonicada por 5 minutos, para garantir total liberação do analito da formulação. Após as amostras foram diluídas em diclorometano e analisadas conforme o item 3.5.1.

Já a fração livre de Selol foi determinada pela medida do analito não incorporado presente no ultrafiltrado, o qual foi obtido através da separação da fase aquosa das nanocápsulas usando um procedimento de ultrafiltração/ultracentrifugação (Microcon Ultracel YM-100, Milipore, Irlanda) a $12.857 \times g$ por 1 h a 4°C . A quantidade de Selol encapsulada foi estimada pela diferença entre o conteúdo total do agente quimioterápico e do mesmo livre. Todas as análises foram realizadas em triplicata e as médias dos resultados foram apresentados como erro padrão da média.

3.5 Validação de método analítico espectrofotométrico para determinação do selol nas nanocápsulas

Foram avaliados e determinados os seguintes parâmetros de desempenho analítico para a validação da metodologia por espectrofotometria: linearidade, limite de detecção e quantificação, precisão, exatidão e seletividade.

3.5.1 Determinação do comprimento de onda de absorção máxima do selol em espectrofotômetro

A substância ativa selol (5% de Selênio) fornecida pelo Departamento de Análise de Drogas da Universidade Médica de Varsóvia na Polônia foi solubilizada em diclorometano atingindo assim uma concentração de $50 \mu\text{g/ml}$ de Se na solução padrão. A seguir, em tubos adequados, a solução foi novamente diluída em diclorometano para que fosse atingida a concentração de $6,25 \mu\text{g/ml}$ de Se, e após foi adicionado 20% de TFA (Ácido trifluoroacético - 99,8%) em relação ao volume analisado. A solução foi incubada durante 35 minutos a 35°C e a seguir foi realizada uma varredura de absorbância no intervalo de comprimento de onda de 250 a 600 nm para determinar o comprimento de onda de absorção máxima do selol. Uma vez determinado o comprimento de onda de absorção máximo, o mesmo foi utilizado nos estudos para validação do método analítico.

3.5.2 Linearidade

Para estabelecer a linearidade do método foram construídas seis (6) curvas de calibração em seis (6) níveis diferentes de concentração: 2,08 a $12,5 \mu\text{g/ml}$ de Se ($n = 36$), obtidas a partir da diluição da solução padrão. Nas análises espectrofotométricas foi

estabelecida a lei de Lambert-Beer, utilizando o comprimento de onda de 380 nm, a fim de obter curvas com $r \geq 0,99$, visando atender aos critérios preconizados pela Conferência Internacional de Padronização de requerimentos técnicos para registro de produtos farmacêuticos de uso humano (International Conference on Harmonisation – ICH of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, (ICH Q2(R1), e pela Farmacopéia Americana-2003).

3.5.3 Limite de detecção e limite de quantificação

Os limites de detecção (LD) e limites de quantificação (LQ) do selol para o método desenvolvido foi estimado a partir da curva de calibração resultante do parâmetro linearidade. Os LD e LQ foram calculados de acordo com as equações 2 e 3, respectivamente:

$$LD = (DP/b) \times 3,3 \quad (2)$$

$$LQ = (DP/b) \times 10,0 \quad (3)$$

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

3.5.4 Precisão

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra, ela foi avaliada pela repetibilidade (precisão intra-corrida) e precisão intermediária (precisão inter-corridas). O estudo ocorreu utilizando-se três níveis de concentração: baixa, média e alta (2,08; 6,25 e 12,5 µg Se/ml, respectivamente) (n=9). A repetibilidade foi avaliada através da análise das soluções padrão preparadas em um mesmo dia e sob as mesmas condições experimentais. A precisão intermediária foi determinada em três dias diferentes, preparando-se uma nova solução a cada dia e utilizando as mesmas concentrações da repetibilidade (n=27), sendo avaliadas pela porcentagem do desvio padrão relativo (DPR%).

3.5.5 Exatidão

A exatidão do método analítico foi avaliada pelo método de recuperação do analito. Diferentes concentrações de solução padrão de Selol foram adicionadas a soluções contendo a formulação de nanocápsulas já previamente analisadas. A porcentagem de Selol recuperado foi calculado de acordo com a equação 4:

$$\text{Recuperação (\%)} = [(C_t - C_a)/C_p] \times 100 \quad (4)$$

Onde, C_t é a concentração total de Selol encontrado após a adição do padrão; C_a a concentração de Selol na formulação de nanocápsulas previamente analisada e C_p a concentração de Selol padrão adicionado a formulação.

3.5.6 Seletividade

Para avaliar a possível interferência dos excipientes utilizados na formulação de nanocápsulas foram analisadas soluções contendo diferentes concentrações da solução padrão de selol e nanocápsulas vazias. Em seguida, foram realizadas comparações entre os resultados obtidos das soluções padrão contaminadas com nanocápsulas vazias e as soluções padrão de Selol “sem contaminação”. A análise dos dados foi realizada utilizando o teste t de *Student* (teste bilateral, $p = 0.05$).

3.6 Estudos *in vitro* (Toxicidade celular)

Os estudos envolvendo cultura de células foram realizados com a linhagem metastática de melanoma murino (B16-F10) e a linhagem epidermóide de carcinoma de boca humano (OSCC). As diferentes formulações (em diferentes concentrações) foram testadas para avaliar a citotoxicidade celular do sistema proposto, tanto na ausência quanto na presença do campo magnético.

3.6.1 Linhagem metastática de melanoma murino

A linhagem melanocítica B16-F10 proveniente de camundongos C57BL – 6J altamente tumorigênica e com capacidade metastática (FIDLER, 1973) foi cultivada em atmosfera

úmida com 5% CO₂ a 37°C, em meio RPMI 1640, pH 6,9, suplementado com 10% de SFB inativado (Gibco BRL), antibiótico (Penicilina 10,000 U/mL - Streptomicina 10,000 µg/mL) (Gibco BRL), anfotericina (25 µg/mL) (Invitrogen), L-glutamina 2 mM, 1,5 g/L de bicarbonato de sódio e HEPES 10 mmol.L⁻¹.

3.6.2 Linhagem de carcinoma epidermóide de boca

A linhagem OSCC proveniente de um carcinoma epidermóide de boca humano foi cultivado em atmosfera úmida, com 5% CO₂ a 37°C, em meio DMEM, pH = 7.4, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab), antibiótico (Penicilina 10,000 U/mL - Streptomicina 10,000 µg/mL) (Gibco BRL), anfotericina (25 µg/mL) (Invitrogen) e L-glutamina 2.0 mmol.L⁻¹ (Invitrogen).

3.6.3 Manutenção das culturas celulares

As linhagens celulares utilizadas nos estudos foram obtidas da ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, VA). Após o descongelamento dos tubos criogênicos contendo as células, a suspensão das mesmas forma adicionadas a tubos falcon de 15 ml contendo 1 ml de meio de cultura na concentração de 20% de soro fetal bovino. O tubo falcon foi centrifugado a 1500 rpm por 5 minutos para que fosse formado o pellet de células. Após terminado o procedimento o pellet foi ressuspensionado em 1 ml de meio de cultura (20% SFB) e adicionado a frascos de cultura de células de 25 cm² contendo previamente 5 ml de meio de cultura. O frasco de cultura foi cultivado em incubadora até que as células atingissem a fase de confluência.

Após até atingirem a confluência, as células foram lavadas com tampão Hank's, retiradas dos frascos de cultura com tripsina (0,05%) e colocadas novamente na incubadora por 3 minutos para soltar as células, já que as mesmas crescem aderidas ao frasco de cultura. Depois desse período foi adicionado meio de cultura 10% para inativação da tripsina e essa suspensão foi repassada para tubos falcon para centrifugação a 1500 rpm por 5 minutos. O pellet foi então ressuspensionado e as células adicionadas a frascos de cultura de 75 cm² contendo previamente 10 ml de meio de cultura a 10% de SFB, sendo acondicionadas novamente na incubadora para atingir o estado de confluência. As células foram ressuspensionadas e replaqueadas até atingir o número ideal de frascos de cultura para realização dos experimentos. O meio foi trocado de

duas a três vezes por semana. Para os experimentos foram usadas células entre a 3^a e 6^a passagem com no mínimo 90% de confluência.

3.6.4 Ensaio de citotoxicidade *in vitro* (ausência de campo magnético)

Após atingirem a confluência, as células foram lavadas com tampão Hank's e soltas com solução de tripsina 0,05%. Adicionou-se meio de cultura completo a esta suspensão de células, que foi então transferida para um tubo falcon e centrifugada a 1500 rpm por 5 minutos, o sobrenadante foi retirado e as células foram ressuspensas em meio de cultura completo.

Em seguida, foram colocados 100 µL da suspensão de células e 100 µL do corante vital azul de tripan 0,4 % (SIGMA) em um tubo *ependorf*. O corante azul de tripan foi utilizado em um teste conhecido como teste de exclusão do azul de tripan, para controle da viabilidade celular, onde as células com rompimento de membrana plasmática são marcadas pelo corante e excluídas da contagem para o plaqueamento celular.

A suspensão foi homogeneizada e cerca de 10 µL foram aplicados na câmara de Neubauer. As células dentro da câmara foram então observadas em microscópio óptico (Axiovert 40CFL da Zeiss) no campo claro na objetiva com aumento de 10 X. Foram contadas apenas as células vivas (não coradas em azul).

Após a contagem foi calculado o volume necessário a ser pipetado para que na solução de plaqueamento a concentração celular fosse de $1,0 \times 10^5$ células/mL. A seguir as células foram, transferidas para placas de poços múltiplos (24 ou 96 poços) e cultivadas por 24 horas.

No dia seguinte, o meio de cultura completo foi retirado das placas e as soluções contendo as formulações nas diferentes concentrações estudadas foram incubadas por 3 horas em meio de cultura com 3% de soro fetal bovino. Após o período de incubação o meio contendo as formulações foi retirado, as células foram lavadas com tampão Hank's e um novo meio de cultura com 10% de soro fetal bovino foi adicionado às células. Após 24 horas aos tratamentos descritos acima, o meio de cultura foi retirado e foi aplicado o ensaio de determinação da viabilidade celular (MTT)

3.6.5 Ensaio de citotoxicidade *in vitro* (presença de campo magnético)

Para avaliar o efeito do campo magnético sob as diferentes linhagens estudadas, foi realizado o estudo de citotoxicidade na presença das diferentes formulações preparadas. As células foram preparadas de maneira análoga ao descrito no item 3.6.3.

Após o período de incubação com as formulações, as soluções foram retiradas e lavadas cuidadosamente com tampão Hank's e então submetidas ao campo magnético, utilizando-se um aparelho portátil, operando a 1 MHz com amplitude de campo de 40 Oe, com tempo de aplicação de 3 minutos em cada poço.

Depois da aplicação do campo, o tampão Hank's foi retirado e foi adicionado meio de cultura completo contendo 10% de SFB, as células foram levadas à estufa de CO₂ por um período de 24 horas. Após este intervalo, foi realizado o ensaio do MTT para a avaliação da viabilidade celular.

Os dados encontrados através do teste de MTT foram analisados utilizando o programa Microsoft Office Excel 2007. A análise da significância estatística entre a média do controle e a média dos grupos de células tratadas foi realizada pelo teste de análise de variância One-way ANOVA, com $p < 0,05$ seguido do pós-teste Tukey t-test para múltiplas comparações.

3.6.6 Ensaio de viabilidade celular – Teste da atividade mitocondrial por MTT

Este ensaio é apropriado para se determinar espectrofotometricamente o número total de células, como função da atividade mitocondrial das células intactas, ou seja, células vivas.

O método do MTT é simples e confiável e produz resultados reprodutíveis. O componente chave é o corante (3[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-brometo difenil tetrazolium) ou MTT. Soluções de MTT dissolvidas em meio ou em soluções salinas, balanceadas na ausência de indicador vermelho de fenol, são de cor amarelada. A dehidrogenase mitocondrial das células viáveis atua sobre o anel tetrazolium, produzindo cristais de formazan de cor púrpura, os quais são insolúveis em solução aquosa (Figura 11).

Figura 11. Metabolização do MTT para o sal Formazan pelas células viáveis.

Os cristais são, então, dissolvidos em isopropanol, o produto obtido é monitorado espectrofotometricamente através de sistemas de análise de multiplacas. Um aumento ou diminuição no número de células resulta em uma mudança concomitante na quantidade do formazan formado, indicando assim o grau de citotoxicidade (MOSMANN, 1983; VISTICA, 1991).

O método do MTT de monitoramento da citotoxicidade *in vitro* é bem estabelecido para o uso com placas de poços múltiplos. Para melhores resultados, devem ser empregadas as células na sua fase logarítmica de crescimento.

Inicialmente, as células são removidas da incubadora, levadas à capela de fluxo laminar e distribuídas nas placas de poços múltiplos. A estas células adiciona-se o MTT em uma quantidade igual a 25% do volume total do meio de cultura. A cultura é então re-incubada por 4 horas. Após o período de incubação, as células são removidas da estufa de CO₂ e os cristais de formazan resultantes, após dissolução pela adição de uma solução de isopropanol, são avaliadas por espectroscopia.

O teste é finalizado, através de medidas espectrofotométricas da absorbância no sistema de leitura de microplacas (ELISA) da Molecular Device modelo Versa Max, no comprimento de onda de 560 nm, descontando-se a absorbância de fundo a 690 nm ((Freshney, 1986)).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O objetivo principal do presente trabalho foi a preparação e caracterização de nanocápsulas contendo o composto a base de selênio Selol e nanopartículas magnéticas de maghemita, utilizando assim o uso sinérgico da quimioterapia e da hipertermia para potencializar o efeito terapêutico do sistema proposto em linhagens de células neoplásicas.

4.1 Preparação e caracterização das nanocápsulas

Para os estudos foram preparadas quatro diferentes formulações:

- Nanocápsulas Vazias (NV)
- Nanocápsulas + Selol (NS)
- Nanocápsulas + Fluido magnético iônico (NF)
- Nanocápsulas + Selol + Fluido magnético iônico (NSF)

4.1.1 Método de preparação

Muitos artigos que relatam a preparação de nanopartículas poliméricas indicam o método de nanoprecipitação patenteado por Fessi, 1989, como sendo o mais utilizado para a preparação de nanocápsulas (MORA-HUERTAS et al., 2010). Fatores como a simplicidade do procedimento, o baixo custo, a capacidade de reproduzir o tamanho de partícula e a alta taxa de eficiência de encapsulação (CHORNY et al., 2002; CAUCHETIER et al., 2003; PINTO et al., 2006) contribuem para que o método seja amplamente utilizado. Aproximadamente 50% das pesquisas desenvolvidas na área utilizam este método, seguido pelo método de emulsificação-difusão e de dupla emulsificação.

As principais variáveis relacionadas ao processo de preparação das nanocápsulas são aquelas associadas as condições de adição da fase orgânica na fase aquosa, tais como a velocidade de injeção da fase orgânica, a velocidade de agitação da fase aquosa, o método de adição da fase orgânica e a proporção de fase orgânica em relação a fase aquosa. Da mesma forma as características das nanocápsulas são influenciadas pela natureza e concentração de seus componentes (PLASARI et al., 1997; CHORNY et al., 2002; LEGRAND et al., 2007; LINCE et al., 2008).

A formação das nanopartículas é instantânea e o procedimento inteiro é realizado em apenas uma etapa. A nanoprecipitação ocorre por meio de uma dessolvatação rápida do polímero quando a solução polimérica é adicionada à solução aquosa. O solvente orgânico difunde-se rapidamente na fase aquosa, e o polímero precipita, envolvendo o fármaco. A formação das nanopartículas é governada pelo efeito Marangoni, ou seja, o efeito da turbulência interfacial que ocorre entre a fase orgânica e a fase aquosa, causada por fenômenos de variações de fluxo e da tensão interfacial. A nanoprecipitação produz freqüentemente nanopartículas de pequeno tamanho e não requer grande velocidade de agitação, sonicação ou altas temperaturas, mas requer que o fármaco seja pouco solúvel em água, de modo a fornecer uma elevada taxa de encapsulação (QUINTANAR-GUERRERO et al., 1998).

As nanocápsulas são constituídas basicamente pelo polímero, tensoativos, óleo e o fármaco, além do solvente orgânico que é utilizado no processo de preparação e posteriormente eliminado (SCHAFFAZICK et al., 2003).

As fases empregadas nas preparações são denominadas fase solvente e fase não-solvente. A fase solvente (fase orgânica) na maioria dos casos é composta pela acetona, mas também pode ser composta por uma mistura de solventes, como o etanol e o hexano. A fase não-solvente é também denominada fase aquosa, pois é composta na maioria dos casos por água (MORA-HUERTAS et al., 2010).

Um dos componentes mais importantes da preparação de nanocápsulas é o polímero. O PLGA é um dos polímeros biodegradáveis que vem sendo mais utilizado na preparação desses nanocarreadores. O mesmo já foi aprovado pelo FDA para uso em humanos (ATHANASIOU et al., 1996; TALJA et al., 1997) e há um grande número de trabalhos que relatam a incorporação de drogas anticancer nessas nanopartículas (DANHIER et al., 2009; WANG et al., 2009; ACHARYA e SAHOO, 2010).

A associação dos monômeros de PLA ao de PGA, irá formar o copolímero Poli (D,L-láctico-co-glicólico) (PLGA). O PLA irá permitir uma liberação mais sustentada do ativo por ser um polímero com características mais hidrofóbicas, já o PLGA pode possuir diferentes proporções de PLA e PGA, sendo que o PLGA (50:50) por ter maior proporção de ácido glicólico permite uma liberação mais rápida do ativo, devido a uma maior velocidade de degradação polimérica. A velocidade de degradação desses polímeros é regulada por variações na composição, na massa molar do polímero e nos métodos de preparo das nanopartículas (MOGHIMI et al., 2001; DURÁN et al., 2006; MITTAL et al., 2007). Os subprodutos de degradação do PLGA são atóxicos, já que unidades monoméricas de ácido

lático e glicólico ocorrem naturalmente no corpo humano e são facilmente eliminados através da via glicolítica formando subprodutos como dióxido de carbono e água (KONERACKA et al., 2008; KUMARI et al., 2010).

Outro componente fundamental na preparação das nanopartículas são os tensoativos, fundamentais para evitar a agregação das partículas durante a estocagem, sendo que a combinação de um tensoativo com elevado EHL, no caso o poloxamer 188®, com um de baixo EHL, como a fosfatidilcolina fornece formulações mais estáveis. Um valor de EHL elevado indica tensoativos com propriedades predominantemente hidrofílicas ou polares, enquanto os valores baixos indicam características lipofílicas ou apolares (AULTON, 2005).

Os fosfolipídeos possuem grande eficiência em manter a estabilidade da emulsão, sendo utilizado na fabricação das nanocápsulas como estabilizante da fase oleosa da emulsão óleo/água formada na primeira etapa de preparação, reduzindo a energia de superfície na interface e, devido à grande afinidade pela fase oleosa e aquosa, dispõe-se na interface juntamente com o poloxamer 188® (FENG e HUANG, 2001).

O polioxietileno-polioxipropileno, chamado comercialmente de Poloxamer 188® ou Pluronic® F-68, é um copolímero bloco não-iônico muito utilizado como agente estabilizante em sistemas nanoparticulados, que é capaz de proporcionar aumento na viscosidade da fase externa aquosa aumentando a estabilidade da dispersão coloidal (KIBBE, 2000; CUNHA JUNIOR et al., 2003).

Quanto ao óleo utilizado há alguns critérios que devem ser levados em contato para a sua escolha como constituinte das nanocápsulas, tais como ausência de toxicidade, elevada estabilidade físico-química, incapacidade de solubilizar o polímero e alta afinidade pelo fármaco. Algumas propriedades do óleo utilizado no preparo, tais como densidade e viscosidade podem interferir no diâmetro das partículas obtidas (BOUCHEMAL et al., 2004). Como a droga utilizada já é uma solução oleosa provinda de óleo de girassol e que possui o selênio, responsável pela atividade anticancer na sua estrutura polimérica, não foi necessária a adição do óleo para dissolver a droga de interesse. Nas formulações vazias foi utilizado o óleo de girassol.

O fluido magnético iônico (FMI) utilizado neste trabalho foi estabilizado em uma solução com pH 1,52, sendo assim, as nanopartículas de maghemita que o compõe tem carga superficial positiva, as quais, de maneira geral, são rapidamente retiradas da circulação sanguínea e induzem mais reações inflamatórias do que as carregadas negativamente ou as que possuem carga neutra, não satisfazendo as condições para biocompatibilidade do material (LACAVA, 2009). Para minimizar este efeito adverso e aproveitar as propriedades

magnéticas vantajosas do FMI, as nanopartículas de maghemita foram incorporadas nas nanocápsulas afim de obter sistemas magnéticos biocompatíveis.

Para o preparo das formulações, a concentração de polímero foi utilizado de acordo com a composição sugerida para o método de nanoprecipitação (MORA-HUERTAS et al., 2010), onde a concentração foi mantida em 0,75% (m/v). Já as concentrações da lecitina de soja e do poloxamer 188 foram baseadas em um estudo realizado por Siqueira-Moura (2011), que por meio de um estudo de planejamento fatorial foram determinadas as concentrações de lecitina de soja (entre 1,60 a 1,90 % (m/v)) e de poloxamer 188 (entre 1,10 a 1,40 % (m/v)) que forneciam os valores de tamanho de partícula, índice de polidispersividade e potencial zeta adequados para o sistema em escala nanométrica, além de conferir uma ótima estabilidade para a formulação.

A concentração de Selol utilizada foi padronizada pela adição crescente de quantidades deste quimioterápico na formulação e pela verificação ou não de sedimento do mesmo quando a formulação era armazenada. A quantidade de óleo de girassol nas formulações vazias foi a mesma que a de Selol fixada (0,1 g).

4.1.2 Tamanho médio das nanopartículas, índice de polidispersividade e potencial zeta

Para caracterização do sistema, primeiramente foi realizada a análise do tamanho de partícula. O tamanho das nanopartículas variou de 130,5 nm (Nanocápsulas + Selol) a 230,5 nm (Nanocápsulas + Selol + Fluido magnético iônico) de diâmetro (Tabela I).

Tabela I. Tamanho de partícula, índice de polidispersividade (IPd) e potencial zeta (ζ) das diferentes formulações de nanocápsulas.

	Nanocápsulas Vazias (NV)	Nanocápsulas + Selol (NS)	Nanocápsulas + Fluido iônico (NF)	Nanocápsulas + Selol + Fluido iônico (NSF)
Tamanho (nm)	134,2 $\pm$ 7,2	130,5 $\pm$ 4,5	155,8 $\pm$ 0,2	230,5 $\pm$ 4,5
IPd	0,159 $\pm$ 0,074	0,165 $\pm$ 0,034	0,242 $\pm$ 0,002	0,267 $\pm$ 0,05
ζ (mV)	-54,4 $\pm$ 3,4	-50,9 $\pm$ 4,3	-28,6 $\pm$ 4,3	- 30,8 $\pm$ 3,1

A técnica utilizada, espalhamento da luz (LS), também conhecida como espectroscopia de correlação de fótons (PCS), tem como objetivo auxiliar na caracterização dos sistemas de veiculação preparados, garantindo que os mesmos apresentem dimensões nanométricas. As medições foram feitas a temperatura ambiente, em um ângulo de detecção de 173° e a posição da medição na cubeta foi automaticamente determinada pelo software do equipamento. O equipamento realizou em média 12 determinações para cada análise (MALVERN, 2007).

Este é considerado um método rápido para determinar o tamanho médio, a distribuição de tamanho e o índice de polidispersão de uma amostra. A partir do movimento Browniano das partículas, o tamanho das mesmas é calculado através de propriedades do espalhamento da luz. O modelo do cálculo baseia-se no princípio de que cada partícula é vista como uma esfera, assim, a presença de alguns agregados, aumentará drasticamente as medidas do tamanho médio das partículas. É também necessário conhecer a viscosidade do meio de suspensão. Os resultados devem ser interpretados com cautela, pois vários parâmetros como viscosidade ou pH do meio de suspensão, temperatura, concentração e sedimentação das partículas podem influenciar os dados (BORCOVEK, 2002).

Nos resultados apresentados, pode-se observar um aumento no tamanho de partícula na formulação NSF, o que poderia ser explicado pelo método de análise de medição do tamanho de partícula, o qual avalia o raio hidrodinâmico da mesma, sendo que este aumento do tamanho pode estar relacionado à presença de possíveis agregados de nanopartículas magnéticas na formulação coloidal, conseqüentemente resultando também em um aumento do índice de polidispersão das formulações contendo fluido e Selol.

Os valores encontrados estão de acordo com as características de dispersões coloidais obtidas pela técnica de nanoprecipitação utilizando o PLGA como polímero (AVGOUSTAKIS et al., 2003; MORA-HUERTAS et al., 2010).

As nanopartículas também apresentaram um índice de polidispersividade máximo de 0,267 (formulação NSF) indicando uma distribuição do tamanho de partículas homogêneo.

A distribuição do tamanho de partícula de uma formulação é analisado levando em conta o IPd. O cálculo do IPd leva em consideração o tamanho médio das partículas, o índice de refração do solvente, o ângulo de medição e a variância da distribuição. Em uma escala de 0 a 1, um IPd próximo a 0,1 está associado a uma alta homogeneidade na população de partículas, enquanto valores de IPd elevados sugerem uma ampla distribuição de tamanho ou mesmo várias populações (GAUMET et al., 2008).

O tamanho de partícula e a distribuição do tamanho são os parâmetros mais importantes a serem determinadas das nanopartículas, que ocasionará influência direta na biodistribuição *in vivo*, na toxicidade e na capacidade de atingir o tecido alvo. Além disso haverá influência na taxa de encapsulação da droga, no perfil de liberação e na estabilidade do sistema

O potencial zeta (ζ) também foi analisado. A Tabela I sumariza os valores encontrados nas formulações analisadas. As nanopartículas apresentaram carga superficial negativa, a qual variou de -54,4 a -28,6 mV.

A carga superficial dependerá da natureza da partícula, assim como do meio que a envolve. A carga não pode ser medida diretamente, mas após a aplicação de um campo elétrico em torno dela. As partículas movem-se na presença deste campo elétrico em direção ao eletrodo de carga oposta e, desta forma, o potencial zeta pode ser determinado pela medida da sua velocidade de migração (MALVERN, 2007).

Os fosfolipídeos, os poloxamers e os polímeros constituintes das nanopartículas são os principais componentes presentes nas formulações capazes de influenciar o potencial zeta. Especialmente os polímeros e as lecitinas fornecem um potencial negativo à interface, enquanto que os poloxamers (tensoativos não-iônicos) tendem a reduzir o valor absoluto deste parâmetro (LEGRAND et al., 1999). Em módulo, um valor de potencial zeta relativamente alto é importante para uma boa estabilidade físico-química da suspensão coloidal, pois grandes forças repulsivas tendem a evitar a agregação em função das colisões ocasionais de nanopartículas adjacentes, (SCHAFFAZICK et al., 2003; SONVICO et al., 2006), portanto nanopartículas com potencial zeta de aproximadamente (+/-) 30 são mais estáveis em suspensão (MOHANRAJ e CHEN, 2006).

Essa elevada carga negativa pode ser atribuída a ionização dos grupos carboxílicos terminais presente na cadeia polimérica que se encontra na superfície das nanopartículas (STOLNIK et al., 1995; REDHEAD et al., 2001), e também às lecitinas que possuem grupamentos ácidos livres ou fosfolipídeos carregados negativamente.

Novamente nas formulações contendo fluido houve uma diminuição do valor de potencial zeta, principalmente devido às nanopartículas de maghemita possuírem carga superficial positiva, o que contribui para a diminuição do valor absoluto de potencial zeta.

Teixeira et al (2005) também realizou a caracterização de nanocápsulas de PLGA contendo drogas hidrofóbicas com ação anti-inflamatória e anti-tumoral e obteve nanopartículas com tamanho < 280 nm, IPd < 0,455 e potencial zeta < - 40,9 mV. Barbugli et al (2010), na sua caracterização das nanocápsulas contendo o agente fotossensibilizante

ftalocianina de cloroalúminio obteve valores de tamanho de partícula de 219 nm, IPd 0,248 e potencial zeta de - 46,9 mV, indicando que o sistema preparado no presente trabalho está de acordo com os valores encontrados na literatura para métodos de preparação semelhantes.

4.1.3 Análise morfológica das nanocápsulas

A morfologia das nanocápsulas foi avaliada através de análises por Microscopia Eletrônica de Transmissão, sendo realizadas no Laboratório de Caracterização Estrutural da Universidade Federal de São Carlos.

A microscopia eletrônica de transmissão é uma técnica de microscopia na qual um feixe de elétrons é emitido em direção a amostra ultrafina, interagindo assim com a mesma enquanto a atravessa. A imagem é formada da interação dos elétrons transmitidos através da amostra, sendo ampliada e focada em um dispositivo de imagem (RUNYAN W e SHAFFNER, 1998).

É uma técnica capaz de exibir imagens a uma resolução significativamente maior em comparação aos microscópios óticos devido ao pequeno comprimento de onda dos elétrons, e que vem sendo amplamente utilizada para caracterização morfológica de nanomateriais.

Na Figura 12 A podemos observar as nanocápsulas contendo selol, sendo visível a uniformidade de distribuição do tamanho das nanopartículas e o seu formato esférico. Podemos observar também que o tamanho das mesmas está de acordo com o tamanho determinado pela espectroscopia de correlação de fótons. Já na Figura 12 B podemos observar a incorporação e a presença das nanopartículas magnéticas nas nanocápsulas de PLGA.

Figura 12. Microscopia eletrônica de transmissão das nanocápsulas. A – Nanocápsulas + Selol (escala = 500 nm/ 25.000×); B – Nanocápsulas + Selol + Fluido magnético iônico (escala = 200 nm/ 53.000×).

4.1.4 Estabilidade das formulações

O efeito da estabilidade das formulações em função do tempo foi avaliada através do monitoramento das medidas do tamanho de partícula e potencial zeta. As amostras do mesmo lote foram submetidas a análises semanalmente.

O tamanho de partícula é uma importante propriedade das dispersões coloidais, uma vez que a tendência a sedimentação é determinada por mudanças nesse parâmetro (MAGENHEIM e BENITA, 1991).

As suspensões coloidais normalmente não possuem tendência a separação de fases, até alguns meses após a preparação, pois o processo de sedimentação é lento para partículas submicrométricas, sendo minimizado pelo efeito Browniano. No entanto existem vários fatores que podem afetar a estabilidade de suspensões coloidais (aglomeração e sedimentação) como, por exemplo, a adsorção de moléculas ativas às superfícies das nanopartículas, presença de tensoativos adsorvidos, estabilidade química do polímero utilizado na sua obtenção dentre outros (SCHAFFAZICK et al., 2003).

Como observado na Figura 13 há apenas uma leve variação do tamanho de partícula em função do tempo de armazenamento indicando uma boa estabilidade das formulações no período de 3 meses de armazenamento a 4 °C.

Figura 13. Análise do tamanho de partícula em função do tempo de armazenamento das diferentes formulações a 4 °C por 3 meses. Nanocápsulas vazias □ ; Nanocápsulas + Selol ▒ ; Nanocápsulas + Fluido magnético iônico ■ ; Nanocápsulas + Selol + Fluido magnético iônico ■.

Em relação ao potencial zeta (Figura 14) podemos observar que não houve variação significativa nos valores durante o tempo de armazenamento para todas as formulações analisadas, indicando a contribuição da alta carga negativa das formulações para a estabilidade do sistema.

Todas as formulações estudadas foram obtidas como suspensões coloidais e apresentaram um aspecto leitoso característico das nanocápsulas. Essas preparações apresentaram boa estabilidade físico-química e nenhuma alteração macroscópica foi observada durante o período avaliado, tais como cremagem, sedimentação ou floculação

Figura 14. Análise do potencial zeta em função do tempo de armazenamento das diferentes formulações a 4 oC por 3 meses. Nanocápsulas branco □ ; nanocápsulas + selol ▒ ; nanocápsulas + fluido iônico ▓ ; nanocápsulas + selol + fluido iônico ■ .

4.2 Validação da metodologia analítica

Para garantir que um novo método analítico gere informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, ele deve sofrer uma avaliação denominada validação. A validação de um método é um processo contínuo que começa no planejamento da estratégia analítica e continua ao longo de todo o seu desenvolvimento e transferência. Um processo de validação bem definido e documentado fornece evidências objetivas de que os métodos e os sistemas são adequados para o uso desejado (RIBANI et al., 2004).

4.2.1 Determinação do comprimento de onda de absorção máxima

O espectro de varredura UV-VIS foi avaliado no intervalo de 300 a 800 nm para verificar o comprimento de onda de absorção máxima da amostra de selol em diclorometano e certificar que o mesmo ocorre em 380 nm (Figura 15) (SUCHOCKI et al., 2003).

O grupo polonês sintetizou o selol contendo várias concentrações de Se (2 - 20%), porém o Selol utilizado no presente trabalho possui 5 % de Se, o que significa dizer que 1 ml de Selol contém 50 mg de Se +4.

O método de quantificação foi baseado no trabalho realizado por Suchocki, 2003, sendo desenvolvido um novo método para sua quantificação. Suchocki sugeriu que o selênio + 4 contido nos selenitotriglicerídeos, reage quantitativamente com o TFA na presença de diclorometano formando um conjugado de coloração alaranjada. A natureza/estrutura desse conjugado formado ainda é desconhecido.

O espectro de absorção do conjugado formado pela reação mostrou que o comprimento de onda de absorção máxima é 380 nm, o que está de acordo com o presente trabalho, como demonstrado na Figura 15.

Vários parâmetros que afetam a reação colorimétrica foram investigados por Suchocki, sendo que o estudo mostrou que a máxima sensibilidade do método no comprimento de onda selecionado é atingida quando a concentração de TFA em diclorometano é de 20% (v/v), sendo a temperatura em que a reação ocorre de 35 °C no tempo de 35 minutos.

Figura 15. Varredura do espectro de absorção UV-VIS (300-800 nm) de uma solução de Selol em diclorometano (concentração de 6,25 µg/ml).

4.2.2 Linearidade

A linearidade é a capacidade de uma metodologia analítica em demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado (RDC 899).

A linearidade do método demonstrou proporcionalidade entre as diferentes concentrações de padrão e as absorbâncias. O coeficiente de correlação com valores acima de 0,99 demonstra que as soluções apresentaram boa correlação linear entre a absorbância e as concentrações indicando que os coeficientes de linearidade são adequados. Esta correlação foi verificada na faixa de concentração de 2,08 a 12,5 µg Se/ml.

O ajuste por mínimos quadrados para o método espectrofotométrico revelou um coeficiente de correlação(r) de 0,9997, significando que 99,97 % da variação total em torno da média é explicada pela regressão linear, com os resíduos (erro) de apenas 0,03%. A equação linear foi: $\text{absorbância} = 0,0852 \times [\text{Se, concentração em } \mu\text{g/ml}] - 0,0018$, no entanto, um valor de coeficiente de correlação muito próximo de 1 não é necessariamente o resultado de uma relação linear e, conseqüentemente um teste de falta de ajuste foi empregado (THOMPSON et al., 1994; GONZALEZ et al., 2006).

O teste unilateral de análise de variância (ANOVA) avaliou a qualidade do ajuste do modelo linear. A análise dos dados da linearidade demonstrou ser a regressão altamente significativa, uma vez que o valor de F calculado 10.841,02 para o modelo linear foi maior que o valor crítico F de 4,12 no nível de confiança de 95%. O adequado ajuste das equações lineares foi apoiado pelo valor de F calculado de 1,154 do teste de falta de ajuste o qual foi menor que o valor de F tabelado (2,69), confirmando que os modelos lineares resultantes são adequados.

Tabela II. Resultados da ANOVA unilateral para o modelo linear do método avaliado.

Fonte	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F -relação
Modelo Linear	3,308693	1	3,308693	10.841,02 (4,12) ^a
Residual	0,010377	34	0,000305	
Falta de ajuste	0,001385	4	0,000346	1,154 (2,69) ^b
Erro puro	0,008992	30	0,0003	
Total	3,31907	35		

^{a,b}Valores teóricos de $F(1,34)$ e $F(4,30)$, respectivamente, baseado no teste de ANOVA unilateral em nível de significância $p = 0,05$.

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

Os LD e LQ foram estimados através das equações 2 e 3 descritas no item 3.5.4.

O LD é a menor quantidade de analito presente na amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado sob as condições experimentais estabelecidas, sendo que o mesmo foi de 0,16 µg/ml.

O LQ representa a menor concentração da substância em exame que pode ser quantificada. Neste caso, o LQ foi de 0,49 µg/mL, indicando que o método apresenta-se suficientemente sensível para quantificação do Se contido no selol.

4.2.4 Precisão

A precisão foi determinada pelo estudo em dois níveis: repetibilidade (análises intradia) e precisão intermediária (análises interdia). As análises intradia apresentaram um desvio padrão relativo (DPR) variando de 1,12% a 3,95%. Já para as análises interdia o DPR variou de 0,80% a 2,23% (Tabela III).

De acordo com os resultados pode-se observar a proximidade dos resultados obtidos tanto na baixa, na média e na alta concentração, respeitando assim o DPR de no máximo 5%.

Tabela III. Precisão intradia e interdia.

Concentração	Análises			Análises
(µg/ml)	Intradia DPR (%)			Interdia DPR (%)
	Dia 1	Dia 2	Dia 3	
2,08	3,95	2,96	1,73	2,23
6,25	1,97	1,12	2,12	2,17
12,5	1,87	2,02	1,78	0,80

4.2.5 Exatidão

A exatidão do método analítico foi determinada pela adição de quantidades conhecidas de selol padrão a amostras de formulações pré-analisadas (de concentração conhecida). Os resultados obtidos se encontram na Tabela IV e são expressos como a porcentagem de recuperação do analito adicionado e DPR (%).

Como observado a porcentagem média de recuperação foi de 96,7% a 98,8%, estando os valores dentro do limite estabelecido de 5% para a recuperação, demonstrando assim a capacidade do método em quantificar diferentes concentrações de Se adicionadas já presente nas formulações preparadas. Os resultados do total de Se encontrado e da porcentagem de recuperação são médias para três diferentes amostras.

Tabela IV. Resultados da exatidão para o método analisado.

Se na formulação pré-analisada ($\mu\text{g/ml}$)	Se adicionado ($\mu\text{g/ml}$)	Total de Se encontrado ($\mu\text{g/ml}$)	Recuperação (%)	DPR (%)
4,34	2,08	6,353 ($\pm 0,0513$)	96,7 ($\pm 2,46$)	2,54
4,34	4,16	8,453 ($\pm 0,055$)	98,8 ($\pm 1,32$)	1,34
4,34	6,25	10,396 ($\pm 0,118$)	96,9 ($\pm 1,89$)	1,85

4.2.6 Seletividade

Para avaliar a possível aplicação analítica do método proposto, foi estudado o efeito dos excipientes comumente usados na preparação de nanocápsulas sobre os parâmetros espectroscópicos. A seletividade foi confirmada depois de avaliar que os excipientes não interferiram nos espectros de absorção.

Tabela V. Seletividade do método analisado.

Concentração teórica de Se ($\mu\text{g/ml}$)	Concentração experimental da solução padrão de Selol ($\mu\text{g/ml}$)	Concentração da solução padrão de Se contaminada com NC vazia ($\mu\text{g/ml}$)	<i>t</i> -calculado
2,08	2,098 ($\pm 0,1592$)	2,063 ($\pm 0,0854$)	0,326
6,25	6,303 ($\pm 0,1108$)	6,263 ($\pm 0,1037$)	0,456
12,5	12,583 ($\pm 0,0946$)	12,531 ($\pm 0,0798$)	0,727

Os valores de t calculado foram menores que o valor crítico de t tabelado. Tais resultados indicam que não houve diferença estatisticamente significativa entre as médias das soluções padrão de selol contaminadas com alíquotas da formulação de NC vazia e a média de soluções padrão do analito sem contaminação ($p > 0,05$).

4.3 Eficiência de encapsulação

A eficiência de encapsulação é um importante parâmetro a ser avaliado durante a caracterização das nanocápsulas, uma alta taxa de encapsulação é altamente desejável, já que garante que o princípio ativo estará protegido no interior da nanopartícula e estará disponível para atingir o local de ação desejado. Altos valores de eficiência de encapsulação são conseguidos com o uso de drogas hidrofóbicas, como é o caso do selol.

De acordo com estudos publicados, diversos fatores são capazes de influenciar a quantidade de fármaco associada aos sistemas nanoestruturados, dentre os quais destacam-se as características físico-químicas do fármaco, o pH do meio, as características da superfície das nanopartículas, a quantidade de fármaco adicionada a formulação, a natureza do óleo dentre outros (GOVENDER et al., 1999; GOVENDER et al., 2000; PANYAM et al., 2004).

No presente trabalho a eficiência de encapsulação foi calculada através da técnica de ultrafiltração/ultracentrifugação, na qual a concentração de fármaco livre presente na suspensão, é determinada no sobrenadante após a centrifugação. A concentração total de fármaco por sua vez foi determinada pela completa dissolução das nanopartículas em DMSO. Sendo assim a concentração de fármaco associada às nanoestruturas é calculada em porcentagem pela diferença entre as concentrações de fármaco total e livre, de acordo com a equação 1. A eficiência de encapsulação encontrada foi de 64,9% ($\pm 7,85$) o que indica uma boa capacidade do sistema em incorporar o selol.

4.4 Experimentos *in vitro*

Em linhas gerais quando se trabalha com culturas de células, deve-se seguir procedimentos especiais, a fim de assegurar um crescimento fisiológico sadio da cultura, além da reprodutibilidade dos resultados experimentais. A metodologia de cultivo das linhagens celulares segue basicamente alguns tópicos como: escolha do local de trabalho adequado, técnicas assépticas para crescimento e manutenção de cultura, assepsia de materiais, controle bacteriológico de reagentes e meio de cultura (FILHO, 1994).

Os estoques primários de culturas celulares são fornecidos por diferentes companhias existentes no mercado. Estes estoques primários de células são fornecidos na forma congelada ou na forma de células recém cultivadas. Além disso, juntamente com o lote de células, são fornecidas todas as informações necessárias referentes ao meio de cultura mais apropriado para crescimento, tempo de vida média das culturas, forma de estocagem, etc.

Embora existam diferentes tipos de cultura celular, em geral todas apresentam um diagrama de crescimento básico, em que é possível identificar ao menos três fases distintas de crescimento.

A primeira fase, conhecida como *fase preparatória*, consiste no período no qual não se observa um crescimento apreciável da cultura celular (0 a 5 %). Nesta fase as células se adaptam metabolicamente ao sistema de cultura, ou seja, meio, temperatura, recipiente, etc.

A segunda fase, conhecida como *fase logarítmica ou fase de crescimento*, representa a parte mais importante da cultura, na qual usualmente encontra-se uma porcentagem de crescimento de 90 a 100%. Esta é sem dúvida a melhor fase para execução dos estudos em sistemas celulares, uma vez que a cultura encontra-se em plena atividade metabólica com número máximo de células saudáveis.

A terceira fase, conhecida como *platô*, é caracterizada por apresentar uma população elevada de células, em que geralmente existe uma redução drástica na porcentagem de crescimento (0 a 10 %). Geralmente, nesta última fase, as células não se apresentam fisiologicamente saudáveis e muitas estão mortas sendo, portanto, desfavorável o desenvolvimento de estudos relacionados à atividade celular nesta fase.

A periodicidade que a cultura deve ser alimentada ou o tempo ideal para troca de meio de cultura, ou mesmo, a preparação de uma nova subcultura é determinada por fatores, como:

- 1) Variações bruscas no pH do meio, detectados visualmente pela mudança na cor do indicador presente no meio de cultura;
- 2) Altas concentrações celulares (observadas através do microscópio inverso), caracterizado por aglomeração celular. Em geral ocorre quando a cultura atingiu a fase de platô no diagrama celular;
- 3) Mudanças morfológicas, ou seja, tamanho, geometria das células, granulação ao redor dos núcleos etc.

As culturas celulares envolvidas neste trabalho foram cultivadas em incubadora termostatzada à 37 °C, aerada continuamente com 5,0 % de CO₂, controlando-se sempre o volume, profundidade e superfície de área ocupado pela cultura nos respectivos frascos.

4.5 Linhagens celulares estudadas

Uma das linhagens celulares estudadas é a de melanoma murino. O câncer do tipo melanoma tem origem basicamente nos melanócitos da epiderme. Ocorre geralmente na pele, mas também pode ser encontrado em estruturas oculares pigmentadas, no trato gastrointestinal, na boca e em mucosas genitais. A incidência da forma maligna do melanoma ocorre apenas em 5% dos cânceres de pele, mas vem aumentando ano após ano e causa cerca de 3 vezes mais mortes em relação aos outros tipos de cânceres de pele (JERANT et al., 2000). É um tipo de câncer muito invasivo, altamente metastático, que possui rápida progressão e prognóstico ruim (HOCKER et al., 2008). Alguns pacientes tem graves recaídas, desenvolvem metástase e até morrem após o tratamento. Portanto é importante desenvolver estratégias mais confiáveis e menos tóxicas de combate ao melanoma.

A outra linhagem utilizada é a de carcinoma de boca humano. De acordo com a OMS, o câncer de boca apresenta a quarta maior incidência no mundo, sendo que das diversas neoplasias epiteliais malignas em boca, mais de 95% tem diagnóstico de carcinoma epidermóide. É uma neoplasia invasiva e com potencial para metástases locais e regionais (TABOR et al., 2001; BARNES et al., 2005).

Os aspectos clínicos do CE não são patognomônicos. Segundo Barnes et al, (2005) as lesões pequenas costumam ser assintomáticas. Sendo que o diagnóstico diferencial deve basear-se principalmente nos hábitos de vida. No momento do diagnóstico a maioria dos pacientes já se apresenta com lesões maiores e queixa de sintomatologia dolorosa, o que indica que a doença já está localmente avançada.

Com base nos aspectos descritos acima os estudos *in vitro* foram realizados utilizando como modelo experimental as linhagens neoplásicas B16-F10 (melanoma murino) e OSCC (carcinoma epidermóide de boca humano). As figuras 16 e 17, respectivamente, ilustram estas linhagens na fase de confluência celular.

Figura 16. Ilustração da linhagem neoplásica de melanoma murino B16-F10 na fase de confluência.

Figura 17. Ilustração da linhagem de carcinoma epidermóide de boca humano (OSCC) na fase de confluência.

4.5.1 Ensaio de toxicidade sobre as linhagens celulares B16 e OSCC

Nesse contexto, foram preparadas nanocápsulas contendo o agente quimioterápico Selol e nanopartículas magnéticas. A nanoencapsulação surge no intuito de diminuir a dose do quimioterápico utilizado contribuindo assim para uma redução da toxicidade do tratamento.

Sinergicamente o uso das nanopartículas magnéticas permite um acúmulo preferencial das nanocápsulas na região próxima do tumor quando utilizado um campo magnético externo, além de gerar calor (hipertermia) e contribuir para um aumento da morte das células malignas.

A toxicidade das diferentes formulações preparadas (NV, NF e NSF) foram avaliadas frente à linhagem celular B16-F10 e OSCC pelo ensaio colorimétrico padrão de MTT.

Todos os experimentos foram realizados em triplicatas independentes. Os resultados obtidos representam as médias $\pm$ EPM (erro padrão médio). A análise da significância estatística entre a média do controle (células incubadas em meio de cultura 3% SFB) e a média dos grupos de células tratadas (células incubadas com as formulações) foi realizada pela Análise da Variância Unilateral (ANOVA) seguido pelo pós-teste de Tukey para múltiplas comparações.

No primeiro estudo utilizando a linhagem B16-F10 e na ausência de campo magnético foram utilizadas formulações nas seguintes concentrações: NV = nanocápsulas vazias, NF = nanocápsulas + fluido magnético a 5×10^{12} partículas/ml e NSF em diferentes concentrações: 1 = 25 $\mu\text{g/ml}$ + $1,25 \times 10^{12}$ partículas/ml; 2 = 50 $\mu\text{g/ml}$ + $2,5 \times 10^{12}$ partículas /ml e 3 = 100 $\mu\text{g/ml}$ + 5×10^{12} partículas /ml, de selol e nanopartículas magnéticas, respectivamente (Figura 18).

Figura 18. Viabilidade celular da linhagem B16-F10 tratada com as diferentes formulações e na ausência de campo magnético. CT = controle (meio contendo 3% SFB); NV = nanocápsulas vazias, NF = nanocapsulas + fluido magnético a 5×10^{12} partículas/ml e NSF em diferentes concentrações: 1 = 25 $\mu\text{g/ml}$ + $1,25 \times 10^{12}$ partículas/ml; 2 = 50 $\mu\text{g/ml}$ + $2,5 \times 10^{12}$ partículas /ml e 3 = 100 $\mu\text{g/ml}$ + 5×10^{12} partículas /ml, de Selol e nanopartículas magnéticas, respectivamente. A significância estatística para o estudo foi considerado * $p < 0.01$ comparado ao controle de 100%.

Pode-se observar nos resultados encontrados que as formulações vazia e contendo apenas o fluido magnético iônico não apresentaram elevada toxicidade celular, $80 \pm 9,8\%$ e $74,8 \pm 4,4\%$, respectivamente, demonstrando assim que os componentes das formulações e as nanopartículas magnéticas são biocompatíveis.

A biocompatibilidade das nanocápsulas de PLGA é bem relatada na literatura. Fonseca et al (2002) para observar a possibilidade de um possível efeito tóxico dos polímeros utilizados nas nanopartículas incubou diferentes concentrações de polímeros na linhagem celular de câncer de pulmão de pequenas células (SCLC) e não observou efeito tóxico das mesmas. Simioni et al (2006) também demonstrou a ausência de toxicidade das nanopartículas magnéticas de maghemita incubando o fluido magnético iônico em diferentes concentrações na linhagem celular macrofágica murina (J774-A1). Quando incubada na concentração de $0,12 \times 10^{17}$ as nanopartículas causaram apenas 3 % de morte celular, mostrando assim a biocompatibilidade das mesmas.

Quando utilizou-se a formulação NSF em diferentes concentrações pode-se observar um efeito selol-dependente da sua concentração, pois quando incubada a formulação NF na mesma quantidade de nanopartículas magnéticas da formulação NSF 3 não houve um aumento da morte celular, descartando assim um possível efeito tóxico das nanopartículas magnéticas.

Quando foram utilizadas as maiores concentrações de Selol e nanopartículas magnéticas não foi possível observar diferença estatística entre si ($50,3 \pm 4\%$ para 2 e $52,5 \pm 8,4$ para 3), porém em comparação com o controle houve uma redução por volta de 50% da viabilidade celular ($p < 0.01$).

Em um trabalho realizado por Suchocki et al (2007), foi comparado a toxicidade de dois compostos contendo Se no mesmo nível de oxidação, selol e selenito de sódio, onde a toxicidade do selenito de sódio foi maior do que a do selol, o que comprova a sua baixa toxicidade em comparação com outros compostos a base de selênio. Wilczynska et al (2011) também realizou estudo semelhante utilizando a linhagem celular de carcinoma cervical humano (HeLa), na qual também foi demonstrada uma maior toxicidade do selenito de sódio em comparação com o selol.

Ainda no trabalho de Suchocki et al (2007), o selol demonstrou uma grande capacidade em reduzir a viabilidade celular da linhagem de leucemia humana (HL-60) multi-resistente, causando uma maior morte celular em comparação com a mesma linhagem não-multi resistente, o que comprova também relatos que indicam a capacidade do Se em restaurar a sensibilidade das células malignas perante os agentes quimioterápicos.

Nos estudos envolvendo campo magnético, utilizou-se o aparelho que opera a 1 MHz com amplitude de campo de 40 Oe, durante 3 minutos. Este tempo de aplicação foi padronizado por Guedes e colaboradores em um estudo que avaliou os efeitos do tempo de aplicação do campo magnético alternado na indução de processos inflamatórios e de genotoxicidade (GUEDES et al., 2005).

A formulação NF foi incubada em uma concentração maior do que a utilizada no estudo sem a utilização do campo magnético ($1,5 \times 10^{13}$ partículas/ml, contra 5×10^{12} partículas/ml utilizado anteriormente) para que a concentração de nanopartículas magnéticas fosse a mesma da utilizada na maior concentração da formulação NSF.

Na formulação NF e com a aplicação do campo magnético por 3 minutos foi possível observar uma pronunciada redução da viabilidade celular, sendo que a mesma foi de 34,7% ($\pm 4,5$), e no estudo anterior havia sido de 74,8% ($\pm 4,4$), uma redução de 40%, indicando o efeito de morte celular por hipertermia causado pela aplicação do campo magnético (Figura 19).

Figura 19. Viabilidade celular da linhagem B16-F10 tratada com as diferentes formulações e na presença de campo magnético. CT = controle, NF = nanocápsulas + fluido magnético a $1,5 \times 10^{13}$ partículas/ml e NSF em diferentes concentrações: 1 = 25 $\mu\text{g/ml}$ + $1,25 \times 10^{12}$ partículas/ml; 2 = 50 $\mu\text{g/ml}$ + $2,5 \times 10^{12}$ partículas /ml; 3 = 100 $\mu\text{g/ml}$ + 5×10^{12} partículas/ml e 4 = 300 $\mu\text{g/ml}$ + $1,5 \times 10^{13}$ partículas/ml, de Selol e nanopartículas magnéticas, respectivamente. A significância estatística para o estudo foi considerado $*p < 0.01$ comparado ao controle de 100%.

Ghahremani et al (2011) realizou um estudo utilizando a quimioterapia e a técnica hipertêmica (nanopartículas de ouro) na linhagem celular de osteosarcoma humano (Saos-2). No grupo onde foi incubado apenas as nanopartículas de ouro a viabilidade celular foi de 95%, após o uso do agente quimioterápico a viabilidade caiu para 37,1% e com o uso sinérgico da quimioterapia e da hipertermia a viabilidade atingiu apenas 4,1%, comprovando a alta capacidade da hipertermia em causar a lise das células tumorais.

Nas maiores concentrações utilizadas de NSF não pode ser observado um aumento da morte celular, indicando uma resistência da linhagem frente a aplicação do campo magnético.

Nos estudos envolvendo a linhagem OSCC também foi avaliado os efeitos das diferentes formulações perante a viabilidade celular.

Como confirmado também no estudo utilizando a linhagem B16-F10, as formulações NV e NF se mostraram biocompatíveis apresentando viabilidade celular de 86,5% ($\pm 3,2$) e 77,8% ($\pm 1,7$), respectivamente.

Em um estudo anterior (dados não mostram), foi utilizado as mesmas concentrações utilizadas na linhagem B16-F10 da formulação NSF na linhagem OSCC, porém as mesmas mostraram uma resistência celular, não sendo possível avaliar o efeito do Selol. Com isso a concentração da formulação foi aumentada até 500 $\mu\text{g/ml}$ de Selol e $2,5 \times 10^{13}$ partículas /ml de nanopartículas magnéticas, e mesmo assim não foi observado efeito algum do Selol, indicando que a linhagem OSCC apresentou resistência perante o agente quimioterápico estudado nas concentrações utilizadas (Figura 20).

Figura 20. Viabilidade celular da linhagem OSCC tratada com diferentes formulações na ausência de campo magnético. CT = controle, NV = nanocápsulas vazias, NF = nanocapsulas + fluido magnético a $2,5 \times 10^{13}$ partículas/ml e NSF em diferentes concentrações: 1 = 100 $\mu\text{g/ml}$ + 5×10^{12} partículas/ml; 2 = 300 $\mu\text{g/ml}$ + $1,5 \times 10^{13}$ partículas /ml e 3 = 500 $\mu\text{g/ml}$ + $2,5 \times 10^{13}$ partículas /ml, de Selol e nanopartículas magnéticas, respectivamente.

Quando foi utilizado o campo magnético no estudo envolvendo a linhagem OSCC (Figura 21), pode-se observar um redução da viabilidade celular da formulação NF em comparação com o estudo realizado na ausência de campo magnético (70,8% ($\pm 3,8$), contra 89,9% ($\pm 2,4$) anteriormente) de cerca de 20%.

Nas formulações NSF 2 e 3 houve um efeito pronunciado do campo magnético na morte celular, onde para a formulação 2 a redução foi de cerca de 20% (70,8% ($\pm 3,8$), contra 89,9% ($\pm 2,4$) anteriormente), e para a formulação 3 foi de cerca de 40% (33,3% ($\pm 0,3$), contra 73,3% ($\pm 1,3$) anteriormente). Este resultado indica uma possível influência da concentração de nanopartículas magnéticas na capacidade de morte celular pela utilização do campo magnético. Também demonstra o sucesso da utilização da técnica hipertêmica perante a linhagem OSCC, causando um redução considerável da viabilidade celular.

Figura 21. Viabilidade celular da linhagem OSCC tratada com diferentes formulações na presença de campo magnético. CT = controle, NF = nanocapsulas + fluido magnético a $2,5 \times 10^{13}$ partículas/ml e NSF em diferentes concentrações: 1 = 100 $\mu\text{g/ml}$ + 5×10^{12} partículas/ml; 2 = 300 $\mu\text{g/ml}$ + $1,5 \times 10^{13}$ partículas /ml e 3 = 500 $\mu\text{g/ml}$ + $2,5 \times 10^{13}$ partículas /ml, de Selol e nanopartículas magnéticas, respectivamente. A significância estatística para o estudo foi considerado $*p < 0.01$ comparado ao controle de 100%.

5. CONCLUSÕES

- No presente trabalho foram preparadas com sucesso quatro formulações de nanocápsulas de PLGA contendo ou não selol e nanopartículas magnéticas.
- Todas as formulações apresentaram tamanho em escala nanométrica, com baixo índice de polidispersividade e potencial zeta relativamente alto, o que contribui para a manutenção da estabilidade do sistema. A estabilidade do mesmo foi comprovada através do armazenamento das diferentes formulações por 3 meses a temperatura de 4°C, não sendo observado variação significativa nos valores dos parâmetros avaliados.
- As análises de MET confirmaram o tamanho nanométrico nas nanocápsulas preparadas.
- O método analítico validado foi capaz de determinar com precisão e exatidão o selol encapsulado nas nanocápsulas, atingindo uma eficiência de encapsulação de 64,9% ($\pm 7,85$).
- As duas linhagens celulares estudadas demonstraram comportamentos diferentes quando incubadas com as diferentes formulações na ausência e na presença de campo magnético. Na linhagem B16-F10 foi possível observar o efeito citotóxico do selol, mas quando o campo magnético foi aplicado o efeito sinérgico observado não foi significativo. Já na linhagem OSCC, mesmo nas maiores concentrações de selol, foi observada resistência celular, no entanto quando o campo magnético foi aplicado foi possível observar uma redução de cerca de 40% da viabilidade celular (em comparação com o estudo onde não foi utilizado campo magnético) na maior concentração utilizada, comprovando assim a capacidade da técnica hipertêmica em causar morte celular na linhagem OSCC.
- Como conclusão final podemos inferir que o sistema foi preparado e caracterizado com sucesso, no entanto, mais estudos devem ser realizados para avaliar o verdadeiro efeito do sistema frente a diversas linhagens celulares, no intuito de que futuramente o sistema possa ser utilizado no combate ao câncer.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHARYA, S.; SAHOO, S. K. PLGA nanoparticles containing various anticancer agents and tumor delivery by EPR effect, **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 63, p. 170-183, 2010.

ACHE Laboratório. Câncer de A a Z. Disponível em: <<http://www.ache.com.br/Corp/oncologia-canceraz.aspx>>. Acesso em: 29 nov. 2011, 12:20.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Molecular Biology of The Cell** 5 ed. Garland, 2008.

ALEXIOU, C.; ARNOLD, W.; KLEIN, R. J.; PARAK, F. G.; HULIN, P.; BERGEMANN, C.; ERHARDT, W.; WAGENPFEIL, S.; LUBBE, A. S. Locoregional cancer treatment with magnetic drug targeting, **Cancer Research**, v. 60, p. 6641-6648, 2000.

ALEXIS, F.; RHEE, J. W.; RICHIE, J. P.; RADOVIC-MORENO, A. F.; LANGER, R.; FAROKHZAD, O. C. New frontiers in nanotechnology for cancer treatment, **Urologic Oncology-Seminars and Original Investigations**, v. 26, p. 74-85, 2008.

ALLEN, T. M.; CULLIS, P. R. Drug delivery systems: Entering the mainstream, **Science**, v. 303, p. 1818-1822, 2004.

ATHANASIOU, K. A.; NIEDERAUER, G. G.; AGRAWAL, C. M. Sterilization, toxicity, biocompatibility and clinical applications of polylactic acid polyglycolic acid copolymers, **Biomaterials**, v. 17, p. 93-102, 1996.

AULTON, M. E. **Delineamento de Formas Farmacêuticas**. Segunda Edição. São Paulo: Editora Artmed, 2005.

AVGOUSTAKIS, K.; BELETSI, A.; PANAGI, Z.; KLEPETSANIS, P.; LIVANIOU, E.; EVANGELATOS, G.; ITHAKISSIOS, D. S. Effect of copolymer composition on the physicochemical characteristics, in vitro stability, and biodistribution of PLGA-mPEG nanoparticles, **International Journal of Pharmaceutics**, v. 259, p. 115-127, 2003.

BABINCOVA, M.; ALTANEROVA, V.; ALTANER, C.; BERGEMANN, C.; BABINEC, P. In vitro analysis of cisplatin functionalized magnetic nanoparticles in combined cancer chemotherapy and electromagnetic hyperthermia, **Ieee Transactions on Nanobioscience**, v. 7, p. 15-19, 2008.

BARNES, L.; EVERSON, J. W.; REICHART, P.; SIDRANSKY, D. **World Health Organization Classification of Tumors**. Pathology and Genetics of Head and Neck Tumors. 1 ed. Lyon: IARC Press., 2005.

BJORKHEM-BERGMAN, L.; JONSSON, K.; ERIKSSON, L. C.; OLSSON, J. M.; LEHMANN, S.; PAUL, C.; BJORNSTEDT, M. Drug-resistant human lung cancer cells are more sensitive to selenium cytotoxicity - Effects on thioredoxin reductase and glutathione reductase, **Biochemical Pharmacology**, v. 63, p. 1875-1884, 2002.

BLOUZA, I. L.; CHARCOSSET, C.; SFAR, S.; FESSI, H. Preparation and characterization of spironolactone-loaded nanocapsules for paediatric use, **International Journal of Pharmaceutics**, v. 325, p. 124-131, 2006.

BONASSA, E. M. A.; SANTANA, T. R. **Conceitos gerais em quimioterapia antineoplásica**. São Paulo : Editora Atheneu; 2005. p. 3-19

BORCOVEK, M. Measuring particle size by light scattering. In: HOLMBERG, K. **Handbook of Applied Surface and Colloid Chemistry**. 2002. p. 357-370.

BOUCHEMAL, K.; BRIANCON, S.; PERRIER, E.; FESSI, H. Nano-emulsion formulation using spontaneous emulsification: solvent, oil and surfactant optimisation, **International Journal of Pharmaceutics**, v. 280, p. 241-251, 2004.

CAUCHETIER, E.; DENIAU, M.; FESSI, H.; ASTIER, A.; PAUL, M. Atovaquone-loaded nanocapsules: influence of the nature of the polymer on their in vitro characteristics, **International Journal of Pharmaceutics**, v. 250, p. 273-281, 2003.

CHO, K. J.; WANG, X.; NIE, S. M.; CHEN, Z.; SHIN, D. M. Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer, **Clinical Cancer Research**, v. 14, p. 1310-1316, 2008.

CHORNY, M.; FISHBEIN, I.; DANENBERG, H. D.; GOLOMB, G. Lipophilic drug loaded nanospheres prepared by nanoprecipitation: effect of formulation variables on size, drug recovery and release kinetics, **Journal of Controlled Release**, v. 83, p. 389-400, 2002.

CLAYTON, C. C.; BAUMANN, C. A. Diet and Azo Dye Tumors - Effect of Diet During A Period When the Dye Is Not Fed, **Cancer Research**, v. 9, p. 575-582, 1949.

COHEN-JONATHAN, E.; BERNHARD, E. J.; MCKENNA, W. G. How does radiation kill cells?, **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 3, p. 77-83, 1999.

COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S. L. Patologia estrutural e funcional 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S/A, 2005.

CUNHA JUNIOR, A. S.; LIGÓRIO, S. F.; CARNEIRO, L. B.; ORÉFICE, F. Microemulsões como veículo de drogas para administração ocular tópica, **Arquivos Brasileiro de Oftalmologia**, v. 66, p. 385-391, 2003.

DANHIER, F.; LECOUTURIER, N.; VROMAN, B.; JEROME, C.; MARCHAND-BRYNAERT, J.; FERON, O.; PREAT, V. Paclitaxel-loaded PEGylated PLGA-based nanoparticles: In vitro and in vivo evaluation, **Journal of Controlled Release**, v. 133, p. 11-17, 2009.

DATE, A. A.; NAIK, B.; NAGARSENKER, M. S. Novel drug delivery systems: Potential in improving topical delivery of antiacne agents, **Skin Pharmacology and Physiology**, v. 19, p. 2-16, 2006.

DE MARTIMPREY, H.; VAUTHIER, C.; MALVY, C.; COUVREUR, P. Polymer nanocarriers for the delivery of small fragments of nucleic acids: Oligonucleotides and siRNA, **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 71, p. 490-504, 2009.

DENNIS, C. L.; JACKSON, A. J.; BORCHERS, J. A.; HOOPES, P. J.; STRAWBRIDGE, R.; FOREMAN, A. R.; VAN LIEROP, J.; GRUTTNER, C.; IVKOV, R. Nearly complete regression of tumors via collective behavior of magnetic nanoparticles in hyperthermia, **Nanotechnology**, v. 20, p. 1-7, 2009.

DESHPANDE, A. A.; HELLER, J.; GURNY, R. Biodegradable polymers for ocular delivery, **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**, v. 15, p. 381-420, 1998.

DI CORATO, R.; BIGALL, N. C.; RAGUSA, A.; DORFS, D.; GENOVESE, A.; MAROTTA, R.; MANNA, L.; PELLEGRINO, T. Multifunctional Nanobeads Based on Quantum Dots and Magnetic Nanoparticles: Synthesis and Cancer Cell Targeting and Sorting, **Acs Nano**, v. 5, p. 1109-1121, 2011.

DICKSON, J. A.; CALDERWOOD, S. K. Temperature range and selective sensitivity of tumors to hyperthermia: a critical review, **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 335, p. 180-205, 1980.

DICKSON, J. A.; CALDERWOOD, S. K. Thermosensitivity of neoplastic tissues in vivo. In: **Hyperthermia in cancer therapy**. Boston: 1983. p. 63-140.

DOBSON, J. Magnetic nanoparticles for drug delivery, **Drug Development Research**, v. 67, p. 55-60, 2006.

DURÁN, N.; MATTOSO, L. H. C.; MORAIS, P. C. Nanotecnologia. São Paulo: Artliber, 2006.

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. 07B306-1-07B306-3, 2011.

FENG, S. S.; HUANG, G. F. Effects of emulsifiers on the controlled release of paclitaxel (Taxol (R)) from nanospheres of biodegradable polymers, **Journal of Controlled Release**, v. 71, p. 53-69, 2001.

FERGUSON, L. R.; PHILPOTT, M.; KARUNASINGHE, N. Dietary cancer and prevention using antimutagens, **Toxicology**, v. 198, p. 147-159, 2004.

FERRARI, M. Cancer nanotechnology: Opportunities and challenges, **Nature Reviews Cancer**, v. 5, p. 161-171, 2005.

FESSI, H.; PUISIEUX, F.; DEVISSAGUET, J. P.; AMMOURY, N.; BENITA, S. Nanocapsule Formation by Interfacial Polymer Deposition Following Solvent Displacement, **International Journal of Pharmaceutics**, v. 55, p. R1-R4, 1989.

FIDLER, I. J. Immune-Stimulation And/Or Inhibition of Tumor-Cells Growth In-Vitro, **Federation Proceedings**, v. 32, p. 859, 1973.

FILHO, G. Distúrbios do crescimento e diferenciação celular 4 ed. Belo Horizonte: Guanabara Koogan S. A., 1994.

FONSECA, S. M., ALMEIDA, E. P. M., MASSUNAGA, V. M. Administração dos quimioterápicos. Manual de quimioterapia antineoplásica. In: 2000, Reichmann & Affonso, p. 16-19.

FRESHNEY, R. I. Animal Cell Culture, A Practical Approach. **IRL press**, p.5, 1986.

FUCHS, F. D.; WANMACHER, L.; FERREIRA, M. B. C. Farmacologia clínica: fundamentos da terapêutica racional 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

GARCIA, V. A. P. Avaliação da biocompatibilidade/toxicidade e biodistribuição de fluido magnético estabilizado por ácido cítrico e de magnetolipossomas convencionais em camundongos. 2005. Doutorado - Universidade de Brasília, Faculdade de Ciências da Saúde, 2005.

GARCÍA-CERDA, L. A.; RODRÍGUEZ-FERNÁNDEZ, O. S.; BETANCOURT-GALINDO, R.; SALDÍVAR-GUERRERO, R. Síntesis y propiedades de ferrofluidos de magnetite, **Superficies y Vacío**, v. 16, p. 28-31, 2001.

GAUMET, M.; VARGAS, A.; GURNY, R.; DELIE, F. Nanoparticles for drug delivery: The need for precision in reporting particle size parameters, **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 69, p. 1-9, 2008.

GHAHREMANI, F. H.; SAZGARNIA, A.; BAHREYNI-TOOSI, M. H.; RAJABI, O.; ALEDAVOOD, A. Efficacy of microwave hyperthermia and chemotherapy in the presence of gold nanoparticles: An in vitro study on osteosarcoma, **International Journal of Hyperthermia**, v. 27, p. 625-636, 2011.

Globocan 2008. Incidência e mortalidade do câncer no mundo em 2008. Disponível em: <<http://globocan.iarc.fr/>>. Acesso em: 29 nov. 2011, 12:15.

GOMES, A. J.; LUNARDI, L. O.; MARCHETTI, J. M.; LUNARDI, C. N.; TEDESCO, A. C. Indocyanine green nanoparticles useful for photomedicine, **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 24, p. 514-521, 2006.

GONZALEZ, A. G.; HERRADOR, M. A.; ASUERO, A. G.; SAYAGO, A. The correlation coefficient attacks again, **Accreditation and Quality Assurance**, v. 11, p. 256-258, 2006.

GHOSH, J. Rapid induction of apoptosis in prostate cancer cells by selenium: reversal by metabolites of arachidonate 5-lipoxygenase, **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 315, p. 624-635, 2004.

GOVENDER, T.; RILEY, T.; EHTEZAZI, T.; GARNETT, M. C.; STOLNIK, S.; ILLUM, L.; DAVIS, S. S. Defining the drug incorporation properties of PLA-PEG nanoparticles, **International Journal of Pharmaceutics**, v. 199, p. 95-110, 2000.

GOVENDER, T.; STOLNIK, S.; GARNETT, M. C.; ILLUM, L.; DAVIS, S. S. PLGA nanoparticles prepared by nanoprecipitation: drug loading and release studies of a water soluble drug, **Journal of Controlled Release**, v. 57, p. 171-185, 1999.

GRAVINA, P. P. Estudos de fluidos magnéticos concentrados por birrefringência magnética estática. 2005. Mestrado - Instituto de Física, Universidade de Brasília, 2005.

GRIEF, A. D.; RICHARDSON, G. Mathematical modelling of magnetically targeted drug delivery, **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 293, p. 455-463, 2005.

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

GUPTA, A. K.; GUPTA, M. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications, **Biomaterials**, v. 26, p. 3995-4021, 2005.

HALEY, B.; FRENKEL, E. Nanoparticles for drug delivery in cancer treatment, **Urologic Oncology-Seminars and Original Investigations**, v. 26, p. 57-64, 2008.

HERRERO-VANRELL, R.; RINCON, A. C.; ALONSO, M.; REBOTO, V.; MOLINA-MARTINEZ, I. T.; RODRIGUEZ-CABELLO, J. C. Self-assembled particles of an elastin-like polymer as vehicles for controlled drug release, **Journal of Controlled Release**, v. 102, p. 113-122, 2005.

HIRAOKA, K.; KOMIYA, S.; HAMADA, T.; ZENMYO, M.; INOUE, A. Osteosarcoma cell apoptosis induced by selenium, **Journal of Orthopaedic Research**, v. 19, p. 809-814, 2001.

HOCKER, T. L.; SINGH, M. K.; TSAO, H. Melanoma Genetics and Therapeutic Approaches in the 21st Century: Moving from the Benchside to the Bedside, **Journal of Investigative Dermatology**, v. 128, p. 2575-2595, 2008.

ITO, A.; SHINKAI, M.; HONDA, H.; KOBAYASHI, T. Medical application of functionalized magnetic nanoparticles, **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 100, p. 1-11, 2005.

JAIN, R. K. Delivery of molecular and cellular medicine to solid tumors, **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 46, p. 149-168, 2001.

JASTRZEBSKI, Z.; CZYZEWSKASZAFRAN, H.; FIJATEK, Z.; SUCHOCKI, P.; FITAK, B. A. Toxicity studies of a new selenium compound, selol, in rats, **Drugs Under Experimental and Clinical Research**, v. 21, p. 217-220, 1995.

JASTRZEBSKI, Z.; CZYZEWSKASZAFRAN, H.; REMISZEWSKA, M.; FIJALEK, Z.; FITAK, B. A.; SUCHOCKI, P. Pharmacokinetics of selol, a new agent containing selenium, in rats, **Drugs Under Experimental and Clinical Research**, v. 23, p. 7-11, 1997.

JERANT, A. F.; JOHNSON, J. T.; SHERIDAN, C. D.; CAFFREY, T. J. Early detection and treatment of skin cancer, **American Family Physician**, v. 62, p. 357-368, 2000.

JOHANNSEN, M.; GNEVECKOW, U.; TAYMOORIAN, K.; THIESEN, B.; WALDOFNER, N.; SCHOLZ, R.; JUNG, K.; JORDAN, A.; WUST, P.; LOENING, S. A. Morbidity and quality of life during thermotherapy using magnetic nanoparticles in locally recurrent prostate cancer: Results of a prospective phase I trial, **International Journal of Hyperthermia**, v. 23, p. 315-323, 2007.

JONSSON-VIDESATER, K.; BJORKHEM-BERGMAN, L.; HOSSAIN, A.; SODERBERG, A.; ERIKSSON, L. C.; PAUL, C.; ROSEN, A.; BJORNSTEDT, M. Selenite-induced apoptosis in doxorubicin-resistant cells and effects on the thioredoxin system, **Biochemical Pharmacology**, v. 67, p. 513-522, 2004.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. *Biologia Celular e Molecular* 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S/A, 2000.

KATZUNG, B. G. **Farmacologia Basica & Clinica** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 1998.

KIBBE, A. H. *Handbook of excipients* 3 ed. Washington: APHA, 2000, p. 13-17.

KLUGER, M. J. Is fever beneficial?, **Yale Journal of Biology and Medicine**, v. 59, p. 89-95, 1986.

KONERACKA, M.; MUCKOVA, M.; ZAVISOVA, V.; TOMASOVICOVA, N.; KOPCANSKY, P.; TIMKO, M.; JURIKOVA, A.; CSACH, K.; KAVECANSKY, V.; LANCZ, G. Encapsulation of anticancer drug and magnetic particles in biodegradable polymer nanospheres, **Journal of Physics-Condensed Matter**, v. 20, p. 1-6, 2008.

KONG, S. D.; ZHANG, W. Z.; LEE, J. H.; BRAMMER, K.; LAL, R.; KARIN, M.; JIN, S. H. Magnetically Vectored Nanocapsules for Tumor Penetration and Remotely Switchable On-Demand Drug Release, **Nano Letters**, v. 10, p. 5088-5092, 2010.

KUMARI, A.; YADAV, S. K.; YADAV, S. C. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems, **Colloids and Surfaces B-Biointerfaces**, v. 75, p. 1-18, 2010.

LACAVA, B. M. Síntese de fluido magnético à base de maghemita para produção de nanocápsulas magnéticas de albumina bovina. 2009. Dissertação de Mestrado - Instituto de Química da Universidade de Brasília, 2009.

LAMPRECHT, A.; TORRES, H. R.; SCHAFER, U.; LEHR, C. M. Biodegradable microparticles as a two-drug controlled release formulation: a potential treatment of inflammatory bowel disease, **Journal of Controlled Release**, v. 69, p. 445-454, 2000.

LEGRAND, P.; BARRATT, G.; MOSQUEIRA, V.; FESSI, H.; DEVISSAGUET, J. P. Polymeric nanocapsules as drug delivery systems - A review, **Stp Pharma Sciences**, v. 9, p. 411-418, 1999.

LEGRAND, P.; LESIEUR, S.; BOCHOT, A.; GREF, R.; RAATJES, W.; BARRATT, G.; VAUTHIER, C. Influence of polymer behaviour in organic solution on the production of polylactide nanoparticles by nanoprecipitation, **International Journal of Pharmaceutics**, v. 344, p. 33-43, 2007.

LIANG, X.; CHEN, C.; ZHAO, Y.; WANG, P. C. Circumventing Tumor Resistance to Chemotherapy by Nanotechnology. In: **Multi-drug Resistance in Cancer**, 2010. Capítulo 21, p. 467-488.

LINCE, F.; MARCHISIO, D. L.; BARRESI, A. A. Strategies to control the particle size distribution of poly-epsilon-caprolactone nanoparticles for pharmaceutical applications, **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 322, p. 505-515, 2008.

LIU, X. Y.; GAO, C. Y.; SHEN, J. C.; MOHWALD, H. Multilayer microcapsules as anti-cancer drug delivery vehicle: Deposition, sustained release, and in vitro bioactivity, **Macromolecular Bioscience**, v. 5, p. 1209-1219, 2005.

LU, Y.; CHEN, S. C. Micro and nano-fabrication of biodegradable polymers for drug delivery, **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, p. 1621-1633, Sept.2004.

LUZ, P. P. Porfirinas nanoencapsuladas obtidas por ultra-som spray drying. 2008. Tese de doutorado em Química - FFCL-RP, Universidade de São Paulo, 2008.

LV, Y. G.; DENG, Z. S.; LIU, J. 3-D numerical study on the induced heating effects of embedded micro/nanoparticles on human body subject to external medical electromagnetic field, **Ieee Transactions on Nanobioscience**, v. 4, p. 284-294, 2005.

MACAROFF, P. P.; PRIMO, F. L.; DE AZEVEDO, R. B.; LACAVA, Z. G. M.; MORAIS, P. C.; TEDESCO, A. C. Synthesis and characterization of a magnetic nanoemulsion as a promising candidate for cancer treatment, **Ieee Transactions on Magnetics**, v. 42, p. 3596-3598, 2006.

MAEDA, H.; MATSUMURA, Y. Tumoritropic and Lymphotropic Principles of Macromolecular Drugs, **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**, v. 6, p. 193-210, 1989.

MAGENHEIM, B.; BENITA, S. Nanoparticle Characterization: A comprehensive physicochemical approach, **S. T. P. Pharma Sciences**, v. 1, p. 221-241, 1991.

MAH, C.; FRAITES, T. J.; ZOLOTUKHIN, I.; SONG, S. H.; FLOTTE, T. R.; DOBSON, J.; BATICH, C.; BYRNE, B. J. Improved method of recombinant AAV2 delivery for systemic targeted gene therapy, **Molecular Therapy**, v. 6, p. 106-112, 2002.

MALVERN INSTRUMENTS. Manual do Usuário, Zetasizer Nano Series, 2008.

MARKS, G.; MOHIUDDIN, M.; EITAN, A.; MASONI, L.; BASILE, M. Sphincter Preservation Surgery for Rectal-Cancer Utilizing High-Dose Preoperative Radiation - the Thomas-Jefferson-University-Hospital Experience, **Lyon Chirurgical**, v. 87, p. 25-28, 1991.

MCKENZIE, R. C.; RAFFERTY, T. S.; BECKETT, G. J. Selenium: An essential element for immune function, **Immunology Today**, v. 19, p. 342-345, 1998.

MEDINA, C.; SANTOS-MARTINEZ, M. J.; RADOMSKI, A.; CORRIGAN, O. I.; RADOMSKI, M. W. Nanoparticles: pharmacological and toxicological significance, **British Journal of Pharmacology**, v. 150, p. 552-558, 2007.

MERIC, J. B.; RIXE, O.; KHAYAT, D. Metastatic malignant melanoma, **Drugs of Today**, v. 39, p. 17-38, 2003.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Mensagens aos médicos. Fundamentos do câncer. Secretária de Assistência Médica-Divisão Nacional de Câncer. Brasília, 1971

MITTAL, G.; SAHANA, D. K.; BHARDWAJ, V.; KUMAR, M. N. V. R. Estradiol loaded PLGA nanoparticles for oral administration: Effect of polymer molecular weight and copolymer composition on release behavior in vitro and in vivo, **Journal of Controlled Release**, v. 119, p. 77-85, 2007.

MOGHIMI, S. M.; HUNTER, A. C.; MURRAY, J. C. Long-circulating and target-specific nanoparticles: Theory to practice, **Pharmacological Reviews**, v. 53, p. 283-318, 2001.

MOHANRAJ, V. J.; CHEN, Y. Nanoparticles - a review, **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 5, p. 561-573, 2006.

MORA-HUERTAS, C. E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery, **International Journal of Pharmaceutics**, v. 385, p. 113-142, 2010.

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

MOSQUEIRA, V. C. F.; LEGRAND, P.; PINTO-ALPHANDARY, H.; PUISIEUX, F.; BARRATT, G. Poly(D,L-lactide) nanocapsules prepared by a solvent displacement process: Influence of the composition on physicochemical and structural properties, **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 89, p. 614-626, 2000.

MU, L.; FENG, S. S. A novel controlled release formulation for the anticancer drug paclitaxel (Taxol (R)): PLGA nanoparticles containing vitamin E TPGS, **Journal of Controlled Release**, v. 86, p. 33-48, Jan.2003.

MURAD, A. M.; KATZ, A. Oncologia: Bases clínicas do tratamento Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1990.

NUNES, S. M. T.; SGUILLA, F. S.; TEDESCO, A. C. Photophysical studies of zinc phthalocyanine and chloroaluminum phthalocyanine incorporated into liposomes in the presence of additives, **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, p. 273-284, 2004.

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

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.

OVERGAARD, J. The Current and Potential Role of Hyperthermia in Radiotherapy, **International Journal of Radiation Oncology Biology Physics**, v. 16, p. 535-549, 1989.

PANKHURST, Q. A.; CONNOLLY, J.; JONES, S. K.; DOBSON, J. Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine, **Journal of Physics D-Applied Physics**, v. 36, p. R167-R181, 2003.

PANYAM, J.; LABHASETWAR, V. Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue, **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 55, p. 329-347, 2003.

PANYAM, J.; WILLIAMS, D.; DASH, A.; LESLIE-PELECKY, D.; LABHASETWAR, V. Solid-state solubility influences encapsulation and release of hydrophobic drugs from PLGA/PLA nanoparticles, **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 93, p. 1804-1814, 2004.

PAULO CÉSAR DE MORAIS. Sistemas magnéticos nanoparticulados: produção, caracterização e aplicações. In:2011,Universidade de Brasília.

PEER, D.; KARP, J. M.; HONG, S.; FAROKHZAD, O. C.; MARGALIT, R.; LANGER, R. Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy, **Nature Nanotechnology**, v. 2, p. 751-760, 2007.

PINTO, C.; NEUFELD, R. J.; RIBEIRO, A. J.; VEIGA, F. Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles, **Nanomedicine:Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 2 p. 8-21, 2006.

PLASARI, E.; GRISONI, P.; VILLERMAUX, J. Influence of process parameters on the precipitation of organic nanoparticles by drowning-out, **Chemical Engineering Research & Design**, v. 75, p. 237-244, 1997.

PRIMO, F. L.; RODRIGUES, M. M. A.; SIMIONI, A. R.; LACAVAL, Z. G. M.; MORAIS, P. C.; TEDESCO, A. C. Photosensitizer-Loaded Magnetic Nanoemulsion for Use in Synergic Photodynamic and Magnetohyperthermia Therapies of Neoplastic Cells, **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 8, p. 5873-5877, 2008.

PANKHURST, Q. A.; CONNOLLY, J.; JONES, S. K.; DOBSON, J. Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine, **Journal of Physics D-Applied Physics**, v. 36, p. R167-R181, 2003.

QUINTANAR-GUERRERO, D.; ALLEMANN, E.; DOELKER, E.; FESSI, H. Preparation and characterization of nanocapsules from preformed polymers by a new process based on emulsification-diffusion technique, **Pharmaceutical Research**, v. 15, p. 1056-1062, 1998.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; MOORE, P. K. Farmacologia 5 ed. Rio de Janeiro: **Elsevier**, 2004.

RAWAT, M.; SINGH, D.; SARAF, S.; SARAF, S. Nanocarriers: Promising vehicle for bioactive drugs, **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 29, p. 1790-1798, 2006.

RAYMAN, M. P. The importance of selenium to human health, **Lancet**, v. 356, p. 233-241, 2000.

REDHEAD, H. M.; DAVIS, S. S.; ILLUM, L. Drug delivery in poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles surface modified with poloxamer 407 and poloxamine 908: in vitro characterisation and in vivo evaluation, **Journal of Controlled Release**, v. 70, p. 353-363, 2001.

REIS, C. P.; NEUFELD, R. J.; RIBEIRO, A. J.; VEIGA, F. Nanoencapsulation II. Biomedical applications and current status of peptide and protein nanoparticulate delivery systems, **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine** 2, v. 8, p. 53-65, 2006.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; HARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em Métodos Cromatográficos e Eletroforéticos, **Química Nova**, v. 27, p. 771-780, 2004.

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

RUNYAN W, R.; SHAFFNER, T. J. Semiconductor Measurements & Instrumentation 2 ed. Nova York: McGraw-Hill Professional, 1998, p. 331-355.

SANTOS, H. S.; CRUZ, W. M. S. A Terapia nutricional com vitaminas antioxidantes e o tratamento quimioterápico oncológico, **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 47, p.303-308, 2001.

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, 2003.

SCHWARZ, K.; FOLTZ, C. M. Selenium As An Integral Part of Factor-3 Against Dietary Necrotic Liver Degeneration, **Journal of the American Chemical Society**, v. 79, p. 3292-3293, 1957.

SENYEI, A.; WIDDER, K.; CZERLINSKI, G. Magnetic Guidance of Drug-Carrying Microspheres, **Journal of Applied Physics**, v. 49, p. 3578-3583, 1978.

SILVA, P. Farmacologia 7 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S/A, 2006.

SIMIONI, A. R.; MARTINS, O. P.; LACAVA, Z. G. M.; AZEVEDO, R. B.; LIMA, E. C. D.; LACAVA, B. M.; MORAIS, P. C.; TEDESCO, A. C. Cell toxicity studies of albumin-based nanosized magnetic beads, **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 6, p. 2413-2415, 2006.

SIMPLICIO, F.; MAIONCHI, F.; HIOKA, N. Terapia Fotodinâmica: aspectos farmacológicos, aplicações e avanços recentes no desenvolvimento de medicamentos, **Quimica Nova**, v. 25, p. 801-807, 2002.

SINHA, R.; KIM, G. J.; NIE, S. M.; SHIN, D. M. Nanotechnology in cancer therapeutics: bioconjugated nanoparticles for drug delivery, **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 5, p. 1909-1917, 2006.

SINHA, V. R.; BANSAL, K.; KAUSHIK, R.; KUMRIA, R.; TREHAN, A. Poly-epsilon-caprolactone microspheres and nanospheres: an overview, **International Journal of Pharmaceutics**, v. 278, p. 1-23, 2004.

SONVICO, F.; CAGNANI, A.; ROSSI, A.; MOTTA, S.; DI BARI, M. T.; CAVATORTA, F.; ALONSO, M. J.; DERIU, A.; COLOMBO, P. Formation of self-organized nanoparticles by lecithin/chitosan ionic interaction, **International Journal of Pharmaceutics**, v. 324, p. 67-73, 2006.

STEWART, B. W., KLEIHUES, P. World Cancer Report. IARC Nonserial Publication. In: 2007, World Health Organization. International Agency for Research Cancer,

STOLNIK, S.; GARNETT, M. C.; DAVIES, M. C.; ILLUM, L.; BOUSTA, M.; VERT, M.; DAVIS, S. S. The Colloidal Properties of Surfactant-Free Biodegradable Nanospheres from Poly(Beta-Malic Acid-Co-Benzyl Malate)S and Poly(Lactic Acid-Co-Glycolide), **Colloids and Surfaces A-Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 97, p. 235-245, 1995.

SUCHOCKI, P.; JAKONIUK, D.; FITAK, B. A. Specific spectrophotometric method with trifluoroacetic acid for the determination of selenium(IV) in selenitetriglycerides, **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 32, p. 1029-1036, 2003.

SUN, S. H.; ZENG, H. Size-controlled synthesis of magnetite nanoparticles, **Journal of the American Chemical Society**, v. 124, p. 8204-8205, 2002.

SURENDIRAN, A.; SANDHIYA, S.; PRADHAN, S. C.; ADITHAN, C. Novel applications of nanotechnology in medicine, **Indian Journal of Medical Research**, v. 130, p. 689-701, 2009.

TABOR, M. P.; BRAKENHOFF, R. H.; VAN HOUTEN, V. M. M.; KUMMER, J. A.; SNEL, M. H. J.; SNIJDERS, P. J. F.; SNOW, G. B.; LEEMANS, C. R.; BRAAKHUIS, B. J. M. Persistence of genetically altered fields in head and neck cancer patients: Biological and clinical implications, **Clinical Cancer Research**, v. 7, p. 1523-1532, 2001.

TADOKORO, H., FONSECA, S.M. Indicações e contra-indicações para quimioterapia. Manual de quimioterapia antineoplásica. In: 2000, Reichmann & Affonso, p. 2-5.

TALJA, M.; VALIMAA, T.; TAMMELA, T.; PETAS, A.; TORMALA, P. Bioabsorbable and biodegradable stents in urology, **Journal of Endourology**, v. 11, p. 391-397, 1997.

TAPIERO, H.; TOWNSEND, D. M.; TEW, K. D. The antioxidant role of selenium and seleno-compounds, **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 57, p. 134-144, 2003.

TARTAJ, P.; MORALES, M. D.; VEINTEMILLAS-VERDAGUER, S.; GONZALEZ-CARRENO, T.; SERNA, C. J. The preparation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine, **Journal of Physics D-Applied Physics**, v. 36, p. R182-R197, 2003.

THOMPSON, M.; BROWN, D. W.; FEARN, T.; GARDNER, M. J.; GREENHOW, E. J.; HOWARTH, R.; MILLER, J. N.; NEWMAN, E. J.; RIPLEY, B. D.; SWAN, K. J.; WILLIAMS, A.; WOOD, R.; WILSON, J. J. Is My Calibration Linear, **Analyst**, v. 119, p. 2363-2366, 1994.

VASIR, J. K.; LABHASETWAR, V. Targeted drug delivery in cancer therapy, **Technology in Cancer Research & Treatment**, v. 4, p. 363-374, 2005.

VAUTHIER, C.; DUBERNET, C.; CHAUVIERRE, C.; BRIGGER, I.; COUVREUR, P. Drug delivery to resistant tumors: the potential of poly(alkyl cyanoacrylate) nanoparticles, **Journal of Controlled Release**, v. 93, p. 151-160, 2003.

VERTRESS, R. A. Patologia do estresse térmico em condições normais, transformadas e malignas de células pulmonares. 1999. Mestrado - University of Texas Medical Branch, 1999.

VISTICA, D. T.; SKEHAN, P.; SCUDIERO, D.; MONKS, A.; PITTMAN, A.; BOYD, M. R. Tetrazolium-Based Assays for Cellular Viability - A Critical-Examination of Selected Parameters Affecting Formazan Production, **Cancer Research**, v. 51, p. 2515-2520, 1991.

WANG, Z.; CHUI, W. K.; HO, P. C. Design of a Multifunctional PLGA Nanoparticulate Drug Delivery System: Evaluation of its Physicochemical Properties and Anticancer Activity to Malignant Cancer Cells, **Pharmaceutical Research**, v. 26, p. 1162-1171, 2009.

WEI, Y. M.; CAO, X. Z.; OU, Y. X.; LU, J. H.; XING, C. P.; ZHENG, R. L. SeO₂ induces apoptosis with down-regulation of Bcl-2 and up-regulation of P53 expression in both immortal human hepatic cell line and hepatoma cell line, **Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 490, p. 113-121, 2001.

WEISSLEDER, R.; STARK, D. D.; ENGELSTAD, B. L.; BACON, B. R.; COMPTON, C. C.; WHITE, D. L.; JACOBS, P.; LEWIS, J. Superparamagnetic Iron-Oxide - Pharmacokinetics and Toxicity, **American Journal of Roentgenology**, v. 152, p. 167-173, 1989.

WEREBE, D. M. Depressão no câncer. In: Depressões em medicina interna e em outras condições médicas: depressões secundárias. São Paulo: Atheneu, 2000. Capítulo 18, p. 159-164.

WHANGER, P. D. Selenium and its relationship to cancer: an update, **British Journal of Nutrition**, v. 91, p. 11-28, 2004.

WIDDER, J. J.; SENYEI, A. E.; SCARPELLI, D. G. Magnetic Microspheres: a model system for site specific drug delivery in vivo, **Proc Soc Exp Biol Med**, v. 58, p. 141-146, 1978.

WILCZYNSKA, J. D.; KSIAZEK, I.; NOWAK, K.; SUCHOCKI, P.; FLIS, S.; KILJAN, M.; ANUSZEWSKA, E. Study of the effect of Selol and sodium selenite on HeLa cells *in vitro*, **Chemik**, v. 65, p. 110-114, 2011.

ZAGRODZKI, P.; BIK, D.; FITAK, B. A.; SUCHOCKI, P.; NIEMCZUK, K. Selenoenzymes in animal tissues after supplementation with SELOL, **Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy**, v. 44, p. 215-220, 2000.