UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Estudos fotofísicos e fotobiológicos de sistemas de liberação contendo o fármaco fotossensível cloro-ftalocianina de alumínio para aplicação em terapia fotodinâmica

Emanoel Pedro de Oliveira Silva

Ribeirão Preto

2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Estudos fotofísicos e fotobiológicos de sistemas de liberação contendo o fármaco fotossensível cloro-ftalocianina de alumínio para aplicação em terapia fotodinâmica

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Doutor em Ciências
Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos.
Orientado: Emanoel Pedro de Oliveira Silva
Orientador: Prof. Dr. Antonio Claudio Tedesco

Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas em 26/08/2016. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto
2016

AUTORIZO EXCLUSIVAMENTE PARA FINS ACADÊMICOS E CIENTÍFICOS, A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTA DISSERTAÇÃO, POR PROCESSOS FOTOCOPIADORES OU TRANSMISSÃO ELETRÔNICA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Silva, Emanoel Pedro de Oliveira
Estudos fotofísicos e fotobiológicos de sistemas de liberação contendo o fármaco fotossensível cloro-ftalocianina de alumínio para aplicação em terapia fotodinâmica. Ribeirão Preto, 2016.
159 p. 30 cm

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

1. Sistema de Liberação. 2. Terapia Fotodinâmica 3. Câncer

FOLHA DE APROVAÇÃO

Silva, Emanoel Pedro de Oliveira
Estudos fotofísicos e fotobiológicos de sistemas de liberação contendo o fármaco fotossensível cloro-ftalocianina de alumínio para aplicação em terapia fotodinâmica.

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

Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos

Orientador: Prof. Dr. Antonio Claudio Tedesco

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

À minha amada esposa SUEMI que com todo o seu amor, carinho, compreensão foram

meus alicerses ao longo de toda essa tese

e à minha princesa LAURA.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me conceder a dádiva da vida e por me apoiar em todo o meu caminho.

Ao Prof. Dr. Antonio Cláudio Tedesco, pela orientação em mais essa etapa de minha vida acadêmica e pela oportunidade impar de desenvolver esta pesquisa, bem como pelo apoio e aprendizado científico.

Aos professores Dr. Pietro Ciancaglini e Dr. Carlos Curti que disponibilizaram a ultracentrifuga para a preparação das formulações, sem o qual não conseguiriamos desenvolver o trabalho.

Ao Prof. Dr. Roberto Santana da Silva, pela oportunidade de desenvolver parte desta tese junto à sua equipe de pesquisa em especial a Loyanne e a Juliana no laboratório de Bioatividade de compostos de coordenação na FCFRP-USP.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão da bolsa de doutorado e pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa (2012/25216-3).

Aos meus amigos do CNET, Leonardo, Fernando, Maryanne, Patricia, Diogo, Ítalo, Natália Nossi, Natalia Candido, Nayara, Cristiano, Franchi, Tácila, Jaqueline, Camila e Olimpia pelos momentos agrádaveis proporcionados, sem os quais seria mais dificil a conslusão desse trabalho e se tornaram minha família em Ribeirão Preto.

Aos meus amigos da Republica XViola, Charles, Adriel, Poste, Tiga, Bruno, Souza, Plural, Cabelo e Ítalo que tão bem me receberam e me mostraram o verdadeiro sentido da vida universitária.

Aos funcionários da Secretaria de Pós-Graduação da FCFRP-USP, Eleni e Rafael pela atenção e prontidão durante estes anos de doutorado.

"Porque metade da vida de um ser humano envolve sobreviver ao mundo. A outra metade envolve descobrir um significado para sua existência. Para o primeiro, existe o trabalho, o instinto e a evolução natural. Para o segundo, existe o amor, a fé. E o sonho".

(*Raphael Dracon*)

RESUMO

Silva, E. P. O. **Estudos fotofísicos e fotobiológicos de sistemas de liberação contendo o fármaco fotossensível cloro-ftalocianina de alumínio para aplicação em terapia fotodinâmica**. 2016. 161 f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

A terapia fotodinâmica (TFD) tem se apresentado nos últimos anos como uma alternativa para o tratamento de tumores cutâneos, viscerais e sistêmicos, demonstrando resultados promissores, tanto em estudos *in vitro* como *in vivo*. Trata-se de uma técnica simples e não invasiva. A terapia consiste na excitação de um fármaco fotossensibilizante por uma fonte de luz visível que depois de absorvida pela molécula, leva a produção espécies reativas de oxigênio (EROs) em presença do oxigênio molecular por uma sequencia de reações fotoquímicas. Nesse trabalho propõe-se a preparação, caracterização e detreminação da atividade fotodinâmica de uma nanoemulsão rica em colesterol e de lipossomas ultradeformáveis como novos sistemas de liberação para o fármaco fotossensibilizante cloro alumínio ftalocianina (PcAlCl), comparando com um sistema clássico de lipossoma convencional. Como modelo celular foram utilizadas células de glioblastoma (U87MG) e de melanoma (B16F10). As formulações apresentaram características desejáveis como reprodutibilidade, tamanho de partícula, estabilidade curto e em longo prazo e deformidade adequados para a utilização como meio de veiculação da PcAlCl. Pela análise dos estudos fotofísicos de rendimento quântico de fluorescência (Φ_F), tempo de vida de fluorescência (τ) e rendimento quântico de oxigênio singleto (Φ_Δ) da PcAlCl em etanol e incorporada nas formulações, pode-se observar que a incorporação a um veículo de liberação melhorou as características da PcAlCl. Nos estudos em células nenhum dos sistemas apresentou citotoxicidade na ausência de luz, mas apresentaram um aumento da atividade fotodinâmica da PcAlCl de até 80% quando comparadas à PcAlCl livre quando irradiadas. Todas as formulações apresentaram características que corrobora com o emprego como sistemas de liberação para o aumento da atividade fotodinâmica da PcAlCl podendo serem empregados no tratamento de glioblastoma e de melanoma.

Palavras-chave: Glioblastoma, Melanoma, Lipossoma, LDE, Terapia Fotodinâmica.

ABSTRACT

Silva, E. P. O. **Photophysical and photobiological studies of drug delivery systems loaded with chloro-aluminium phthalocyanine for application in photodynamic therapy**. 2016. 161 f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

The Photodynamic therapy (PDT) has been an alternative for the treatment of skin, and brain tumors, and has shown promising results, both *in vitro* and *in vivo*, is a simple and non-evasive technique. The therapy consists into a light-sensitive drug excitation by a light visible source that once absorbed by the molecule lead to produce reactive oxygen species (ROS) in the molecular oxygen presence by a sequence of photochemical reactions. This work proposes the preparation and characterization of a cholesterol-rich nanoemulsion and ultradeformable liposomes as new delivery systems for the drug photosensitizer chloro aluminum phthalocyanine (PcAlCl) compared to a classical system as the conventional liposome and their photodynamic activity in glioblastoma cells line (U87MG) and melanoma cells line (B16F10). The formulations showed suitable characteristics such as reproducibility, particle size, short and long-term stability and deformity for their use as drug delivery for PcAlCl. For the photophysical studies: absorption, fluorescence, fluorescence quantum yield (Φ_F), fluorescence lifetime (τ) and quantum yield of singlet oxygen (Φ_Δ) of PcAlCl in ethanol and incorporated in the formulations demonstrated that the incorporation was able to improve its photophysical characteristics. In in vitro studies, the drug delivery systems showed no cytotoxicity in the absence of light, but demonstrated increased in PcAlCl photodynamic activity up to 80% over the PcAlCl free when irradiated. All formulations showed characteristics, which cooperates with the use of these drug delivery systems for, increased the PcAlCl photodynamic activity for glioblastoma and melanoma treatment.

Keywords: Glioblastoma, Melanoma, Liposome, LDE, Photodynamic therapy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Representação esquemática dos diferentes tipos de células gliais no sistema nervoso central (SNC) e suas interações, entre si e com os neurônios. (A); Glioblastoma multiforme com contrate de Gadolinium (Gd^{3+}) (B). Adaptado de (BAUMANN e PHAM-DINH, 2001; BISWAS, 2012)..... 2

Figura 2 - Vias de permeação pela barreira hematoencefálica (BHE). Adaptado de (ABBOTT , RONNBACK e HANSSON, 2006). 4

Figura 3 - Estrutura da Epiderme. Adaptada de (NATARAJAN et al., 2014)..... 5

Figura 4 - Mecanismos de permeação da pele. (1) via paracelular; (2) Interação com os lipídios da pele; (3) via Transcelular; (4) via folículos de pelo e poros glandulares. Adaptado de (AGRAWAL; GUPTA e VYAS, 2016)..... 8

Figura 5 - Digrama de Jablonski para o processo de fotossensibilização, onde λ = absorção de luz de comprimento de onda adequado, S_0 = estado fundamental, S_1 = primeiro estado excitado singleto, S_n = estados excitados singleto superiores, IC = conversão interna T_1= primeiro estado excitado tripleto, O_2 = oxigênio molecular, $^1O_2$ = oxigênio singleto, EROs = espécies reativas de oxigênio..... 10

Figura 6 - Estrutura molecular do medicamento Photofrin®..... 14

Figura 7 - Estrutura molecular das talocianinas.....15

Figura 8 - No topo a esquerda uma molécula de fosfatidilcolina. Na presença de água são formadas as bicamadas de fosfolípidos, que ao formar uma vesícula, apresenta um núcleo aquoso. Substâncias lipossolúveis podem ser armazenados na fase lipídica exterior e substâncias solúveis em água na interior fase aquosa..... 21

Figura 9- Esquema representativo de lipossoma ultradeformável..... 23

Figura 10 - Figura representativa de partícula de LDE. Adaptado de (MILIOTI et al., 2008). 27

Figura 11 - Estrutura química dos surfactantes e dos lipídios utilizados no preparo das formulações de nanoemulsão LDE e dos lipossomas convencionais e ultradeformáveis..... 30

Figura 12 - Produtos da reação do álcool furfurílico com oxigênio singleto..... 42

Figura 13 - Reação de metabolização do MTT para a formação da formazan pelas células viáveis..... 46

Figura 14- Perfil de transmissão das formulações na ausência da PcAlCl. Em A) LDE; Em B) lipossoma convencional (CL); Em C) lipossoma ultradeformável com Tween 80 (UDLT80); Em D) lipossoma ultradeformável com Span 80 (UDLS80); Em E) lipossoma ultradeformável com Tween 80 (UDLT80); Em D) lipossoma ultradeformável com Span 80 (UDLS80); Em E) lipossoma ultradeformável com

desoxicolato de sódio (UDLCS). Os primeiros perfis estão em vermelho e os últimos em verde. 57

Figura 15 - A) Resultados de diâmetro médio (±DP, colunas) e Índice de polidispersão (IPd) (±DP, linhas) da formulação de lipossoma convencional (CL); B) Resultados de potencial zeta (ς) (±DP, colunas) da formulação de lipossoma convencional (CL) para o estudo de estabilidade pelo período de 180 dias. 60

Figura 16 - A) Resultados de diâmetro médio (±DP, colunas) e Índice de polidispersão (IPd) (±DP, linhas) da formulação de lipossoma convencional incorporado com ftalocianina de cloro-alumínio (CLPc); B) Resultados de potencial zeta (ς) (±DP, colunas) da formulação de lipossoma convencional incorporado com ftalocianina de cloro-alumínio (CLPc) para o estudo de estabilidade pelo período de 180 dias. 61

Figura 17 - Espectro de absorção da PcAlCl incorporada em lipossoma convencional (CLPc) no decorrer de 30 dias indicando a estabilidade da formulação formada. 63

Figura 18 - Espectro de absorção no UV-visível normalizado da PcAlCl em etanol espectroscópico e incorporada em meio lipossomal tamponado (5 µM) na faixa espectral 300-800 nm. **CLPc** = Lipossoma convencional incorporado com PcAlCl; **UDLT80Pc** = Lipossoma ultradeformável com Tween 80 e incorporado com PcAlCl; **UDLS80Pc** = Lipossoma ultradeformável com Span 80 e incorporado com PcAlCl; **UDLCSPc** = Lipossoma ultradeformável com desoxicolato de sódio e incorporado com PcAlCl. 66

Figura 19 - Espectro de fluorescência normalizado da PcAlCl em etanol espectroscópico (**-**) (0,5 µM) e incorporada em meio lipossomal tamponado (**- -**) (0,5 µM) na faixa espectral 650-800 nm com λ_{exi}= 614nm. **CLPc** = Lipossoma convencional incorporado com PcAlCl; **UDLT80Pc** = Lipossoma ultradeformável com Tween 80 e incorporado com PcAlCl; **UDLS80Pc** = Lipossoma ultradeformável com Span 80 e incorporado com PcAlCl; **UDLCSPc** = Lipossoma ultradeformável com desoxicolato de sódio e incorporado com PcAlCl; **LDEPc** = Nanoemulsão de LDE incorporada com PcAlCl. 68

Figura 20 - Mecanismo fotoquímico envolvido no consumo de oxigênio singleto pelo AFF. 75

Figura 21 - Consumo de oxigênio pelo álcool furfurilico em função do tempo de irradiação. **CLPc** = Lipossoma convencional incorporado com PcAlCl; **UT80Pc** = Lipossoma ultradeformável com Tween 80 e incorporado com PcAlCl; **US80Pc** = Lipossoma ultradeformável com Span 80 e incorporado com PcAlCl; **UCSPc** = Lipossoma ultradeformável com desoxicolato de sódio e incorporado com PcAlC 77

Figura 22 - Avaliação da toxicidade das formulações e na ausência de luz em células de glioblastoma (U87MG) e melanoma (B16F10). LDE = Nanoemulsão de LDE; CL = Lipossoma concenvional; UT80 = Lipossoma ultradeformável com Tween 80; US80 = Lipossoma ultradeformável com Span 80; UCS = Lipossoma ultradeformável com desoxicolato de sódio. Dados corresponde a três ensaios independentes em triplicata (n=3). 81

Figura 23 - Avaliação da toxicidade das formulações incorporadas com PcAlCl (2 μM) na ausência de luz em células de glioblastoma (U87MG) e melanoma (B16F10). PcAlCl = Ftalocianina de cloro-alumínio; CLPc = Lipossoma convencional incorporado com PcAlCl; UDLT80Pc = Lipossoma ultradeformável com Tween 80 e incorporado com PcAlCl; UDLS80Pc = Lipossoma ultradeformável com Span 80 e incorporado com PcAlCl; UDLCSPc = Lipossoma ultradeformável com desoxicolato de sódio e incorporado com PcAlCl; LDEPc = Nanoemulsão de LDE incorporada com PcAlCl. Dados corresponde a três ensaios indenpendentes em triplicata (n=3)..... 82

Figura 24 - a Viabilidade celular das células de glioblastoma da linhagem U87MG determinado por ensaio de MTT após 24 h da TFD com a PcAlCl e PcAlCl incorporada nas formulações. PcAlCl = Ftalocianina de cloro-alumínio; CLPc = Lipossoma convencional incorporado com PcAlCl; UDLT80Pc = Lipossoma ultradeformável com Tween 80 e incorporado com PcAlCl; UDLS80Pc = Lipossoma ultradeformável com Span 80 e incorporado com PcAlCl; UDLCSPc = Lipossoma ultradeformável com desoxicolato de sódio e incorporado com PcAlCl; LDEPc = Nanoemulsão de LDE incorporada com PcAlCl. Analise da variância (ANOVA) mostrou diferenças significativas entre as concentrações ($p<0.01$) em relação ao grupo controle. Dados são expressos em medias ± desvio padrão (n=3). 84

Figura 25 - Viabilidade celular das células de melanoma da linhagem B16F10 determinado por ensaio de MTT após 24 h da TFD com a PcAlCl e PcAlCl incorporada nas formulações. PcAlCl = Ftalocianina de cloro-alumínio; CLPc = Lipossoma convencional incorporado com PcAlCl; UDLT80Pc = Lipossoma ultradeformável com Tween 80 e incorporado com PcAlCl; UDLS80Pc = Lipossoma ultradeformável com Span 80 e incorporado com PcAlCl; UDLCSPc = Lipossoma ultradeformável com desoxicolato de sódio e incorporado com PcAlCl; LDEPc = Nanoemulsão de LDE incorporada com PcAlCl. Analise da variância (ANOVA) mostrou diferenças significativas entre as concentrações ($p<0.01$) em relação ao grupo controle. Dados são expressos em medias ± desvio padrão (n=3). 88

Figura 26 - Gráficos representativos de apoptose e necrose de células U87MG incubadas com annexin V-PE e 7-AAD apos 24 h da TFD..... 91

LISTA DE TABELAS

Tabela I: Resultado da caracterização físico-química das formulações. 51

Tabela II: Velocidade de sedimentação e de clarificação. 59

Tabela III: Deformidade das partículas nas formulações 66

Tabela IV: Valores do Φ_F para a PcZn em etanol (padrão), para a PcAlCl em etanol e incorporada nas formulações. 72

Tabela V: Dados de espectroscopia de fluorescência resolvida no tempo. 74

Tabela VI: Eficiência de encapsulação dos sistemas lipossomais. 75

Tabela VI: Rendimentos quânticos de oxigênio singleto (Φ_Δ) para os sistemas lipossomais. 80

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Φ_F	Rendimento quantico de fluorescência
$^{\bullet}O^{2}$	Radical superóxido
$^{1}O_2$	Oxigênio singleto
AFF	álcool furfurílico
ATCC	American Type Culture Colletion
B16F10	linhagem celular de melanoma metastático pigmentada
BHE	Barreira Hematoencefálica
$ClAlPcS_2$	Ftalocianina de cloro aluminio disulfonada
CLPc	Lipossoma convencional incorporado com PcAlCl
CO_2	Dióxido de carbono
DMEM	Meio de cultura Eagle Modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DP	Desvio padrão
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
ERNs	Espécies Reativas de Nitrogênio
GBM	Glioblastoma Multiforme
HLB	Equilíbrio hidrofílico/lipofílico
HpD	Hematoporfirina
INCA	Instituto Nacional do Câncer
KCl	Cloreto de potássio
LC	Lipossoma convencional
LDE	Nanoemulsão lipidica sem proteína

LDEPc	Nanoemulsão lipidica sem proteína incorporada com PcAlCl
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LED	Diodo emissor de luz
MPa	Unidade de pressão MegaPascal
MTT	3[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-brometo difenil tetrazolium
$Na_2H_2PO_4.H_2O$	Bifosfato de sódio monohidratado
$Na_2HPO_4.7\ H_2O$	Fosfáto de sódio heptahidratado
NaCl	Cloreto de sódio
NIR	Região do infravermelho próximo
nm	Unidade de comprimento nanometro
ns	Unidade de tempo nanosegundos
$OH^{\bullet}$	Radical hidroxila
PBS	Tampão fosfato salino
Pc	Fármaco fotossensibilizante
PcAlCl	Cloro aluminio ftalocianina
PcZn	Ftalocianina de zinco
PDI	Índice de polidispersão
RCF	Força centrifuga relativa
rLDL	Redeptor de Lipoproteína de baixa densidade
S_0	Estado singleto fundamental
S_1	Estado excitado singleto de menor energia
S_n	Estado singleto excitado
SNC	Sistema Nervoso Central
TFD	Terapia Fotodinâmica
T_n	Estado tripleto excitado

U87MG	linhagem celular de glioblastoma
UDL	Lipossoma ultradeformável
UDLCS	Lipossoma ultradeformável com desoxicolato de sódio
UDLCSPc	Lipossoma ultradeformável com desoxicolato de sódio e incorporado com PcAlCl
UDLPcs	Lipossomas ultradeformáveis incorporados com PcAlCl
UDLS80	Lipossoma ultradeformável com Span 80
UDLS80Pc	Lipossoma ultradeformável com Span 80 e incorporado com PcAlCl
UDLT80	Lipossoma ultradeformável com Tween 80
UDLT80Pc	Lipossoma ultradeformável com Tween 80 e incorporado com PcAlCl
v/v	volume/volume
τ_F	tempo de vida singleto-singleto
Φ_Δ	Rendimento quantico de oxigênio singleto

SUMÁRIO

Resumo i
Abstract ii
Lista de figuras iii
Lista de tabelas iv
Lista de abreviaturas e siglas v

1. Introdução 1
1.2 Glioma e a barreira hematoencefálica (BHE) 1
1.3 A pele e o melanoma 4
1.4 Terapia Fotodinamica (TFD) 9
1.4.1 Fármacos fotossensibilizantes 13
1.4.2 Ftalocianinas 15
1.5 Nanotecnologia Farmacêutica 17
1.5.1 Lipossomas 19
1.5.2 Lipossomas Ultradeformáveis 22
1.5.3 Lipoproteinas de baixa densidade (LDL) e LDE 25

2. Objetivos 29
2.1 Objetivos Específicos 29

3. Parte Experimental 30
3.1 Materiais 30
3.2 Aparelhagem 32
3.3 Métodos 34
3.3.1 Preparação da nanoemulsão de LDE 34
3.3.2 Preparação da nanoemulsão de LDE contendo PcAlCl 35
3.3.3 Preparação do lipossoma convencional e dos lipossomas ultradeformáveis 35
3.3.4 Preparação do lipossoma convencional e dos lipossomas ultradeformáveis contendo PcAlCl 36
3.3.5 Determinação do tamanho de partículas e de potencial zeta das formulações 36
3.3.6 Monitoramento da estabilidade acelerada das formulações 37
3.3.7 Monitoramento da estabilidade físico-química em função do tempo 38
3.3.8 Determinação da deformidade das partículas 38
3.3.9 Desenvolvimento do método analítico para determinação de PcAlCl nas formulações 39
3.3.10 Quantificação da PcAlCl nas formulações 39
3.3.11 Determinação da eficiência de encapsulação de PcAlCl nas formulações 40
3.3.12 Determinação do rendimento quântico de fluorescência (Φ_F) 40
3.3.13 Medidas de fluorescência resolvida no tempo: determinação do tempo de vida singleto-singleto (τ_F) 42
3.3.14 Determinação indireta do rendimento quântico de produção do oxigênio singleto (Φ_Δ) 42
3.3.15 Crescimento e manutenção da cultura de células neoplásicas 44
3.3.16 Controle da integridade da membrana celular 45

3.3.17 Determinação da atividade mitocondrial (MTT) 46
3.3.18 Estudos de citotoxicidade na ausência de luz 48
3.3.19 Estudos de fototoxicidade 49
3.3.20 Determinação do mecanismo de morte celular 50
3.3.21 Análises Estatísticas 51

4. Resultados e Discussão 51

4.1 Preparo e caracterização físico-química das formulações 51
4.1.1 Determinação do tamanho de partículas e medida de potencial zeta das formulações 51
4.1.2 Monitoramentos da estabilidade acelerada das formulações 56
4.1.3 Estudo de estabilidade das formulações a longo prazo 60
4.2 Determinação da deformidade das partículas 65
4.2 Caracterizações Fotofísicas 66
4.2.1 Determinação do espectro de absorção e de emissão de fluorescência (UV-visível) 66
4.2.2 Determinação do rendimento quântico de fluorescência (Φ_F) da PcAlCl em etanol e incorporada nas formulações 71
4.2.3 Medidas de fluorescência resolvida no tempo: determinação do tempo de vida singleto-singleto (τ_F) 73
4.2.4 Determinação da eficiência de encapsulação de PcAlCl em sistemas lipossomais 75
4.2.5 Determinação indireta do rendimento quântico de produção do oxigênio singleto (Φ_Δ) 76
4.3 Estudos envolvendo células neoplásicas 81
4.3.1 Toxicidade do composto fotossensível sobre a cultura celular na ausência de luz 81
4.3.2 Estudos de Fototoxicidade 85
4.3.3 Determinação do mecanismo de morte celular 92

5. Conclusão 94

6. Referências Bibliográficas 95
Apêndice A – Estudo da estabilidade acelerada das formulações 128
Apêndice B – Estudo da estabilidade a longo prazo das formulações 131
Apêndice C – Estudo da fotoestabilidade das formulações 135
Apêndice D – Estudo do tempo de vida de fluorescência (τ) das formulações 139

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

SCIENTIA VINCES

1. Introdução

1.1 Gliomas e a barreira hematoencefálica (BHE)

Gliomas malignos estão entre os tipos mais comuns de tumores cerebrais, ocorrendo em 5-7 a cada 100.000 indivíduos por ano (LARJAVAARA et al., 2007; SEHMER et al., 2014). São formados por células presentes na glia que auxiliam no suporte e funcionamento do sistema nervoso central (SNC). Há três tipos de células presentes na glia capazes de desenvolver-se em gliomas: Os astrócitos que irão produzir astrocitomas (incluindo glioblastomas), os oligodendrócitos que irão produzir oligodendrogliomas e as células epidermais que irão produzir ependimomas (Figura 1A) (MORRENS , VAN DEN BROECK e KEMPERMANN, 2012; OHGAKI e KLEIHUES, 2011). Os tumores que exibem uma mistura destas diferentes células são chamados gliomas mistos (OMURO e DEANGELIS, 2013). O tipo mais comum de glioma é conhecido como glioblastoma multiforme (GBM) o qual ocorre em 60-70% dos casos (Figura 1B). Este tipo de tumor tem como características mais comuns, um crescimento rápido e agressivo de células tumorais com uma capacidade de se infiltrar no tecido adjacente saudável do cérebro de forma difusa, o que dificulta a visualização e delimitações da área tumoral e consequentemente a sua remoção total (BEAUCHESNE et al., 2016). Esse tipo de patologia é sempre associado a um prognóstico ruim, podendo acometer qualquer parte do tecido cerebral e da medula espinhal, e a uma expectativa de vida muito curta entre 12 e 15 meses (ROBERTS et al., 2011; SCHNEIDER et al., 2016).

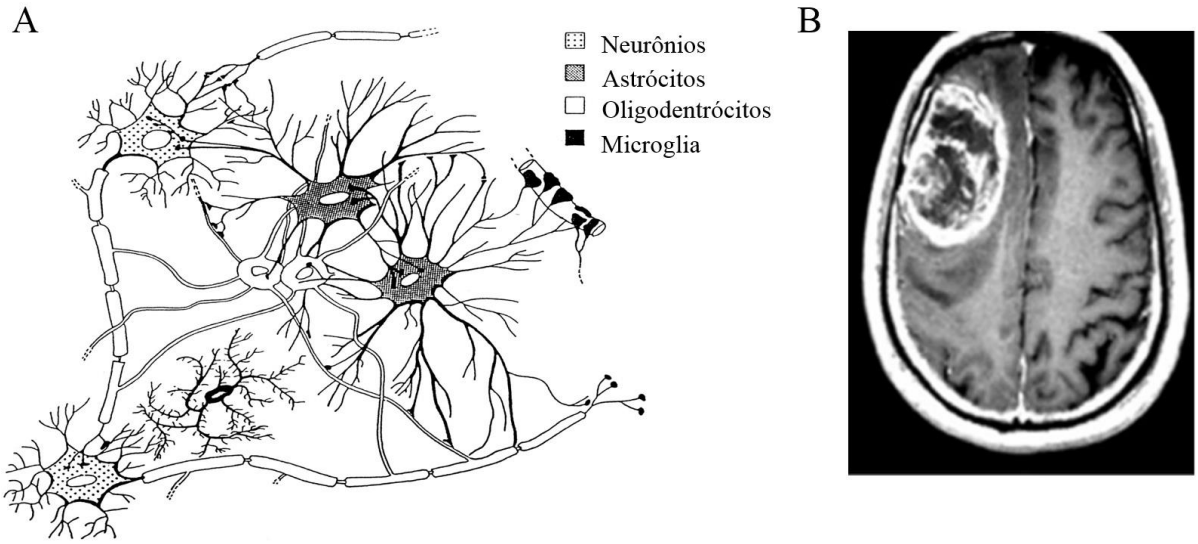


Figura 1- Representação esquemática dos diferentes tipos de células gliais no sistema nervoso central (SNC) e suas interações, entre si e com os neurônios. (A); Glioblastoma multiforme com contraste de Gadolinium (Gd^{3+}) (B). Adaptado de (BAUMANN e PHAM-DINH, 2001; BISWAS, 2012).

Como opção mais utilizada de tratamento, adota-se ressecção cirúrgica, seguida por tratamento com radiação e quimioterapia com Temozolamida, que combinadas conferem um período médio de sobrevivência do paciente de até 14,6 meses (STUPP , MASON e VAN DEN BEUF, 2005; ZHANG et al., 2016). Contudo, às células do glioma tem apresentado resistência à radiação e a quimioterapia com base nos protocolos difundidos utilizados frequentemente (JOHANSSON et al., 2010). Além disso, a natureza das células tumorais do GBM e a existência de barreiras fisiológicas, especialmente a barreira hematoencefálica (BHE), o GBM continua sem cura. A falta da capacidade de permeação de fármacos na BHE faz com que o tratamento quimioterápico do glioblastoma seja limitado (LI et al., 2014c).

A barreira hematoencefálica (BHE) é uma barreira celular que separa o sangue do tecido cerebral que regula a composição iônica de forma adequada para a sinalização sináptica, previne a entrada de macromoléculas e protege o sistema

nervoso central de neurotoxinas assegurando a nutrição cerebral (VAN TELLINGEN et al., 2015). A BHE é formada por células endoteliais que se organizam de forma alinhada e paralela aos capilares sanguíneos e por uma fina lamina basal (VIEIRA e SOUZA, 2013). Essa barreira possui junções oclusivas que impedem cerca de 98% de todas as pequenas moléculas terapêuticas e quase todas as proteínas, peptídeos, oligonucleotideos de chegarem ao sistema nervoso central (GANTA et al., 2010).

A BHE age como uma barreira física devido à presença das junções entre as células endoteliais adjacentes, o que força a maioria do transporte de substancias do sangue para o tecido cerebral ser pela via transcelular do que pela via paracelular por meio das junções (Figura 2) (ABBOTT , RONNBACK e HANSSON, 2006).

Pequenas moléculas lipossolúveis são transportadas livremente por difusão simples pela membrana plasmática, como por exemplo: gases, fármacos barbitúricos e etanol (ABBOTT et al., 2010). A presença de receptores de membrana capazes de transportar moléculas especifica regulam a via transcelular, o que proporciona um transporte seletivo, permitindo ou facilitando a entrada de moléculas importantes para a nutrição e excluindo ou expulsando moléculas capazes de causar dano ao tecido cerebral (GANTA et al., 2010). Grandes moléculas de caráter hidrofílico, como é o caso dos peptídeos e proteínas, geralmente não conseguem passar pela BHE, a não ser que possam ser transportadas por transcitose de maneira especifica por reconhecimento de um receptor ou por maneira inespecífica pelo processo de adsorção (ABBOTT et al., 2010; GOMES , DAS NEVES e SARMENTO, 2014).

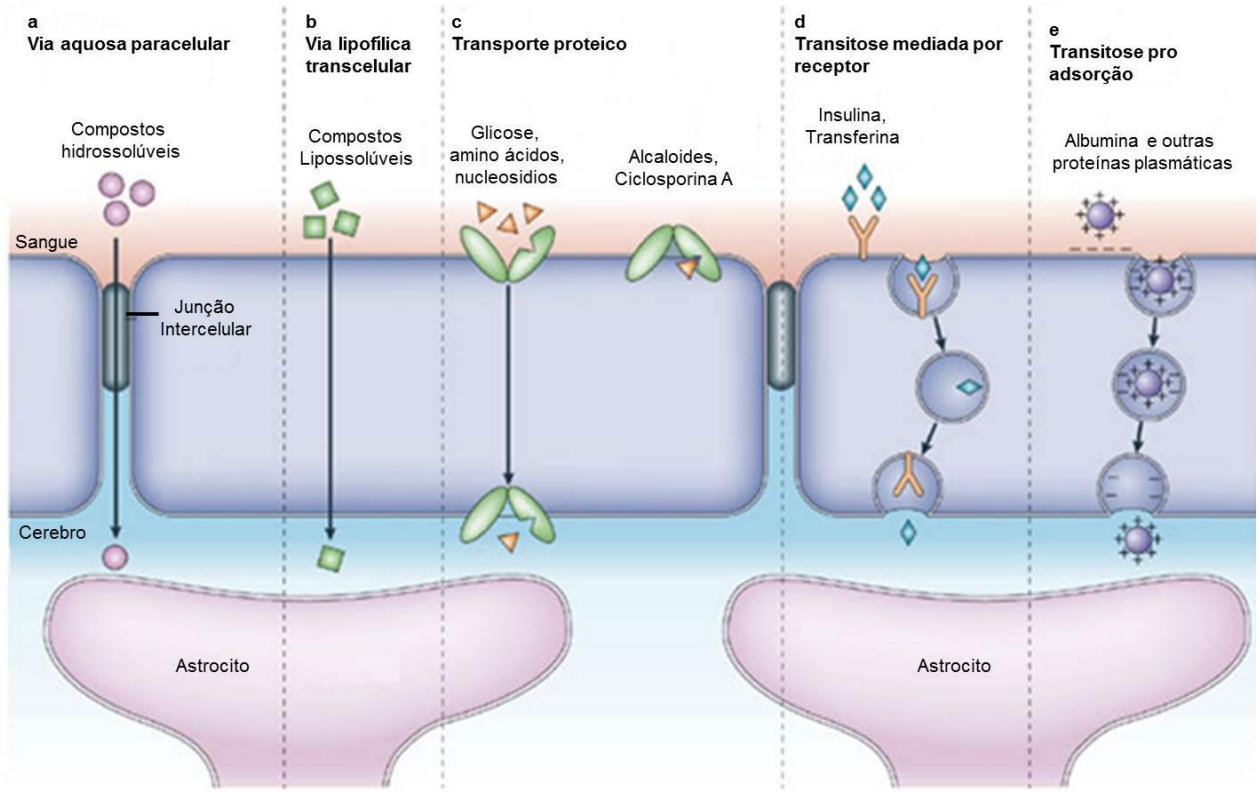


Figura 2 - Vias de permeação pela barreira hematoencefálica (BHE). Adaptado de (ABBOTT , RONNBACK e HANSSON, 2006).

Na última década, várias técnicas têm sido abordadas como alternativas para o tratamento do glioblastoma, visando o aumento da seletividade do tecido alvo e o aumento da permeabilidade da BHE com utilização de novas técnicas juntamente com a nanotecnologia (BECHET et al., 2014).

1.2 A pele e o melanoma

A pele é o maior órgão do corpo humano cobrindo uma área de 1 a 2 m² e representa, aproximadamente, 16% do total do peso corporal. Sua espessura pode variar de 1,5 mm a 4 mm. É um tecido complexo formado por várias camadas: a hipoderme (a camada mais interna), a derme (a camada intermediária) e a epiderme (a

camada mais superficial), que trabalham de forma harmônica, garantindo assim suas funções (RABELLO, 2011).

A pele age como primeira linha de defesa do corpo contra agressões do ambiente externo, possuindo características físicas e químicas promovendo uma proteção biológica. Essa proteção está intrinsecamente associada à sua camada mais externa, a epiderme (Figura 3) (KASEMSARN , BOSCO e NIXON, 2016).

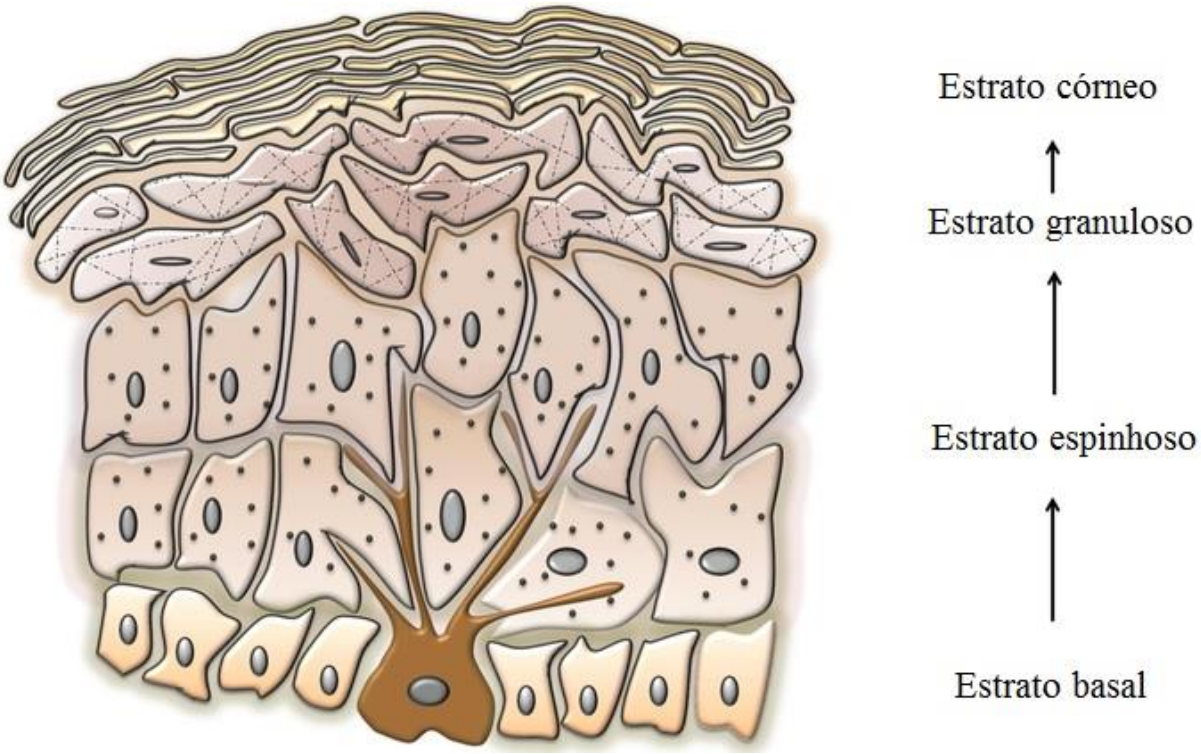


Figura 3 - Estrutura da Epiderme. Adaptada de (NATARAJAN et al., 2014).

A epiderme é constituída por quatro camadas distintas (estrato córneo, estrato granuloso, estrato espinhoso e estrato basal), que são formadas por meio da estratificação dos queratinócitos que passam do estrato basal em sentido ao estrato córneo durante o seu processo de maturação, até serem eliminadas (NAGARATNAM;

NAGARATNAM e CHEUK, 2016; NATARAJAN et al., 2014). O estrato córneo é formado pelos corneócitos, os quais são circundados por uma densa porção proteica (envelope celular) e regiões lipídicas, composição primordial na função de defesa (barreira) da pele humana que impede a entrada de agentes externos, dificultando a utilização dessa via para fins terapêuticos (JUNGERSTED et al., 2010).

O câncer de pele tem origem na epiderme, composto por células da pele (escamosas, basais e melanocíticas) que sofreram alterações e multiplicaram-se de maneira desordenada e anormal dando origem as neoplasias cutâneas. As neoplasias cutâneas podem ser classificadas em dois tipos distintos de acordo com a sua origem celular: o tipo não melanocítico, derivado de células epiteliais capazes de formar carcinomas basocelulares e epidermoide ou escamosos, e o tipo melanoma formado a partir dos melanócitos (JEE et al., 2015; PERRY et al., 2016; VISCONTI et al., 2015).

O Instituto Nacional de Câncer (INCA) estima que o câncer de pele do tipo não melanocítico seja o mais incidente na população brasileira, com cerca de 175.760 casos novos a cada ano, sendo 80.850 em homens e 94.910 em mulheres, que corresponde a 29% do total estimado para o ano de 2016. Por outro lado, o melanoma de pele é menos frequente do que os carcinomas basocelulares e escamosos, porém sua letalidade é mais elevada, com previsão no Brasil de 5.670 novos casos de melanoma cutâneo para o ano de 2016, sendo 3.000 homens e 2.670 mulheres (INCA, 2016; REDMAN , GIBNEY e ATKINS, 2016; VISCONTI et al., 2015).

O tratamento do melanoma é limitado apesar dos avanços nas áreas de imunoterapia e terapia direcionada. O tratamento primário é a ressecção cirúrgica, para tumores menores que 2 mm com ou sem o acometimento de linfonodos pela metástase, seguido por radioterapia e para casos onde o melanoma já esta em um quadro

avançado é utilizado o Interferon alfa-2b (ALGAZI , SOON e DAUD, 2010). Entretanto, o efeito do tratamento com Interferon é limitado e sua indicação ainda é controversa. Outra linha de tratamento é a administração oral de Temozolamida, mas seu efeito geralmente é inferior a 15% (GARBE et al., 2011).

Apesar dos significantes progressos científicos no entendimento da biologia e genética do melanoma, nenhum tratamento efetivo contra esse tipo de câncer está disponível atualmente (ALGAZI , SOON e DAUD, 2010). Novos tratamentos vêm sendo pesquisados em busca de uma melhor resposta frente ao melanoma. Uma alternativa que vem mostrando resultados promissores é a administração tópica visando aumentar a seletividade e a concentração dos fármacos obtendo assim uma melhor resposta.

A via tópica de administração de formulações farmacêuticas oferece várias vantagens sobre as demais vias de administração, dentre elas: evitar o metabolismo de primeira passagem, liberação sustentada e controlada por um longo período de tempo, redução dos efeitos associados com toxicidade, aumento da aceitação do paciente, acesso direto ao local onde a patologia se instala além de ser uma via conveniente e que não causa dor (KERN e WEISER, 2015; THOMPSON e BROOKS, 2015).

Formulações farmacêuticas em contato com a superfície da pele podem permeá-la por diferentes mecanismos: diretamente pelo estrato córneo, pelas vias paracelular e transcelular, onde a formulação interage ou se difunde por meio do estrato córneo, ou pela via apêndices da pele (folículos de pele, ductos sudoríparos e glândulas sebáceas) (Figura 4). A contribuição da permeação de formulações farmacêuticas pela via apêndices da pele é mínima, chegando a aproximadamente 0,1%, com isso, as principais vias de permeação são as paracelular e a transcelular (CHEN et al., 2015b; DESAI , PATLOLLA e SINGH, 2010; KERN e WEISER, 2015; VISCONTI et al., 2015).

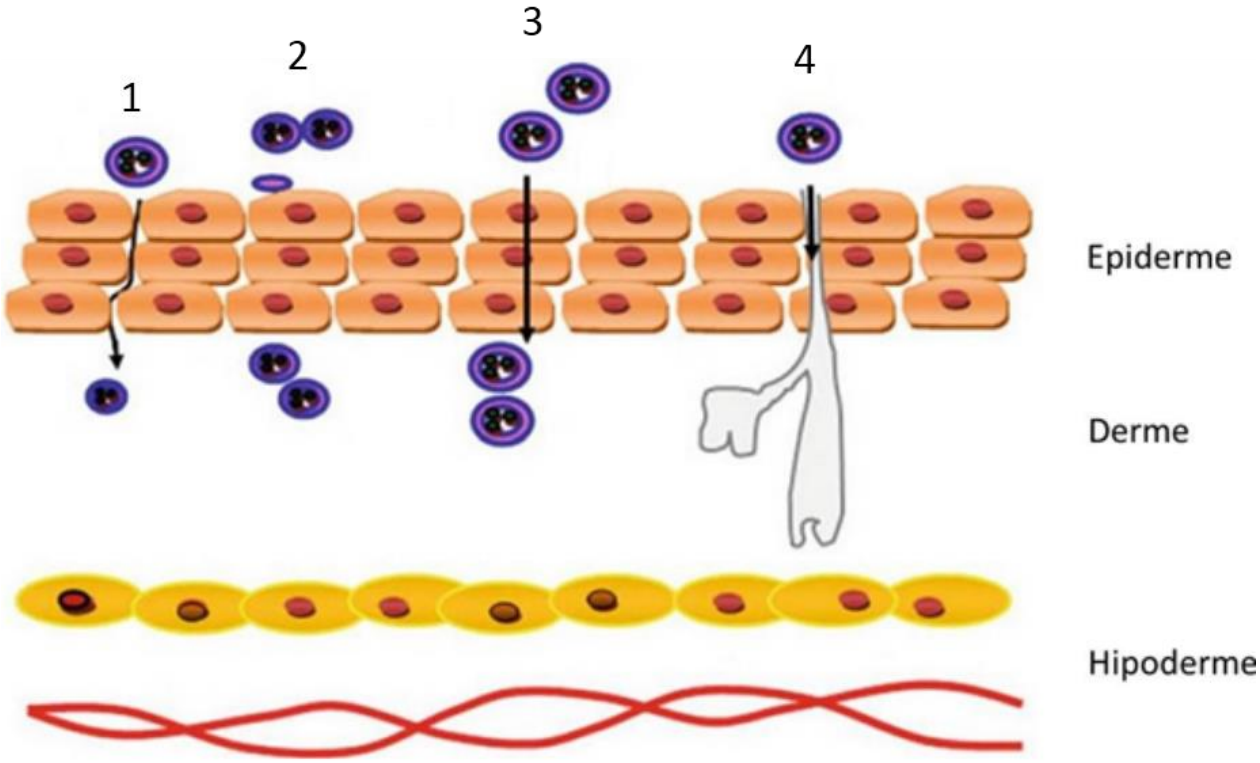


Figura 4 - Mecanismos de permeação da pele. (1) via paracelular; (2) Interação com os lipídios da pele; (3) via Transcelular; (4) via folículos de pelo e poros glandulares. Adaptado de (AGRAWAL; GUPTA e VYAS, 2016).

A passagem de fármacos por meio da pele não depende só de sua natureza química, mas também da composição da formulação onde são incorporadas. A veiculação de produtos farmacêuticos em formulações magistrais visa reduzir a ação da barreira cutânea, favorecendo a permeação do ativo medicamentoso por meio da pele.

Trabalhos como o de REDMAN , GIBNEY e ATKINS (2016) e SIQUEIRA-MOURA et al., (2013), descrevem o uso de formulações tópicas para o tratamento de melanomas, e obtiveram resultados promissores no tratamento de câncer de pele.

1.4 Terapia Fotodinâmica (TFD)

A Terapia Fotodinâmica (TFD) vem sendo apresentada como uma alternativa para o tratamento de muitas patologias como: doenças de pele, infecções localizadas, degeneração macular relacionada a idade, sobretudo neoplasias, com resultados promissores obtidos em estudos *in vitro* e *in vivo* contra gliomas e melanoma (CENGEL, 2012; KARRER et al., 2013; SAINI e POH, 2013). É uma técnica simples, não invasiva e não requer tecnologia de alto custo o que é conveniente para uso em países em desenvolvimento (AKILOV et al., 2007).

O procedimento consiste na administração de um fármaco fotossensibilizante por via sistêmica ou tópica ao paciente. Em seguida, após um período de tempo adequado, o tecido cancerígeno alvo é irradiado por uma fonte de luz visível em comprimento de onda adequado capaz de excitar a molécula do fármaco fotossensibilizante, a qual, resulta na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) em presença do oxigênio molecular tecidual (BAPTISTA e WAINWRIGHT, 2011; CAMUR , AHSEN e DURMUS, 2011).

A maioria dos dados disponíveis sobre a TFD sugere um mecanismo comum de ação. Quando o fármaco fotossensibilizante utilizado absorve luz (irradiação), uma série de processos fotofísicos e fotoquímicos têm início. Uma vez que a molécula do fármaco fotossensibilizante alcança um estado eletronicamente excitado, existem diversos mecanismos de desativação para que a mesma retorne ao seu estado eletrônico de menor energia, que se denomina estado fundamental. Tais processos de desativação são apresentados no Diagrama de Jablonski (Figura 5)

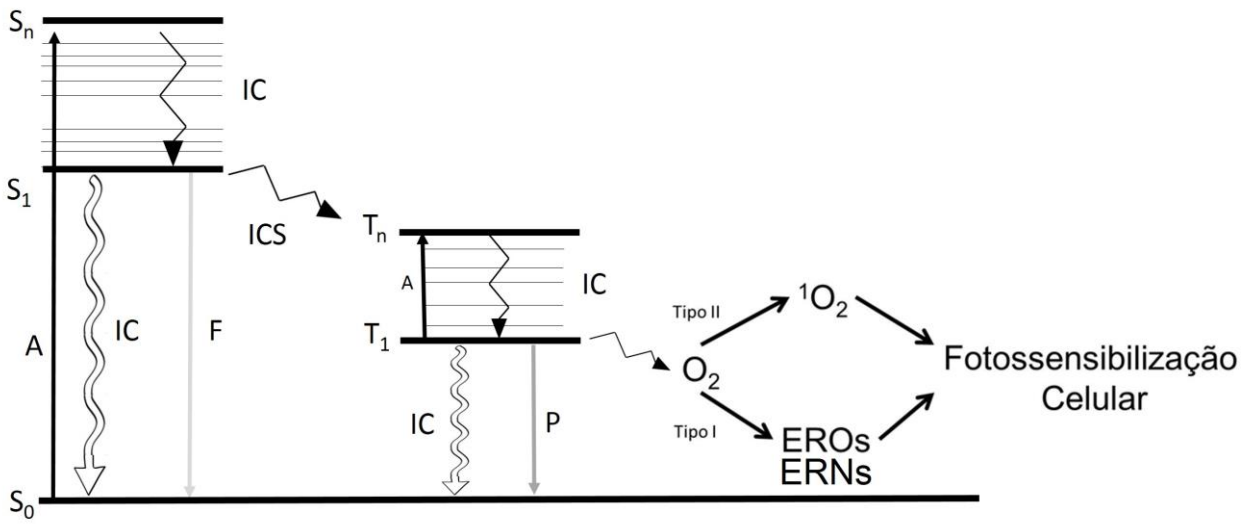


Figura 5 - Digrama de Jablonski para o processo de fotossensibilização, onde A = absorção de luz de comprimento de onda adequado, S_0 = estado fundamental, S_1 = primeiro estado excitado singleto, Sn = estados excitados singleto superiores, IC = conversão interna, F = Fluorescência, T_1= primeiro estado excitado tripleto, T_n = estados excitados tripleto superiores, O_2 = oxigênio molecular, $^1O_2$ = oxigênio singleto, EROs = espécies reativas de oxigênio, ERNs = espécies reativas de nitrogênio. Fonte: Autor.

Após a absorção de um fóton de luz, o fármaco fotossensibilizante passa a popular um estado excitado singleto mais energético (S_n), de onde pode retornar ao seu estado fundamental (S_0) por meio do processo de relaxação física conhecido como conversão interna ou por meio do processo radioativo de emissão de fluorescência. As propriedades fluorescentes dos fármacos fotossensibilizantes são úteis para a visualização, localização e delineação de lesões malignas (RANYUK et al., 2013; YAMADA et al., 2013). Por outro lado, o fármaco fotossensibilizante pode dar origem ao estado excitado tripleto, um estado de energia ligeiramente mais baixa que o estado excitado singleto e com tempo de vida mais longo (μs-ms), por meio de conversão de spin eletrônico, no processo chamado cruzamento intersistema (RONZANI et al., 2013). A ação fotodinâmica é dependente do processo de cruzamento intersistema. Os fármacos fotossensibilizantes mais eficientes para a TFD têm um alto rendimento

quântico do estado excitado tripleto e tempos de vida tripleto longos. Por meio deste processo, o fármaco fotossensibilizante passa a popular os estados excitados tripleto de maior energia (T_n). A partir de seu estado excitado tripleto mais energético, o fármaco fotossensibilizante pode perder energia, decaindo para seu estado excitado de menor energia (T_1) por meio do processo de conversão interna. Nesse estado, o fármaco fotossensibilizante pode absorver mais um fóton e retornar para seu estado excitado de maior energia (T_n) ou retornar ao seu estado fundamental pelo processo de conversão interna ou por meio do processo radiativo como emissão de fosforescência (ROBERTSON , EVANS e ABRAHAMSE, 2009).

O fármaco fotossensibilizante a partir do mais baixo estado excitado tripleto (T_1) pode ainda sofrer reações fotoquímicas do Tipo I (transferência de elétrons ou abstração de átomo de Hidrogênio) ou do Tipo II (transferência de energia). Como mencionado anteriormente, a maioria dos dados sobre TFD sugerem um mecanismo comum de ação, onde o fármaco fotossensibilizante no estado excitado tripleto na presença do oxigênio molecular presente no meio, induz a produção de espécies reativas de oxigênio ($^1O_2$, $O_2^{\bullet}$, $OH^{\bullet}$, denominados EROs) e/ou espécies reativas de Nitrogênio (NO*, NO_2*, ONOO*, denominados ERNs) que atacam centros específicos dentro dos sistemas celulares, levando à necrose ou apoptose celular (CHEN et al., 2016; KALUDERCIC e GIORGIO, 2016; KALYANARAMAN , HARDY e ZIELONKA, 2016).

O mecanismo Tipo I envolve a abstração de um átomo de hidrogênio ou reações de transferência de elétrons entre o fármaco fotossensibilizante no estado excitado tripleto e diferentes macromoléculas biológicas, levando à formação de radicais livres e/ou íons radicais (BOLFARINI et al., 2014). Poucos materiais biológicos

apresentam facilidade de fotoredução (por exemplo, quinonas e citoquinas) em processos nos quais temos a oxidação do fármaco fotossensibilizante a cátion radical-π e o substrato é reduzido (DURANTINI et al., 2016). A espécie reduzida pode transferir um elétron ao oxigênio molecular presente no meio formando espécies reativas de oxigênio como peróxidos, ânion superóxido, etc. Este tipo de fotossensibilização é conhecido como sendo do Tipo I.

Outro caminho possível para o fármaco fotossensibilizante em seu estado excitado tripleto é o de transferência de energia para o oxigênio molecular com formação do oxigênio singleto ($^1O_2$). O oxigênio singleto é uma espécie altamente reativa que oxida vários substratos biológicos. Acredita-se que o oxigênio singleto seja o principal mediador dos danos fotodinâmicos nos sistemas biológicos, pois reage rápida e indiscriminadamente com os mais variados materiais biológicos eletrofílicos, como lipídios insaturados, proteínas, ácidos nucleicos, etc. Sendo apontado como o principal responsável pela inativação da célula tumoral (CLEMENT et al., 2016). Este tipo de fotossensibilização é conhecido como fotossensibilização do Tipo II.

Nos últimos anos, o interesse nos processos de fotossensibilização tem aumentado principalmente devido aos efeitos fotodinâmicos mediados por fármacos observados em sistemas biológicos. O $^1O_2$ gerado pela reação do Tipo II é extremamente importante para o sucesso da TFD. Acredita-se que ele é um intermediário chave em muitos processos oxidativos fotoinduzidos em sistemas químicos ou biológicos, sendo considerado a principal espécie citotóxica, responsável pela inativação da célula, embora recentemente tenha sido mostrado que os mecanismos Tipo I e Tipo II, provavelmente agem em harmonia na maioria dos casos e

a razão entre eles é influênciada pelas características do fármaco fotossensibilizante, dos substratos intracelulares e pela concentração de oxigênio do meio (CLEMENT et al., 2016). Assim, ambos os mecanismos levam a danos oxidativos similares e reações em cadeia de radicais livres, induzindo morte celular e destruição tumoral.

Os produtos das reações ocorridas pelos mecanismos Tipo I e Tipo II são altamente reativos, com tempo de vida médio de 10 a 50 µs. Portanto, os danos causados por essas espécies são dependentes de sua difusão no ambiente onde são formadas, podendo chegar até a 0,1 µm de distância (CAMUR , AHSEN e DURMUS, 2011; ZEBALLOS et al., 2012). Esse comportamento combinado com o uso de um fármaco fotossensibilizante de retenção preferencial pelos tecidos de interesse é à base da seletividade da TFD (RONZANI et al., 2013).

1.4.1 Fármacos fotossensibilizantes

A excitação do fármaco fotossensibilizante depende do comprimento de onda no qual a luz é absorvida, esse fenômeno é geralmente muito seletivo e a eficiência da absorção difere entre as classes de fármacos fotossensibilizantes. Os sistemas biológicos apresentam substâncias capazes de absorver luz, tais como a melanina e a hemoglobina, que absorvem a luz na região do espectro azul e verde (MILANIC et al., 2011). Assim, para a eficiência da TFD sob o aspecto fotofísico, o fármaco fotossensibilizante deve ser fotoquimicamente ativo e com alta eficiência de absorção na porção do espectro denominada “janela terapêutica”, que compreende a faixa do vermelho ao infravermelho próximo (600 nm – 800 nm), podendo penetrar até 1 cm no tecido (FARAHI et al., 2010; XU et al., 2009).

Um dos fármacos fotossensibilizantes mais utilizado e aprovado clinicamente é um derivado da Hematoporfirina (HpD) conhecido comercialmente como Photofrin II (Figura 6) (KULBACKA, 2015; NWOGU et al., 2016; PENJWEINI et al., 2015; SCHAFFER et al., 2013). Entretanto, esses derivados, chamados de fotossensibilizantes de primeira geração, apresentaram algumas desvantagens com relação ao seu uso em TFD, como baixa seletividade ao tecido tumoral e baixa absorção de luz na região do vermelho (NAYAK et al., 2016)

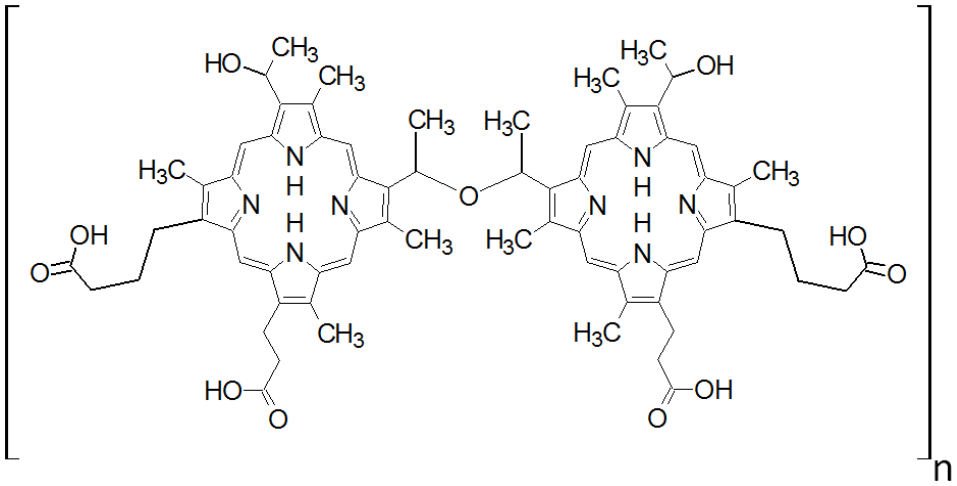


Figura 6 - Estrutura molecular do medicamento Photofrin®. Fonte: Autor.

Os problemas encontrados com os compostos derivados da Hematoporfirina levaram ao desenvolvimento de novas moléculas, chamadas de fármacos fotossensibilizantes de segunda e terceira geração, como as ftalocianinas, clorinas e bacterioclorinas (MACHADO et al., 2010; RANYUK et al., 2013; XU et al., 2009).

Contudo, esses compostos apresentam características indesejadas, como baixa absorção na região acima de 600 nm, retenção no organismo por longos períodos de tempo (por volta de 4 semanas) e pouca especificidade ao tecido alvo, acumulando-se

em tecidos normais, principalmente o epitelial (MACHADO et al., 2010; RANYUK et al., 2013). Sendo assim, novos fármacos fotossensibilizantes para a TFD têm sido pesquisados em estudos clínicos no decorrer dos anos (CEYLAN et al., 2015; DE PAULA et al., 2015; PEREZ et al., 2014; SILVA et al., 2015; ZEBALLOS et al., 2012).

1.4.2 Ftalocianinas

Como fármacos fotossensibilizantes de segunda geração, as ftalocianinas possuem propriedades fotofísicas vantajosas e diversos estudos mostram seu potencial para a TFD (CAMUR , AHSEN e DURMUS, 2011; LONGO et al., 2013; MACHADO et al., 2010). As ftalocianinas são pigmentos tetraazoindólicas análogas às porfirinas com forte absorção na região do vermelho do espectro eletromagnético (670 nm 780 nm), cuja estrutura molecular pode ser modificada inserindo-se ligantes periféricos e/ou axiais, bem como metais entre quatro nitrogênios centrais (Figura 7), com extensa aplicação, industrial, tecnológica e médica (CAMUR , AHSEN e DURMUS, 2011; KULBACKA, 2015; ZEBALLOS et al., 2012).

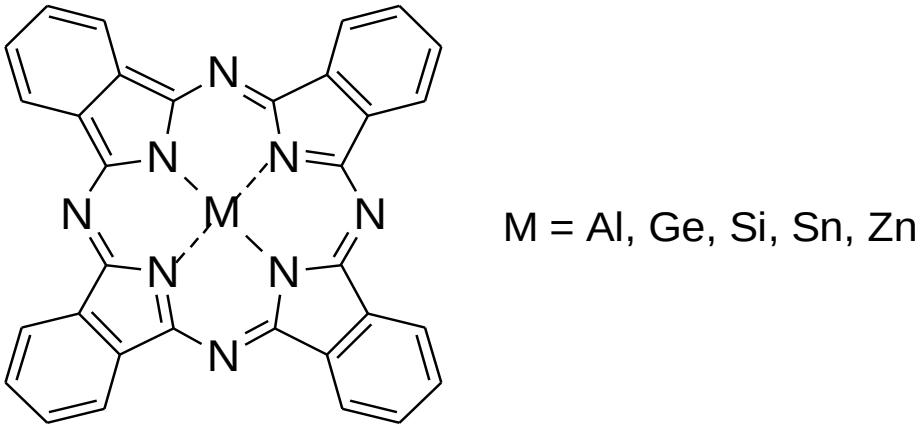


Figura 7: Estrutura molecular das ftalocianinas. Fonte: Autor.

Entretanto, por apresentarem baixa solubilidade em água o seu uso em TFD é limitado, uma vez que impede a administração da mesma pela via intravenosa (meio fisiológico). Uma maneira de contornar esse problema é a inserção de substituintes periféricos ou axiais polares em sua estrutura como: grupos aminos, carboxilatos, sulfonatos e grupos hidroxilas (CAMUR , AHSEN e DURMUS, 2011). Estudos têm mostrado que tais ligantes podem melhorar as características físico-químicas do fármaco fotossensibilizante e consequentemente influência seu comportamento farmacocinético e farmacodinâmico. Além disso, esses grupos proporcionam um aumento no caráter hidrofílico da molécula aumentando sua solubilidade em meio aquoso, além de impedir de forma estérica a formação de agregados que inibem a atividade fotodinâmica do fármaco fotossensibilizante (JAYME , CALORI e TEDESCO, 2016)

Como as ftalocianinas dos complexos Al(III), Ge(IV), Si(IV), Sn(IV) e Zn(II) possuem íons diamagnéticos espera-se um aumento significante do tempo de meia-vida de seu estado tripleto excitado, aumentando a produção de $^1O_2$, tornando-as boas candidatas a fármacos fotossensibilizantes (OGUNSIPE e NYOKONG, 2005).

As ftalocianinas vêm sendo utilizadas na TFD para o tratamento dos mais diversos tipos de câncer, obtendo resultados promissores como tratamento complementar em quadros de melanoma e glioblastoma (ÇAKIR et al., 2015; DIXIT et al., 2015; EL-KHATIB et al., 2015; OGBODU et al., 2015).

A eficiência da TFD depende da capacidade do fármaco fotossensibilizante de se acumular seletivamente nos tecidos tumorais, o que é claramente influênciada pelas propriedades físico-químicas e pelo modo de liberação do fármaco, sendo que sua incorporação em membranas biológicas é bastante favorecida quando se utiliza um

sistema de liberação adequado utilizando várias tecnologias, dentre elas a nanotecnologia (ANDRADE et al., 2015; ARIAS et al., 2011; BARBUGLI et al., 2010; TIBBITT , DAHLMAN e LANGER, 2016)

1.5 Nanotecnologia Farmacêutica

A nanotecnologia farmacêutica propõe o desenvolvimento, caracterização e aplicação de sistemas de liberação controlada de fármacos em escala nanométrica ou micrométrica, frequentemente descritas como "*Drug Delivery Systems*" (DDS), que proporcionam características vantajosas ao fármaco quando comparados a sua administração convencional.

Os estudos de BOVIS et al., (2012) mostraram que a nanotecnologia tem um importante papel na terapia fotodinâmica. Eles estudaram a incorporação e a administração endovenosa do fármaco fotossensibilizante m-tetrahidroxi-fenilclorina (mTHPC) em lipossomas para o tratamento de fibrosarcoma em ratos. Eles observaram uma maior biodisponibilidade e seletividade do mTHPC ao tumor se comparado a sua formulação comercial (Foscan®), aumentando assim sua eficiência na terapia fotodinâmica do fibrosarcoma.

Os sistemas de liberação nanoestruturados apresentam características favoráveis, tais como: proteção do fármaco no sistema biológico contra possíveis instabilidades no organismo; aumento da biocompatibilidade do fármaco; incorporação de fármacos hidrofílicos e lipofílicos; direcionamento do fármaco a alvos específicos; aumento da transcitose do fármaco por meio das barreiras epiteliais e endoteliais; incorporação de dois ou mais fármacos para terapias combinadas; diminuição da dose terapêutica e do número de administrações e aumento da aceitação da terapia pelo

paciente (CALIXTO et al., 2016; DOS SANTOS et al., 2013; GARG et al., 2015; PIMENTEL et al., 2007).

A importância dos sistemas de liberação reside no fato de que raramente um fármaco, veiculado em solução aquosa ou numa forma convencional em meio orgânico, consegue atingir um alvo específico no organismo em concentrações adequadas para provocar o efeito terapêutico esperado, ou sem causar efeitos citotóxicos indesejáveis. Este fato pode ser facilmente entendido quando verificamos que entre o local de administração do fármaco e o órgão ou tecido alvo, se interpõem uma série de obstáculos de naturezas diversas (anatômicos, químicos e biológicos), que devem ser vencidos para que se obtenha o efeito desejado.

O fármaco para desenvolver seu efeito farmacológico, deve passar por várias barreiras biológicas além de estar sujeito à eliminação por uma variedade de processos. Além disso, os fármacos fotossensibilizantes lipofílicos (hidrofóbicos) requerem sistemas de liberação biologicamente compatíveis para sua administração intravenosa. Essas limitações têm motivado o desenvolvimento de diferentes estratégias com o objetivo de aperfeiçoar a ação de vários tipos de fármacos.

Muitas alternativas têm surgido de diferentes áreas da ciência, as quais têm contribuído para contornar estes obstáculos por meio do desenvolvimento de novas formulações, com características que têm permitido transportar substâncias farmacologicamente ativas para sítios específicos do organismo e/ou modular a velocidade de liberação em função do tempo. Estes sistemas podem modificar o perfil de biodisponibilidade do fármaco sem alterar a estrutura química da molécula transportada. (ALLEN e CULLIS, 2013; ANSELMO e MITRAGOTRI, 2016; GARG et al., 2015; TIBBITT , DAHLMAN e LANGER, 2016) Vários sistemas de liberação têm sido

propostos como excelentes veículos para compostos fototóxicos instáveis em meio biológico (ALANAZI et al., 2015; AMAR-LEWIS et al., 2014; DESAI , PATLOLLA e SINGH, 2010) Dentre estes sistemas merecem destaque: os lipossomas, os eritrócitos resselados isolados do sangue, as nanopartículas biodegradáveis, as microesferas protéicas e poliméricas entre outros sistemas (GANTA et al., 2010; JIN et al., 2012; ZHU e LIAO, 2015).

Neste contexto, surgem dentre os vários sistemas carregadores disponíveis, os sistemas lipossomais, que permitem solubilizar fármacos hidrofóbicos em água, mantendo suas características físico-químicas e, além disso, promovem uma distribuição seletiva nos tecidos (ALOMRANI et al., 2014; BARBUGLI et al., 2010; CHEN et al., 2015a).

1.5.1 Lipossomas

Os lipossomas têm sido largamente estudados na medicina e em campos relacionados como sistemas de liberação de agentes terapêuticos *in vivo* ou mesmo como modelos para membranas biológicas (CHEN et al., 2015a; LONGO et al., 2013; MALAM , LOIZIDOU e SEIFALIAN, 2009). Geralmente, são formados a partir de fosfolipídios, que por sua vez, apresentam alta afinidade por bicamadas celulares. Uma das grandes vantagens do uso dos lipossomas como sistemas modelo de membranas biológicas e como sistemas carregadores de drogas, derivam do fato de que estes podem ser preparados a partir de constituintes naturais (AGRAWAL; GUPTA e VYAS, 2016).

Com a utilização de lipossomas como sistemas de liberação de fármacos anticâncer, é possível uma melhor liberação dos fármacos aos sítios alvo, acentuando e

mantendo seus efeitos clínicos, reduzindo assim a sua toxicidade e em última análise é possível ainda protegê-las do metabolismo e respostas imunes (BARBUGLI et al., 2010).

Lipossomas convencionais (LC) são partículas coloidais formadas por uma ou mais bicamadas de fosfolipídios com ou sem aditivos. Há uma grande variedade de lipídios e aditivos que podem ser utilizados na preparação dos lipossomas. Os fosfolipídios podem espontaneamente agregar-se em uma estrutura vesicular após contato com um ambiente aquoso, isso ocorre devido ao seu carácter anfifílico na presença de um solvente polar ou hidrofílico. Possuem uma parte de sua molécula com caráter hidrofílico (cabeça) que se orientam para fase aquosa e as caudas lipofílicas orientação para o outro na presença de água (Figura 8). Essa característica faz com que o lipossoma seja capaz de encapsular ambos os compostos lipofílicos (dentro da bicamada lipídica) e hidrofílicos (núcleo aquoso), além de possuírem uma elevada afinidade para bicamadas de células (ZHU e LIAO, 2015).

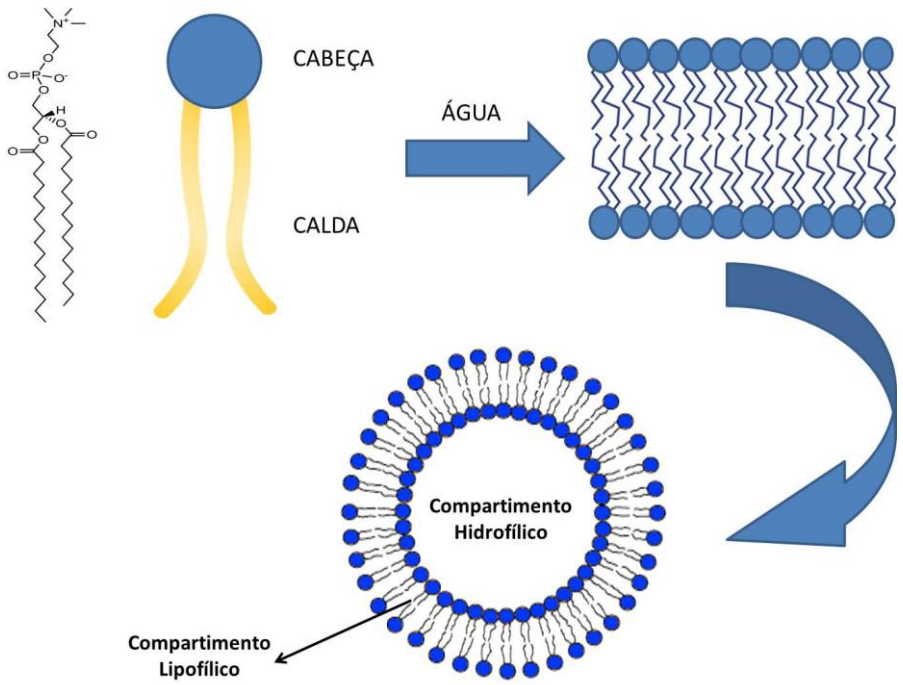


Figura 8 - No topo a esquerda uma molécula de fosfatidilcolina. Na presença de água são formadas as bicamadas de fosfolipídios, que ao formar uma vesícula, apresenta um núcleo aquoso. Substâncias lipossolúveis podem ser armazenados na fase lipídica exterior e substâncias solúveis em água na interior fase aquosa. Adaptado de (SEN e MANDAL, 2013).

Os sistemas lipossomais são caracterizados por propriedades tais como o tamanho e carga superficial das partículas, o número de lamelas (camadas) a composição lipídica e modificação da superfície (com polímeros, anticorpos) Todos estes fatores influênciam a sua estabilidade tanto em estudos *in vitro* como em estudos *in vivo* (SERCOMBE et al., 2015).

Ao incorporar fármacos fotossensibilizantes em sistemas lipossomais suas características fotofísico-quimicas sofrem alterações. Por exemplo, a incorporação de cloro-alumínio ftalocianina em nanoparticulas feitas com poli(metil vinil éter-alt-acido maleico) aumentou em 10 vezes a capacidade da ftalocianina de produzir oxigênio singleto comparada a forma livre, melhorando assim sua atividade fotodinâmica (MUEHLMANN et al., 2014).

A atividade fotodinâmica *in vitro* do alumínio ftalocianina tetrasulfonada incorporada em lipossoma (Lip-AlPcS4) e em lipossoma conjugado com a glicoproteína transferina (Tf-Lip-AlPcS4) em câncer de bexiga, foi estudado por DERYCKE et al., (2004). Eles observaram que a formulação Tf-Lip- AlPcS4 acumulou-se em maior quantidade no tecido tumoral em comparação ao tecido normal, concluindo que essa formulação pode ser um promissor sistema de liberação para AlPcS4 em células tumorais de bexiga.

A localização do fármaco fotossensibilizante no interior da célula determina a eficiência terapêutica da terapia fotodinâmica. KIM , SANTOS e PARK (2014) desenvolveram um sistema lipossomal fusogênico incorporado com a ftalocianina de zinco especifico para a membrana plasmática. Eles observaram que ao irradiar células de carcinoma de colón murinho com laser, obtiveram uma maior ruptura da membrana plasmática quando comparada com a formulação não fusogênica localizada de forma difusa no citoplasma.

1.5.2 Lipossomas Ultradeformáveis

Lipossomas podem ser classificados de acordo com os componentes de que são formados. Os LCs são formados geralmente por fosfolipídios, com ou sem a adição de colesterol. Em 1992, CEVC e BLUME (1992) introduziram os lipossomas ultradeformáveis, usualmente chamados de Transfersomas® (IDEA AG, Munique, Alemanha).

Lipossomas ultradeformáveis (UDL) são vesículas formadas por fosfolipídios e tensoativos, tais como surfactantes ou co-solventes que são capazes de enfraquecer as bicamadas lipídicas, diminuindo a tensão superficial, o que permite ao lipossoma mudar

a sua forma e, por conseguinte, levar a um aumento da deformabilidade das bicamadas que lhes permite por si só passar entre as células (ASCENSO et al., 2015) (Figura 9). Em virtude de sua natureza elástica e deformação, seu emprego como sistema de liberação transdérmica vem sendo recentemente estudado (CADDEO et al., 2015; LI et al., 2014c; RANGSIMAWONG et al., 2014; SAUVAGEOT et al., 2009; TYAGI et al., 2015).

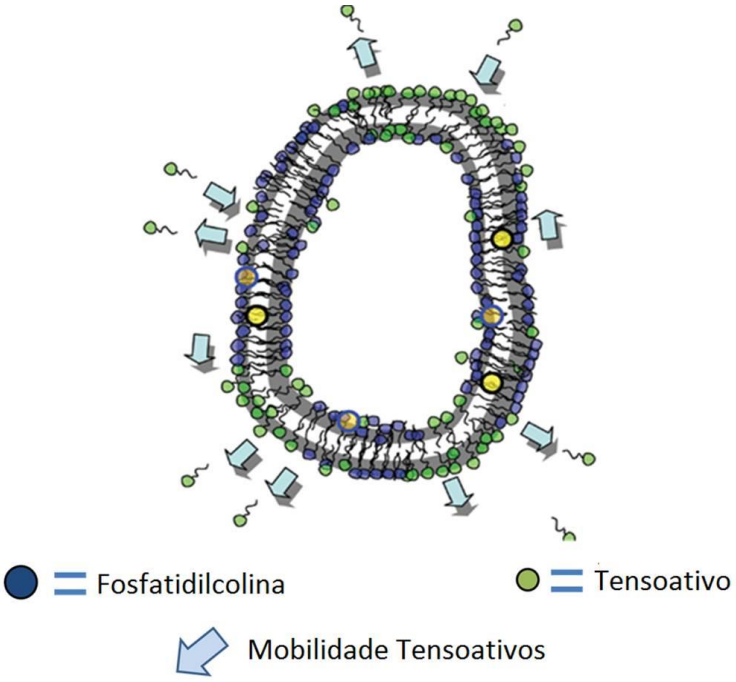


Figura 9- Esquema representativo de lipossoma ultraderfomável. Adaptado de (ROMERO e MORILLA, 2013).

A eficácia dos UDLs tanto para sistemas de liberação dérmica e transdérmica tem mostrado resultados promissores encapsulando fármacos de diversos tamanhos moleculares e lipofilicidade diferentes, como por exemplo: lidocaína, tetracaína, hidrocortisona, dexametasona, o diclofenaco, o tamoxifeno, a testosterona (DUANGJIT et al., 2012; GHARIB et al., 2015; MAESTRELLI et al., 2010; SRISUK et al., 2012).

A permeação cutânea do ácido 5-aminolevunilico incorporado em UDLs com diferentes cargas superficiais foi estudada por OH et al., (2011). Eles observaram em estudos *ex-vivo* que o ácido 5-aminolevunilico incorporado em lipossomas ultradeformáveis catiônicos mostrou-se estável e capaz de permear até as camadas mais profundas da pele tendo um maior tempo de retenção na camada epidérmica (camada responsável pela conversão do ácido 5-aminolevunilico em protoporfirina 9). Em estudos *in vivo* a permeação do ácido 5-aminolevunilico incorporado em UDLs foi aumentada em até 15 vezes em relação a sua forma livre mostrando que o ácido 5-aminolevunilico incorporado em UDLs pode ser promissor sistema de liberação para fármacos fotossensíveis para administração tópica (FANG et al., 2008).

DRAGICEVIC-CURIC et al., (2008) e DRAGICEVIC-CURIC et al., (2010) estudaram a atividade fotodinâmica de UDLs contendo o fármaco fotossensibilizador m-tetrahidroxi-fenilclorina (UDL-mTHPC) em câncer coloretal e câncer epidemoide. Em estudos in vitro foi observado uma maior atividade fotodinâmica em ambas as células cancerígenas nas formulações de UDLs contendo o mTHPC em relação a sua forma livre. Quando irradiadas com laser diiodo em 652 nm, 20 J/cm^2 e 2 µM de mTHPC a viabilidade celular foi de apenas 16%. Esses resultados são reforçados com os encontrados nos estudos *in vivo*, onde a UDL-mTHPC foi capaz de reduzir o crescimento do tumor de forma significativa em relação a sua forma livre.

A incorporação das ftalocianinas de zinco e da alumínio tetrasulfonada em UDLs, demonstrou o melhoramento de características como: aumento da permeabilidade no estrato córneo, baixa toxicidade em células não tumorais e uma maior produção de oxigênio singleto, potencializando assim sua atividade fotodinâmica (KASSAB , ABD EL FADEEL e FADEL, 2013; MONTANARI et al., 2007).

A utilização tópica de lipossomas possui várias aplicações médicas devido as suas propriedades diferenciadas que podem ser moduladas mudando a sua composição e estrutura. Além disso, os lipossomas também proporcionam uma abordagem promissora com o objetivo de aumentar a eficiência, reduzir a toxicidade e aumentar a seletividade de fármacos com aplicação tópica.

1.6 Lipoproteínas de baixa densidade (LDL)

Outro tipo de sistema de liberação de fármacos amplamente estudado são os de origem natural como as lipoproteínas de baixa densidade (LDL). A proliferação de células tumorais nos organismos vivos é um processo de divisão rápida e desordenada, o que exige grandes quantidades de colesterol para a síntese de membranas, sendo que para satisfazer sua demanda de colesterol, as células tumorais aumentam a síntese do colesterol endógeno e/ou a endocitose de LDL (SHAKEEL et al., 2015). Deste modo, muitos tipos de células tumorais expressam um número maior de receptores de LDL (rLDL) que as correspondentes células normais (DIAS et al., 2007). Tais receptores reconhecem especificamente as partículas de LDL e promovem sua internalização nas células por meio de endocitose via vesículas que são degradadas pelos lisossomos (DIAS et al., 2007). Baseado nestas informações é comum que ocorra uma maior e mais seletiva incorporação dos fármacos antitumorais quando associados à LDL (BARBUGLI et al., 2010). Isto aumentaria o efeito nas células tumorais ao passo que reduziria os efeitos tóxicos sobre as células normais. Assim, diversos pesquisadores propuseram a LDL como um sistema útil de liberação discriminatória para fármacos citotóxicos nas células tumorais, com base na maior incorporação da

LDL por estes tecidos (BARBUGLI et al., 2010; DIAS et al., 2007; MALAM , LOIZIDOU e SEIFALIAN, 2009).

Embora a LDL tenha sido um sucesso nos testes experimentais para uso como sistema de liberação de fármacos, as dificuldades no isolamento da LDL do plasma e no manuseio da preparação são desvantagens sérias para seu uso no tratamento clínico rotineiro. Além disso, devido à sua estrutura lipídica, a LDL tem uma capacidade maior de incorporar fármacos lipofílicos (ALANAZI et al., 2015). Foi relatada por Maranhão e corroboradores a síntese de uma nova família de nanopartículas biomiméticas com a porção lipídica da LDL: as nanoemulsões lipídicas sem proteína, denominadas LDE, que podem mimetizar o metabolismo de lipoproteínas plasmáticas "*in vivo*" (MARANHAO et al., 2008).

Maranhão e corroboradores mostraram em ratos e em humanos que a LDE tem um comportamento cinético plasmático semelhante aquele da LDL natural e que a emulsão é provavelmente incorporada pelos receptores B e E que promovem a internalização da LDL na célula (MARANHAO et al., 2008). A LDE é destituída de apo B, mas adquire apo E das lipoproteínas circulantes após a injeção no sangue (FEITOSA-FILHO et al., 2009). A introdução de colesterol na LDE favorece a incorporação de apo E sobre a superfície das partículas de microemulsão, deste modo facilitando o caminho endocitótico (CONTENTE et al., 2014; POZZI et al., 2015). Devido ao fato dos receptores de LDL (rLDL) também reconhecerem a apo E, a LDE é deste modo incorporada pelos tecidos vivos via caminho endocitótico mediado por receptores como a LDL natural (MATTAR et al., 2015; POZZI et al., 2015).

O complexo LDE-fármaco deve, então, apresentar um acúmulo seletivo nas células tumorais seguindo um processo endocitótico mediado por receptores, idêntico ao apresentado pela LDL natural (DIAS et al., 2007; TEIXEIRA et al., 2008).

A LDE é uma partícula homogênea, esférica e estável e de aproximadamente 400A^{o} de diâmetro (Figura 10) (TEIXEIRA et al., 2008). O colesterol esterificado se localiza no interior da partícula de forma similar à LDL natural e os fosfolipídios formam a monocamada superficial. O colesterol não esterificado se encontra localizado primeiramente na superfície destes sistemas modelo.

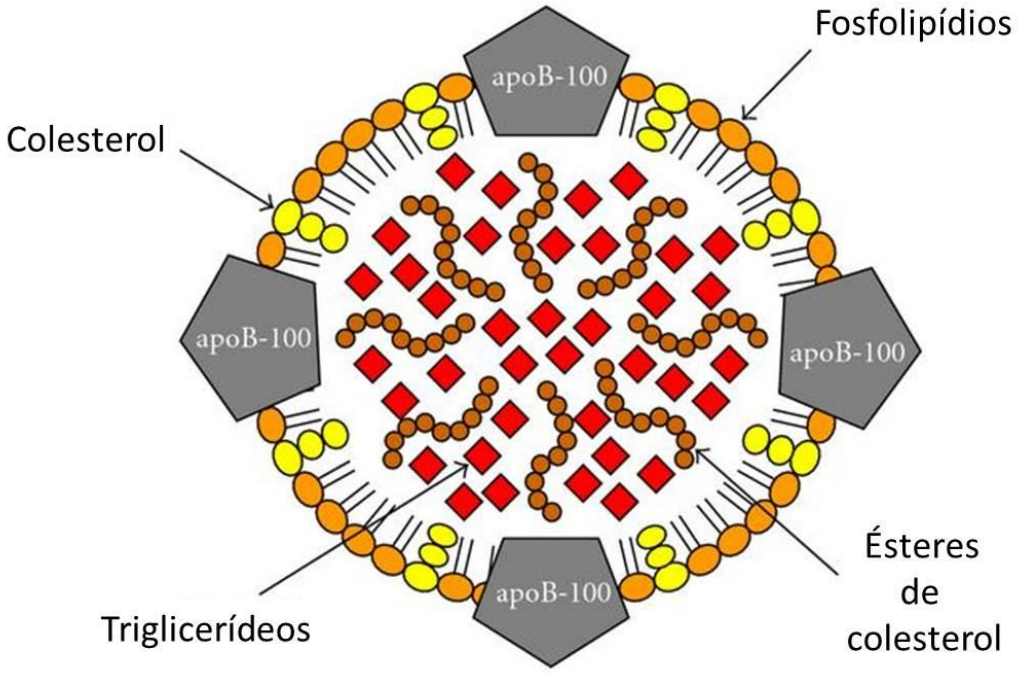


Figura 10 - Figura representativa de partícula de LDE. Adaptado de (MILIOTI et al., 2008).

Assim, como nos lipossomos, a LDE é capaz de incorporar tanto substâncias hidrofóbicas em suas cadeias hidrocarbônicas como substâncias hidrofílicas nas estruturas polares dos fosfolipídios e do colesterol. Devido ao fato de nenhum dos

componentes da LDE ser imunológico e a emulsão ser meramente um análogo estrutural de uma lipoproteína existente no plasma sanguíneo, é improvável que sua administração sistêmica possa causar qualquer dano aos organismos vivos.

2. Objetivos Gerais

O presente trabalho propõe-se a preparação de sistemas de liberação contendo a cloro alumínio ftalocianina (PcAlCl) como ativo para uso na Terapia Fotodinâmica. Propõem-se avaliar as propriedades fotoquímicas e fotofísicas no estado estacionário destes sistemas bem como os estudos citotóxicos utilizando a linhagem celular de glioblastoma (U87MG) e a linhagem de melanoma (B16F10) como modelos biológicos.

2.1 Objetivos específicos

Preparar e caracterizar nanoemulsão rica em colesterol (LDE) contendo a cloro alumínio ftalocianina (PcAlCl) comparando com a PcAlCl incorporada em lipossoma convencional como modelo de sistema de liberação convencional.

Preparar e caracterizar lipossomas ultradeformáveis contendo a cloro alumínio ftalocianina (PcAlCl) comparando com a PcAlCl incorporada em lipossoma convencional como modelo de sistema de liberação clássico.

Avaliar a influência dos tensoativos Tween 80, Span 80 e Desoxicolato de sódio na estabilidade e nas características fotofísicas e fotoquímicas da PcAlCl quando incorporada em lipossomas ultradeformáveis.

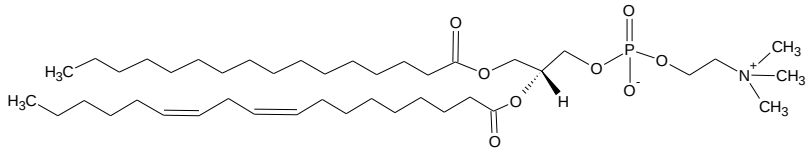
Avaliar a atividade fotodinâmica dos sistemas LDE e Lipossoma ultradeformaveis em células de glioblastoma (U87MG) e melanoma (B16F10) comparando com a PcAlCl em sua forma livre e incorporada em lipossoma convencional como modelo de sistema de liberação clássico.

3. Parte Experimental

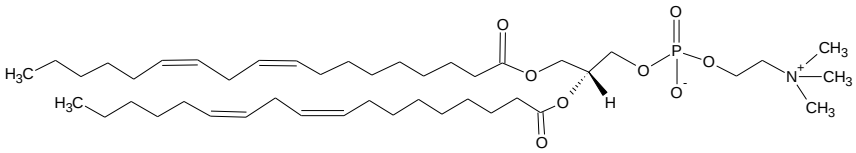
3.1 Materiais

Todas as soluções aquosas foram preparadas com água ultra pura, obtida por meio de filtragem por osmose reversa em um sistemas Direct-Q® 3 da Millipore, com filtragem final em membrana de 0,2 μm de diâmetro e resistividade de 18,2 mΩ.

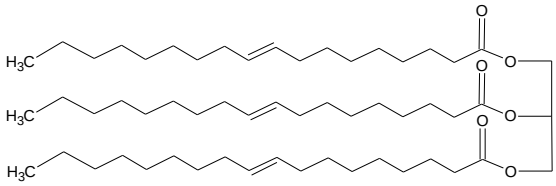
Os materiais comerciais: L-α-fosfatidilcolina de ovo (99%), Trioleína (99%), oleato de colesterol (>98%), colesterol (99%), Span 80 (99%) , Desoxicolato de sódio (>97%) e o fármaco cloro alumínio ftalocianina (85%) foram obtidas da empresa Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri – EUA). Fosfatidilcolina de girassol (Lipoid S100, >96%) foi obtido da empresa Lipoid GmbH (Ludwigshafen, Alemanha). Tween 80 (>98%) foi obtido da empresa ACROS Organics™ (Geel, Belgica). Todos os reagentes foram utilizados sem tratamento ou processo de purificação prévio. As estruturas moleculares dos reagentes são mostradas na Figura 11.



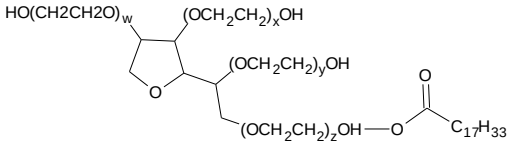
Fosfatidilcolina de ovo



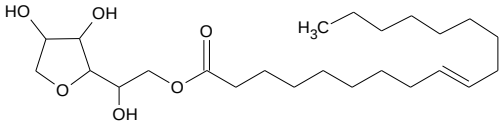
Fosfatidilcolina de girassol



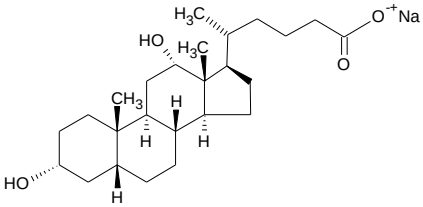
Trioleína



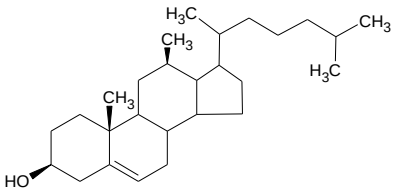
Tween 80 (x+y+w+z=20)



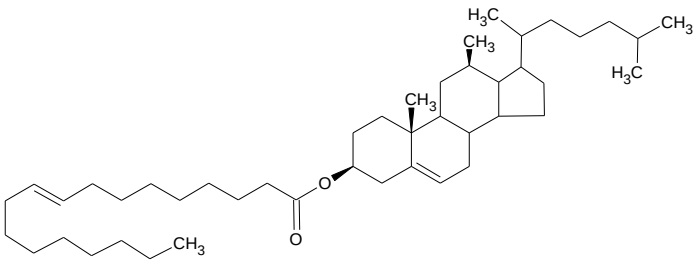
Span 80



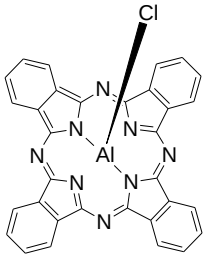
Desoxicolato de sódio



Colesterol



Oleato de colesterol



Ftalocianina de cloro-alumínio

Figura 11 - Estrutura química dos surfactantes e dos lipídios utilizados no preparo das formulações de nanoemulsão LDE e dos lipossomas convencionais e ultradeformáveis.

Além destes materiais foram utilizados diferentes solventes orgânicos bem como outros sais inorgânicos de alta pureza sem tratamento prévio.

As soluções de tampão fosfato salino (pH 7,4 – 0,1 mol.L^{-1}) utilizadas nas preparações do LDE e nos demais experimentos, foram preparadas diluindo 0,8 g de NaCl, 0,02 g de KCl, 0,27 g de $Na_2HPO_4.7\ H_2O$ e 0,02 de $Na_2H_2PO_4.H_2O$ em água ultrapura.

A solução de tampão Tris-HCl (pH 7,4 - 0,1 mol.L^{-1}) utilizada nas preparações dos lipossomas ultradeformáveis, foi preparada diluindo 7,45 g de KCl e 1,21 g de Tris (hidroximetil)aminometano em água ultrapura.

Os estudos envolvendo cultura de células foram realizados com a linhagem neoplásica glioblastoma (U87MG) (American Type Culture Colletion, (ATCC® HTB-14™) e de melanoma (B16F10) (ATCC® CRL-6475™).

O meio de cultura Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) foi utilizado no crescimento e manutenção das culturas de células gliomas (U87MG) e de melanoma (B16F10). O meio foi preparado pela dissolução do meio na forma de pó em 1,0 L de água ultrapura, seguido de filtração em membrana de 0,22 µm. O meio de cultura foi suplementado com 10% de solução de soro bovino fetal (Gibco BRL), 1% de Estreptomicina/Eritromicina (Invitrogen) e 0,5% de anfotericina B (Gibco BRL).

3.2 Aparelhagem

Nos estudos espectrofotométricos foram utilizados o espectrofotômetro de absorção da Hewlet Packard (modelo 8452A, Agilent, Califórnia – EUA) e o espectrofluorímetro Fluorolog® (modelo Fluorolog -3, HORIBA Scientific, Califórnia – EUA).

O processo de centrifugação foi realizado na ultracentrifuga Beckman Coulter® (modelo Optima L-90K, Beckman Instruments – Inc, Califórnia – EUA) a uma temperatura de 4ºC e a 195.000 *g*.

O tamanho das partículas obtidas foi determinado por meio de medidas de espalhamento de luz utilizando-se o equipamento Zetasizer Nano-ZS da Malvern Instruments® (modelo ZEN 3600, Malvern Instruments Ltd, Worcestershire – Reino Unido). Os dados foram tratados pelo Zetasizer Software® 7.11 (Malvern Instruments Ltd, Worcestershire – Reino Unido)

O estudo de estabilidade acelerada foi determinado no analisador de tempo de prateleira "*shelf life*" da empresa LUMGmbH® (modelo LumiSizer 612, LUM GmbH, Berlin, Alemanha). Os dados foram analisados com o software SEPView® 5.0.

O estudo da fluorescência resolvida no tempo foi determinado no sistema de tempo de vida de fluorescência da empresa OBB Corporation® (modelo EasyLife X™, Nova Jersey – EUA) com uma janela de tempo de 150 ps a 3 µs, utilizando LED de 630 nm como fonte de excitação. Os dados foram tratados com o software fornecido pelo fabricante.

Além destes equipamentos foram utilizados: balança eletrônica Denver Instruments Company (modelo A-200DS, Nova York – EUA), banho ultrassônico da empresa Branson (modelo 2210, Connecticut - EUA), pH-metro Qualxtron (modelo QX1500 Plus, São Paulo - Brasil).

Os trabalhos rotineiros com culturas celulares foram realizados em capelas de fluxo laminar da empresa Pachane (modelo Pa410 Eco, São Paulo - Brasil), esterilizadas com luz germicida e fluxo contínuo de ar. Também utilizamos os seguintes aparelhos nos estudos de cultura e crescimento celular: sistema Elisa de absorção da

Tecan® (modelo Safire^2, Männedorf - Suiça), microscópio invertido Olympus (modelo CK2, Massachusetts – EUA) para análise de forma, tamanho e crescimento de cultura celular) e banhos termostatizáveis Fisher Scientific (modelo 801, Massachusetts – EUA).

A determinação do rendimento quântico de oxigênio singleto pelo consumo do oxigênio molecular em solução foi realizado com o auxílio do Dissolved Oxygen Meter, Modelo inO_2 (Inovative Instruments, Inc., Tampa-USA) e como fonte de excitação o Laser diiodo moledo COLIBRI (Quantum Tech, São Carlos – SP, Brasil).

3.3 Métodos

3.3.1 Preparação da nanoemulsão de LDE

O preparo da nanoemulsão lipídica teve como base a técnica descrita por DIAS et al. (2007). A nanoemulsão foi preparada a partir da mistura de 40 mg de fosfatidilcolina de ovo, 20 mg de oleato de colesterol, 1 mg de trioleína e 0,5 mg de colesterol livre, dissolvidos em clorofórmio-etanol (2:1 v/v). A mistura foi seca em atmosfera modificada de nitrogênio em um dessecador a vácuo, por 16 horas a 4ºC. Os lipídios secos foram suspensos em 10 mL de tampão fosfato salino em pH 7,0. Em seguida, a mistura de lipídios foi agitada a 56ºC por 1 hora em um tubo Falcon de 50 mL, seguido de emulsificação por ultrassom (70 W output) por 1 hora sob atmosfera modificada de N_2. Ao termino, os lipídios emulsificados foram transferidos para tubos limpos então centrifugados a 195.000 *g* por 2 horas e 30 minutos a 4ºC em gradiente de densidade formado por: Optiprep®, Optiprep® 40% em PBS (Tampão fosfato salino, pH 7,4, 0,1 mol.L^{-1}) e somente PBS. A segunda fração localizada na parte superior do tubo, correspondendo a 20-30% do liquido do tubo total, foi coletada por aspiração após atingir a temperatura ambiente (23ºC). A fração de LDE foi esterilizada por meio de

filtragem em filtros com poros de 0,22 µm e estocada em frascos estéreis a 4ºC por até 30 dias.

3.3.2 Preparação da nanoemulsão de LDE contendo PcAlCl

Para a incorporação da PcAlCl, o volume de ftalocianina dissolvida em etanol utilizada foi de 10% do volume de LDE, obtendo uma concentração final de 10 µmol.L^{-1}. A formulação foi agitada por 6 horas em um agitador magnético (Corning Modelo: Stirrer/Hotplate a velocidade de 900 rpm em banho de aquecimento a 57ºC. Em seguida a temperatura foi reduzida para 37ºC e então agitada por mais 2 horas. Ao final a solução foi esterilizada por meio de filtração utilizando-se filtros com poros de 0,22 µm e estocada em frascos estéreis a 4ºC por até 30 dias.

3.3.3 Preparação do lipossoma convencional e dos lipossomas ultradeformáveis

Lipossomas convencionais (CL) e lipossomas ultradeformáveis (UDL) foram preparados a partir da metodologia adaptada de ALOMRANI et al. (2014). Os lipossomas foram preparados utilizando uma razão de 6:1 (w/w) de lipídio para colesterol ou surfactantes e foram preparados utilizando a técnica de hidratação de filme (ZHANG et al., 2015). Uma quantidade de 200 mg de fosfatidilcolina de girassol e 30 mg de colesterol (para o lipossoma convencional) ou 30 mg dos surfactantes (para o lipossoma ultraderfomável) foram dissolvidos em uma mistura de clorofórmio:metanol (2:1, v/v) em um balão de fundo redondo de 250 mL. Em seguida, a solução foi rotaevaporada a 40ºC até a completa eliminação do solvente. O filme lipídico formado foi seco sob fluxo de N_2 para a remoção residual dos solventes e hidratado com 5 mL de tampão Tris-HCl (0,01 mol.L^{-1}) pH 7,4 afim de se obter uma concentração de 43 mg

de lipídio/mL. A suspensão resultante passou por emulsificação no disruptor celular Vibracell modelo VC700 (SONICS®, Newton, USA) utilizando uma ponta de titânio com amplitude de sinal de 40% por 2 minutos em banho de gelo. Após esse processo a solução resultante foi filtrada, em fluxo laminar pelo processo de extrusão em membrana 0,200 µm (15x) e 0,100 µm (15x) a uma temperatura de 57ºC. A formulação de lipossomas unilamelares foi armazenada a 4ºC até a sua utilização.

3.3.4 Preparação do lipossoma convencional e dos lipossomas ultradeformáveis contendo PcAlCl

As formulações de lipossomas convencionais (CLPc) e dos lipossomas ultradeformáveis (UDLPcs) contendo ftalocianina de cloro-alumínio seguiram a mesma metodologia do item **3.3.3**, com exceção de que a PcAlCl foi solubilizada juntamente com a solução orgânica de lipídios numa concentração final de 0,1 $mg.mL^{-1}$.

3.3.5 Determinação do tamanho de partículas e de potencial zeta das formulações

O diâmetro médio das partículas coloidais e a distribuição do tamanho (índice de polidispersão – PDI) foram determinados pela análise por espalhamento de luz dinâmico usando um Zetasizer® (modelo ZEN 3600, Malvern Instruments Ltd, Worcestershire – Reino Unido). As análises foram realizadas em ângulo de varredura de 173º e após a diluição de 10 µL das formulações em 2 mL de água ultrapura. Já o potencial zeta foi determinado pela mobilidade eletroforética das amostras coloidais utilizando também o mesmo aparelho (Zetasizer®). Para a manutenção da dupla

camada elétrica na interface da partícula com o líquido, a condutividade mínima para as análises foi de 0,2 mS/cm. Todas as determinações foram feitas em triplicata a 25ºC.

3.3.6 Monitoramento da estabilidade acelerada das formulações

Os estudos de estabilidade acelerada foram conduzidos no analisador de tempo de prateleira Lumisizer® (modelo LumiSizer 612, LUM GmbH, Berlin, Alemanha). Os dados foram obtidos por meio de um sistema óptico que trabalha na região do infravermelho próximo (NIR) acoplado a um sistema de centrifuga que registra um perfil de transmissão por cada ponto entre o topo e o fundo do recipiente de análise. A migração das partículas da superfície para o fundo do recipiente resulta em diferenças entre esses perfis de transmissão no decorrer do tempo em que a amostra foi submetida à centrifugação. Isso permite analisar parâmetros como: perfil de transmissão, velocidade de sedimentação e a velocidade de clarificação que juntas permitem avaliar a estabilidade das formulações.

Para esse procedimento foi seguida a metodologia adaptada de (CHIU et al., 2012). Amostras de 0,4 mL das formulações de LDE, lipossoma convencional e ultradeformáveis foram colocados em cubetas adequadas para o tipo de amostra com posição radial máxima de 129,5 mm. Em seguida, foram centrifugadas a 3500 rpm (1780xg) por um período de 7 horas a uma temperatura constante de 25ºC. A cada 50 segundos um perfil de transmissão foi obtido no comprimento de onda de 880 nm. Esses parâmetros permitem uma previsão da estabilidade das formulações correspondente a 17 meses. Os resultados obtidos foram analisados no software SEPView V.5.1 (LUMGmbH, Berlin, Alemanha).

Para o cálculo dos parâmetros para tempo de *shelf life*, utilizou-se a Equação 1:

$$Shelf\ \ life_{(segundos)} = \left(Tm_{requerido} x RCF\right)$$ **Equação 1**

Onde, $Tm_{requerido}$ é o tempo de duração do experimento em segundos e RCF é a força centrifuga relativa (valor tabelado de acordo com a Lei de Stokes presente no manual do equipamento).

3.3.7 Monitoramento da estabilidade físico-química em função do tempo

Todas as formulações obtidas (n=4) foram armazenadas e a estabilidade física destas formulações foi avaliada com relação ao tamanho de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta. As formulações foram acondicionadas em ependorffs de 1,5 mL protegidas da luz e armazenadas em geladeira a 4ºC durante um período de 180 dias. A estabilidade da PcAlCl nas formulações foi avaliada por espectroscopia de absorção na faixa de leitura de 300 nm a 800 nm por um período de 30 dias.

3.3.8 Determinação da deformidade das partículas

Os ensaios de deformidade foram executados em extrusor com regulação térmica de 10 mL (LIPEX™, Northern Lipids Inc, Burnaby, Canada). Para essas análises, 2,0 mL das formulações passaram por extrusão em membra de policarbonato de 50 nm com pressão externa de 0,8 MPa por 5 min a uma temperatura de 37ºC. A deformidade dos lipossomas (D) foi calculada por:

$$D = J_{Fluxo}\left(\frac{r_v}{r_p}\right)^2$$ **Equação 2**

Onde J_{fluxo} é o peso da formulação que permeou a membrana em 5 minutos, r_v é o tamanho das partículas da formulação após a extrusão e r_p é o tamanho do poro da membrana.

3.3.9 Determinação dos espectros de absorção e fluorescência da PcAlCl nas formulações

As análises espectrofotométricas foram realizadas em uma cubeta de quartzo de 10 mm de caminho óptico, e os espectros foram obtidos com 2 nm de abertura do feixe e velocidade de 960 $nm.min^{-1}$. As absorbâncias foram medidas na faixa espectral variando de 300 a 800 nm. O espectrofluorimétrico foi ajustado com aberturas de emissão e excitação em 5 e 10 nm, respectivamente. A emissão de fluorescência foi analisada entre 630 nm - 750 nm, com a excitação fixa em 615 nm.

3.3.10 Quantificação da PcAlCl nas formulações

Inicialmente, para determinar o conteúdo total do fármaco, uma alíquota de 2 mL da formulação CLPc, UDLPcs e LDEPc foi analisada. A fração de PcAlCl não encapsulada na formulação foi determinada por meio da separação da fase aquosa das formulações usando um procedimento de ultrafiltração (Microcon Ultracel YM-100, Milipore, Irlanda) a 12.857x*g* por 1 hora a 4ºC. Em seguida, o ultrafiltrado foi analisado por espectrofluorimetria no equipamento Fluorolog® (modelo Fluorolog -3, HORIBA Scientific, Califórnia – EUA), na faixa de 650 nm a 750 nm com excitação em 614nm.

A quantidade de PcAlCl encapsulada foi estimada pela diferença entre o conteúdo total do fármaco e a concentração de sua forma livre, de acordo com a

Equação 3. Todas as análises foram realizadas em triplicata e as médias dos resultados ± desvio padrão (DP) foram apresentadas.

3.3.11 Determinação da eficiência de encapsulação de PcAlCl nas formulações

A quantificação do conteúdo total e a eficiência de encapsulação de PcAlCl em CLPcs, UDLPcs e LDEPc foram determinados utilizando a equação de regressão linear em etanol obtida pela análise das medidas espectrofotométricas descritas e padronizadas por (SIQUEIRA-MOURA et al., 2010) entre a relação da absorção máxima e a concentração de PcAlCl. A Equação (3) foi utilizada para calcular a eficiência de encapsulação:

$$\%Encapsulação = \frac{TPc - LPc}{TPct} x100 \qquad \textbf{Equação 3}$$

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

3.3.7.2 Determinação do rendimento quântico de fluorescência (Φ_F)

Uma solução de Ftalocianina de zinco (PcZn) em etanol foi preparada inicialmente, de modo a se obter uma absorbância constante na faixa de 0,04 que foi utilizada como padrão. As soluções contendo o fármaco fotossensibilizante PcAlCl em etanol e suspensões de CLPcs, UDLPcs e LDEPc foram preparadas por diluições para

se obter absorbâncias da ordem de 0,04, evitando assim que o efeito de filtro interno interfira no resultado.

Os rendimentos quânticos de fluorescência (Φ_F) foram obtidos por meio do cálculo da área do espectro de emissão de fluorescência corrigido da solução de PcZn, que foi usada como solução padrão (Φ_F = 0,28, λ_{ex} = 614 nm), na faixa de 650 nm – 800 nm (DE PAULA et al., 2013).

Assim, foram obtidos os valores de Φ_F , registrando-se os espectros de absorção do padrão (PcZn em etanol), bem como os espectros de emissão de fluorescência corrigido, tanto para o padrão como das soluções preparadas nos meios considerados, utilizando-se o método relativo. Este método relaciona o rendimento quântico de fluorescência de cada composto com o rendimento quântico de fluorescência do padrão, de acordo com o formalismo descrito por CEYLAN et al., (2015).

$$\phi_{\mathrm{F}} = \left(\frac{A_x}{A_{(p)}}\right).\left(\frac{DO_{(p)}}{DO_x}\right).\left(\frac{n^2{}_{(p)}}{n^2{}_{(x)}}\right).\phi_{\mathrm{F}_{(p)}} \qquad \textbf{Equação 4}$$

Onde os subscritos *x* e *p* são referentes à amostra e ao padrão, respectivamente, *A* é a área do espectro de emissão de fluorescência corrigido, *DO* é a densidade óptica no comprimento de onda de excitação de 614 nm, *n* é o índice de refração do meio e Φ_F é o rendimento quântico de fluorescência.

3.3.13 Medidas de fluorescência resolvida no tempo: determinação do tempo de vida singleto-singleto (τ_F)

Os tempos de vida de fluorescência da PcAlCl em meio orgânico (etanol), LDE e Lipossomais foram obtidas usando o equipamento EasyLife X^{tm}. Em cada cubeta de quartzo de 1 cm, foram adicionadas alíquotas 2,0 mL das formulações de estudo contendo a PcAlCl. As medidas foram realizadas utilizando-se como fonte de excitação LEDs no comprimento de onda de 630 nm. As curvas de decaimento de fluorescência foram analisadas utilizando o software operacional do próprio instrumento. Os ajustes foram validados por meio do valor mínimo na função chi-quadrado (χ^2).

3.3.14 Determinação indireta do rendimento quântico de produção do oxigênio singleto (Φ_Δ)

Na determinação do rendimento quântico de produção de oxigênio singleto ($^1O_2$) produzido pelas formulações contendo a PcAlCl, foi utilizada a técnica indireta de consumo de oxigênio adaptada de MARCHISIO et al., (2015) e WANG et al., (2015) utilizando o composto álcool furfurílico (AFF) como sonda e um sistema eletrônico de análise de oxigênio dissolvido em solução.

O AFF é um composto amplamente estudado como sonda especifica para o oxigênio singleto. Além de não interferir nos estados fundamentais e excitados do fármaco fotossensibilizante, o AFF possui absorção máxima em 215 nm, estas características permitem que não haja interferência na excitação do fármaco fotossensibilizante em comprimentos de onda acima de 230 nm.

A reação de oxidação do AFF pelo $^1O_2$ leva a formação de uma mistura de compostos oxidados, onde sua natureza e rendimento variam com solvente do meio reacional (Figura 12). Contudo, essa característica não interfere na capacidade da técnica de monitorar a produção do $^1O_2$, pois essa técnica não avalia o aparecimento dos produtos da oxidação e nem o consumo de AFF.

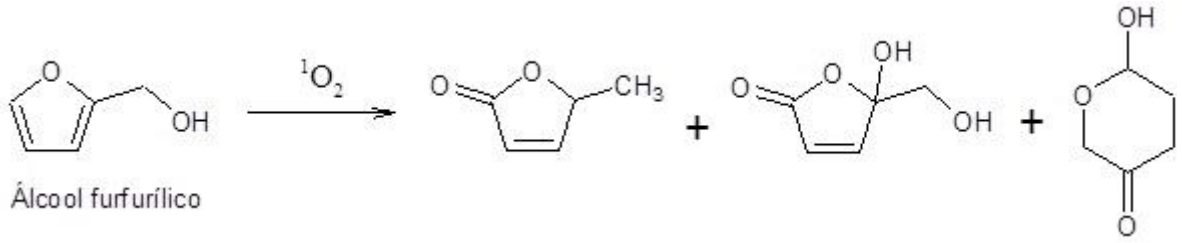


Figura 12 - Produtos da reação do álcool furfurílico com oxigênio singleto.

Essa sonda, em contato com oxigênio singleto sofre reações de oxidação irreversíveis em sua estrutura. Com isso, a diminuição da concentração de oxigênio na solução é diretamente proporcional à produção do $^1O_2$ pelas formulações contendo a PcAlCl.

Para determinação da produção de oxigênio singleto pelas formulações, amostras das formulações foram diluídas numa solução de álcool furfurílico (50 mmol.L^{-1}) para se obter absorbâncias da ordem de 0,30. Essas medidas visam evitar a influência do efeito de filtro interno no resultado e colocadas em celas de quartzo de quatro faces de 10 mm de caminho óptico. Em seguida o sensor de oxigênio (Modelo inO_2, Inovative Instruments, Inc, Tampa, EUA) foi imerso a uma profundidade de 0,5 cm e então a cela foi irradiada em um comprimento de onda de 660 nm, utilizando-se o laser de diodo marca Colibri da Quantum tech, em intervalos de 5

segundos sob agitação magnética. Como padrão foi utilizado o azul de metileno em água (Φ_{Δ} = 0,50).

O rendimento quântico de produção do $^1O_2$ foi determinado por meio da Equação 5.

$$\phi_{\Delta} = \left(\frac{k_x}{k_{(p)}}\right).\left(\frac{I_{(p)}}{I_{(x)}}\right).\phi_{\Delta_{(p)}} \qquad \text{Equação 5}$$

Onde os subscritos *x* e *p* são referentes à amostra e ao padrão, respectivamente, *k* é a constate de reação do AFF e o $^1O_2$, I é a intensidade de luz absorvida pelo padrão e pela amostra respectivamente. Φ_{Δ} é o rendimento quântico de produção de oxigênio singleto.

Os valores de *K* foram determinados por meio do *slope* da curva de regressão linear do consumo de oxigênio em função do tempo de irradiação.

A intensidade de luz absorvida (*I*) pelo fármaco fotossensibilizante em solução no comprimento de onda de excitação (660 nm) é dado pela Equação 6:

$$I = 1 - 10^{-abs_{(\lambda ex)}} \qquad \text{Equação 6}$$

3.3.15 Crescimento e manutenção da cultura de células neoplásicas

As matrizes de células U87MG e B16F10 (0,5 x 10^6 células.mL^{-1}) estocadas em nitrogênio líquido foram descongeladas a 37°C e adicionadas em garrafas de cultura (Corning Incorporated, estéril, 150 cm^3) contendo 20,0 mL de meio completo (meio de cultura DMEM enriquecido com 10% de solução de soro bovino fetal, 1% estreptomicina/eritromicina e 0,5% de anfotericina). As garrafas de cultura foram colocadas em uma incubadora a 37°C com 5,0 % de CO_2 durante 48 horas.

Após este período, realizou-se a primeira repicagem de células. Como ambas as culturas celulares crescem aderidas nas garrafas de cultura, foi necessária a utilização de uma solução de tripsina 0,5% para soltá-las, sendo necessário o contato com esta solução por aproximadamente 180 segundos. Após esta etapa, o meio contendo as células foi adicionado em um tubo Falcon e centrifugado a 25°C com rotação constante de 1800 rpm durante 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet resuspenso com 10,0 mL de meio completo, as células, então, foram distribuídas em duas garrafas de cultura de 150 cm^3.

A troca de meio destas células foi realizada sempre que necessário (em média a cada 2 dias). Quando o número médio de células atingia 1,5 x 10^6 células.mL^{-1}, ou preparava-se uma nova subcultura de células (0,5 x 10^6 células.mL^{-1}) ou congelava-se as mesmas com base no protocolo modificado descrito por HUEBINGER et al., (2016).

No processo de congelamento as células foram lavadas com o meio DMEM posteriormente congeladas em tubos criogênicos contendo uma solução composta de 90% de soro bovino fetal e 10% de DMSO.

3.3.16 Controle da integridade da membrana celular

Quando se trabalha com cultura de células costuma-se analisar a integridade da membrana celular e o controle da mesma. Este controle é feito tanto para avaliar o número médio de células presente na cultura como, também, para avaliar o número de células com rompimento de membrana plasmática. Para tal utiliza-se o teste de exclusão do azul de Tripan.

Assim, com base no número total de células contadas tem-se uma amostragem estatística de toda a cultura celular. Este teste é aplicado rotineiramente para controle do crescimento e sanidade das culturas celulares.

O azul de tripan é uma molécula colorida de grande peso molecular que só é capaz de entrar em células que tenham a membrana alterada ou rompida. Portanto, a célula viva em perfeito estado pode ser observada incolor ao microscópio, enquanto que uma célula morta terá a coloração azul. Deste modo, pode-se determinar o número de células viáveis por meio da câmara de Neubauer.

Sendo assim, em um tubo de 1,5 mL foram colocados, 100 μL de solução de azul de tripan (0,4% m/v) e 100 μL da suspensão de células. A mistura foi agitada, e após dois minutos com a ajuda da câmara de Newbauer, e então, fez-se a contagem das células.

3.3.17 Determinação da atividade mitocondrial (MTT)

Outro método utilizado para avaliar a atividade mitocondrial foi o método do uso do corante (3[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-brometodifeniltetrazolium) ou MTT. Este ensaio é apropriado para se determinar espectrofotometricamente o número total de células como função da atividade mitocondrial intacta, ou seja, células vivas.

O método do MTT é simples, confiável e reprodutível. Soluções de MTT dissolvidas em meio de cultura ou em soluções salinas, balanceadas na ausência de indicador vermelho de fenol, são de cor amarelada. A dehidrogenase mitocondrial das células viáveis atua sobre o anel tetrazolium, produzindo cristais de formazam de cor púrpura, os quais são insolúveis em solução aquosa (Figura 13). Os cristais são então

dissolvidos em isopropanol. O produto obtido é monitorado espectrofotometricamente. 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 et al., 1991).

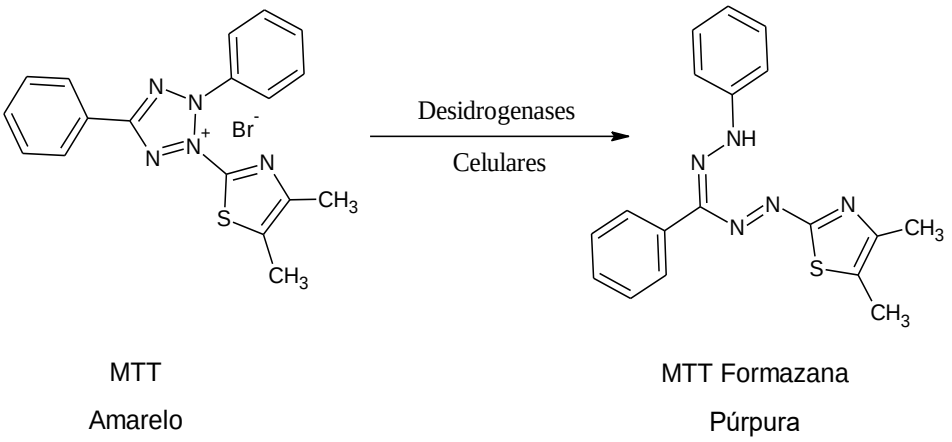


Figura 13 - Reação de metabolização do MTT para a formação da formazan pelas células viáveis.

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 às células na sua fase logarítmica de crescimento e o número final de células não deve exceder 1,0 x 10^6 células.mL^{-1}. Cada teste deve incluir um branco contendo meio completo sem nenhum fármaco.

Inicialmente, as células foram removidas da incubadora, sendo levadas à capela de fluxo laminar (modelo Pa410 Eco, São Paulo - Brasil) e distribuídas nas placas de poços múltiplos (96 poços). A estas células foi adicionada uma solução de MTT 1,0 mg/mL. A cultura foi conduzida à incubadora por 4 horas. Após o período de incubação,

as células foram removidas da estufa de CO_2 e os cristais de formazan resultantes foram dissolvidos pela adição de isopropanol.

O teste foi finalizado por meio de medidas espectrofotométricas da absorbância no comprimento de onda de 570 nm, descontando-se a absorbância de fundo a 690 nm. Estas medidas foram obtidas por um sistema de leitura de microplacas (ELISA) da Tecan® (modelo Safire²). Os valores de absorbância obtidos foram transformados em porcentagem de atividade mitocondrial em relação ao controle por meio da Equação 7:

$$Viabilidade(\%) = \left(\frac{Abs_{(tratamento)}}{Abs_{(controle)}} \right) x100 \qquad \text{Equação 7}$$

Onde, Abs é a absorção dos cristais de formazan nos grupos experimentais e no grupo controle.

3.3.18 Estudos de citotoxicidade na ausência de luz

Uma suspensão de 1 x 10^4 células/poço da linhagem de gliomas (U87MG) ou de melanoma (B16F10) foi transferida para placas de 96 poços com 200 µL por poço de meio completo. Depois de 24 horas o meio foi retirado, as células foram lavadas com 200 µL de tampão salino de PBS (pH 7,4) e logo em seguida à retirada do tampão foram incubadas com diferentes concentrações de PcAlCl, CLPc e UDLPcs. Depois de 3 horas de incubação, com ausência total de luz, retirou-se os fármacos, lavou-se os poços novamente com 200 µL de PBS, adicionou-se meio DMEM completo e deixou-se por 24 horas. Após este período, foram adicionados 30 µL da solução de MTT em PBS (5 $mg.mL^{-1}$). As células foram incubadas por mais 4 horas a 37ºC e então, o MTT não

transformado foi retirado e 200 µL de isopropanol foram acrescentados para completa solubilização do formazan.

3.3.19 Estudos de fototoxicidade

Os ensaios foram divididos primeiramente em: Controle (grupo sem qualquer tratamento), Laser (grupo submetido apenas à irradiação), TFD (grupo incubado com o fármaco fotossensibilizante encapsulado ou não, e posteriormente submetido à irradiação). Para os experimentos de fototoxicidade, as culturas de U87MG e B16F10 foram preparadas seguindo a mesma metodologia descrita para o teste de citotoxicidade no escuro. Na sequência ao período de incubação com o fármaco fotossensibilizante encapsulado ou não, os poços foram lavados duas vezes com PBS, seguido da adição de 300 µL de DMEM sem fenol em cada poço para então serem submetidos à irradiação de modo continuo em ambiente escuro em fluxo laminar, com Laser diodo Quatum Tech (modelo Eagle, São Paulo - Brasil) num comprimento de onda 660 nm, potência de 25 mW em diferentes fluências de energia (0,1 J/cm^2 – 1,0 J/cm^2) em temperatura ambiente. Após a irradiação, o meio DMEM sem fenol foi retirado e as células foram reincubadas com 500 µL de DMEM completo a 37ºC em atmosfera umidificada contendo 5% de CO_2. Após 24 horas de incubação a citotoxicidade foi avaliada por meio do método colorimétrico MTT. Foram realizados três ensaios independentes em triplicata.

3.3.20 Determinação do mecanismo de morte celular

O Reagente Guava Nexin® (Merck Millipore, Billerica, MA, EUA), que consiste numa mistura de anexina V-PE e 7-AAD foi utilizado para diferenciar os processos de morte celular a partir de eventos em necrose e apoptose induzida por TFD (FRANCHI et al., 2015). A fluência de energia escolhida para esse ensaio foi a de 0,5 J/cm^2, por se tratar de uma fluência intermediária que ainda possui um número mínimo necessário de células viáveis após o tratamento com a TFD.

A linhagem celular U87MG foi contada e $3x10^4$ células/poço foram distribuídas em placas de 24 poços e cultivadas durante 24 horas. Em seguida, as células foram incubadas durante 3 horas com as formulações na concentração de 1 $\mu mol.L^{-1}$. Após este período, o sobrenadante foi descartado e os poços lavados duas vezes com PBS para remover a formulação não absorvida. Em seguida, 300 µL de DMEM isento de fenol foi adicionado em cada poço. Logo após, as placas foram irradiadas com 0,5 J/cm^2, na excitação em 660 nm. Ao termino, as células foram lavadas duas vezes com PBS e incubadas em meio de cultura fresco durante 24 horas para detectar a indução de morte celular após a TFD. Finalmente, o sobrenadante e as células tripsinizadas foram recolhidos por centrifugação (106 RCF; 4ºC) e re-suspensas em 100 µL de meio de cultura completo e misturou-se em 100 µL de reagente Guava Nexin®. A mistura de células foi incubada durante 20 min no escuro para a incorporação do reagente. Em seguida as amostras foram analisadas por citometria de fluxo. Houve registros para cada amostra de 5.000 eventos e os dados foram analisados utilizando o Guava CytoSoft 4.2.1 - módulo nexina (Guava Technologies, Hayward, CA, EUA). Três experimentos independentes foram realizados onde cada condição foi executada em duplicata.

3.3.21 Análises Estatísticas

Os dados experimentais obtidos foram analisados no software GraphPad versão 5.0 (GraphPad Software, Inc., LaJolla, CA, USA). As diferenças entre os grupos controle e tratados foram analisados pelo teste de variância (ANOVA) seguida de teste de Tukey para a comparação múltipla, onde foram considerados valores significativos para $p<0,05$.

4. Resultados e Discussão

4.1 Preparo e caracterização físico-química das formulações

4.1.1 Determinação do tamanho e potencial zeta das partículas das formulações

A maneira que um fármaco interage com o microambiente proporcionado pelos adjuvantes de uma formulação, são aspectos fundamentais para a tecnologia farmacêutica. Uma vez que um fármaco é incorporado a um sistema de liberação, apresenta propriedades diferentes daquela da forma livre, tais como: solubilidade, distribuição e biodisponibilidade no organismo refletindo no seu efeito terapêutico. As principais características dos sistemas de liberação que afetam essas propriedades são o tamanho da partícula e seu potencial elétrico de superfície.

Neste experimento comparamos os resultados de diâmetro médio das partículas, índice de polidispersão (IPd) e potencial zeta das formulações na presença e na ausência da PcAlCl, verificando assim a influência da PcAlCl nesses parâmetros. Os dados experimentais são demostrados na Tabela I.

Sistemas de liberação lipídicos são sistemas de carreamento que possuem grande capacidade de encapsular tanto fármacos hidrofílicos, em sua cavidade aquosa

(no caso dos lipossomas), quantos fármacos hidrofóbicos em sua bicamada lipídica (ALANAZI et al., 2015; BOLFARINI et al., 2014). A presença de compostos hidrofóbicos na fase lipídica normalmente tem a capacidade de influênciar a formação e estabilidade da camada lipídica dos sistemas.

Tabela I: Resultado da caracterização físico-química das formulações.

Formulação	Tamanho médio* (nm)	IPd*	Potencial Zeta* (mV)
CL	111,0 ± 2,0	0,130 ± 0,01	-11,0 ± 5,0
CLPc	120,0 ± 13,0	0,180 ± 0,05	-7,0 ± 6,0
UDLT80	83,0 ± 4,0	0,240 ± 0,01	-9,0 ± 1,0
UDLT80Pc	88,0 ± 12,0	0,210 ± 0,03	-6,0 ± 1,0
UDLS80	128,0 ± 6,0	0,130 ± 0,02	-15,0 ± 2,0
UDLS80Pc	143,0 ± 18,0	0,200 ± 0,05	-10,0 ± 5,0
UDLCS	78,0 ± 8,0	0,170 ± 0,04	-40,0 ± 4,0
UDLCSPc	88,0 ± 3,0	0,150 ± 0,02	-30,0 ± 4,0
LDE	127,6 ± 9,0	0,259 ± 0,068	-29,3 ± 1,2
LDEPc	127,5 ± 6,0	0,239 ± 0,020	-29,4 ± 3,4

*Esses resultados compreendem a média de 3 preparações independentes (± Desvio Padrão);
CL = Lipossoma convencional; **CLPc** = Lipossoma convencional incorporado com PcAlCl; **UDLT80** = Lipossoma ultradeformável com Tween 80; **UDLT80Pc** = Lipossoma ultradeformável com Tween 80 e incorporado com PcAlCl; **UDLS80** = Lipossoma ultradeformável com Span 80; **UDLS80Pc** = Lipossoma ultradeformável com Span 80 e incorporado com PcAlCl; **UDLCS** = Lipossoma ultradeformável com desoxicolato de sódio; **UDLCSPc** = Lipossoma ultradeformável com desoxicolato de sódio e incorporado com PcAlCl; **LDE** = nanoemulsão rica em colesterol; **LDEPc** = nanoemulsão rica em colesterol incorporada com PcAlCl.

Como podemos observar na Tabela I, não foram detectadas diferenças significantes na distribuição de tamanho das formulações após a incorporação da PcAlCl para um $p<0,5$. O tamanho médio de partícula foi de 78 nm – 128,0 nm e de 88,0 nm – 143,0 nm para as formulações na ausência e para formulações na presença da PcAlCl, respectivamente.

A liberação de fármacos no interior das células é dependente da interação destes com os sistemas de liberação de fármacos (AMAR-LEWIS et al., 2014). Tecidos tumorais, bem como regiões de infecção e inflamação, têm capilares com permeabilidade aumentada pelo resultado da angiogênese, seus poros variam de 100 nm a 800 nm (BATISTA , CARVALHO e MAGALHAES, 2007).

Apesar do cerebro humano possuir cerca de 100 bilhões de capilares podendo chegar a um tamanho de 643 km e uma área superficial de 20 m², o que faz o cérebro humano o órgão com maior capacidade de perfusão tecidual do corpo humano, a barreira hematoencefálica (BHE) impede a perfusão de substâncias que não são estritamente necessárias para o tecido cerebral (VAN TELLINGEN et al., 2015). Entretanto, os tecidos cancerosos do tipo IV devido a sua alta agressividade são caracterizados por apresentar grandes alterações na função vascular normal do tecido cerebral, resultando em aumento da perfusão tecidual o que diminui a seletividade da BHE, permitindo assim a entrada de substâncias que normalmente teriam dificuldade de perfusão (DHERMAIN et al., 2010).

Juntamente com a BHE, a pele desempenha uma função de barreira de defesa, importante para o corpo, a qual está associada à sua camada mais externa, a epiderme. A barreira epidermal reduz a absorção de compostos químicos além de prevenir infecções de origem microbiana e a perda de água (MEYER et al., 2014; YU et al., 2013). Os sistemas lipossomais vêm sendo utilizados já há algum tempo como sistemas de liberação de quimioterápicos, anticorpos e siRNA com sucesso e por possuir características lipofílicas aumentam a permeação destes fármacos aumentando a eficácia do tratamento de doenças como o melanoma (ALOMRANI et al., 2014; CHEN et al., 2015a; DUANGJIT et al., 2012).

Os sistemas lipossomais desenvolvidos para tais finalidades neste trabalho apresentaram distribuição de tamanhos similares aos encontrados por YANG et al., (2014) e LI et al., (2014c) que ao estudarem lipossomas contendo os fármacos docetaxel e paclitaxel para o tratamento de glioblastoma, observaram um aumento na capacidade de permear a BHE superior aos fármacos não encapsulados. Estudos de

RASTOGI , ANAND e KOUL (2009) e DESMET et al. (2016) mostram que os sistemas lipossomais têm a capacidade de promover a permeação de fármacos pelo estrato córneo.

As nanoemulsões de LDE desenvolvidas apresentaram uma distribuição de tamanho superior aos encontrados por CONTENTE et al., (2014) (50 nm), mesmo após a incorporação dos fármacos metotrexato e daunorubicina, relatado anteriormente. Esse resultado é explicado pela diferença de metodologia na produção do LDE. No caso dos autores, foi utilizado um disrruptor celular (sonicador de ponta de titânio) que interage de forma direta com a formulação, diminuindo assim o tamanho de suas partículas. Em nosso trabalho foi utilizado um banho de ultrassom que interage de forma indireta com a formulação, o que induz a uma menor quebra das partículas formadas mantendo o sistema mais integro. Apesar da distribuição de tamanho maior do que encontrado na literatura, observou-se que a nanoemulsão de LDE manteve a capacidade aumentar a atividade fotodinâmica da PcAlCl, nos modelos celulares estudados.

Nos estudos com as formulações de lipossomas ultradeformáveis observou-se uma distribuição de tamanho aproximadamente 20% menor em relação à distribuição de tamanho quando comparados ao sistema lipossoma convencional. Isso se deve presença dos tensoativos nas formulações, que diminuem a tensão superficial das partículas e que leva a um rearranjo dos fosfolipídios, resultando na diminuição da distribuição do tamanho das partículas (AGGARWAL e GOINDI, 2012).

Cada tensoativo interage de maneira distinta com a bicamada lipídica, isso ocorre, pois, dependendo de seu equilíbrio hidrofílico/lipofílico (do inglês HLB) o tensoativo pode ficar mais atrelado ou livre da rede de lipídios. Quanto menor o valor de

HLB mais lipofílico será o tensoativo e quanto maior o valor de HLB mais hidrofílico será o tensoativo.

O Span 80 é um tensoativo de característica não-iônica e sua estrutura molecular possui uma cadeia lipídica insaturada o que contribui para o valor de HLB de 4,3, já o Tween 80 e o Desoxicolato de sódio possuem 15 e 16,7, respectivamente (EL MAGHRABY , WILLIAMS e BARRY, 2000). O Span 80 presente nas formulações UDLS80 e UDLS80Pc, por possuir uma maior afinidade pelos lipídios da bicamada do lipossoma e se localizar de forma mais ancorada na bicamada, contribui para o aumento do tamanho médio das partículas do lipossoma, em relação à formulação de lipossoma convencional.

O IPd é um indicativo da distribuição de tamanho das partículas de uma formulação. Como é possível observar na Tabela 1, todas as formulações desenvolvidas apresentaram valores de IPd ≤ 0,3, sugerindo que as formulações obtidas apresentaram uma baixa dispersão e uma distribuição monomodal, confirmando a capacidade do método de obtenção dos sistemas lipossomais (DE ASSIS et al., 2008; PEREIRA et al., 2008).

Nos resultados mostrados na Tabela 1, as formulações lipossomais obtiveram valores negativos de potencial zeta, variando de -9,0 a -40,0 mV para as formulações na ausência da PcAlCl e -6,0 a -30,0 mV e para formulações na presença da PcAlCl. O potencial de superfície de todas as formulações foi negativo, resultado da composição das formulações e do equilíbrio de cargas das moléculas de tensoativos e dos lipídios utilizados.

Não foram observadas diferenças significativas nos valores de potencial zeta obtido para as formulações de lipossoma convencional (CL e CLPc) e dos lipossomas

ultradeformáveis com Span 80 (UDLS80 e UDLS80Pc) e Tween 80 (UDLT80 e UDLT80Pc). Estes resultados são atribuídos à natureza não iônica das estruturas moleculares do Span 80 e Tween 80 não apresentando assim diferenças na carga superficial do lipossoma (LEE et al., 2005)

As formulações de lipossoma ultraderfomável contendo o tensoativo desoxicolato de sódio (UDLCS e UDLCSPc) e as formulações de LDE e LDEPc, apresentaram potencial zeta mais negativo se compararmos com as demais formulações. Este resultado é atribuído ao aumento de carga negativa nas partículas das formulações pela natureza aniônica da estrutura molecular do desoxicolato de sódio. Suas formulações apresentaram o potencial de superfície mais negativo de -40,0 mV e -30,0 mV para as formulações na ausência e para formulações na presença da PcAlCl, respectivamente. O mesmo foi observado por MONTANARI et al., (2007) que estudaram ftalocianinas de zinco incorporadas em lipossomas ultradeformáveis contendo desoxicolato de sódio.

4.1.2 Monitoramentos da estabilidade acelerada das formulações

Um dos métodos para a avaliação da estabilidade de formulações farmacêuticas em longo prazo é por meio da análise da sedimentação e da clarificação das dispersões farmacêuticas que passa por um processo de centrifugação. O LUMiSizer® é um equipamento que analisa essas dispersões e permite a previsão da estabilidade (*Shelf life*) de diversos produtos farmacêuticos como suspensões e emulsões (CHIU et al., 2012).

Com esse sistema é possível observar mudanças nas formulações causadas pelos processos de sedimentação e clarificação induzidos pelo processo de centrifugação. Esse processo consegue medir a estabilidade das formulações em até 2300 vezes mais rápido que os testes convencionais (DETLOFF , SOBISCH e LERCHE, 2006; PETZOLD et al., 2009).

As análises das formulações na ausência da PcAlCl estão representadas na Figura 14. Comparando os perfis de transmissão final com o inicial ao logo do experimento não foram observadas mudanças nos perfis de transmissão, indicando que as partículas se apresentavam dispersas no decorrer de todo o experimento, não havendo processos de desestabilização. Este efeito também foi observado para as formulações incorporadas com a PcAlCl (Apêndice A).

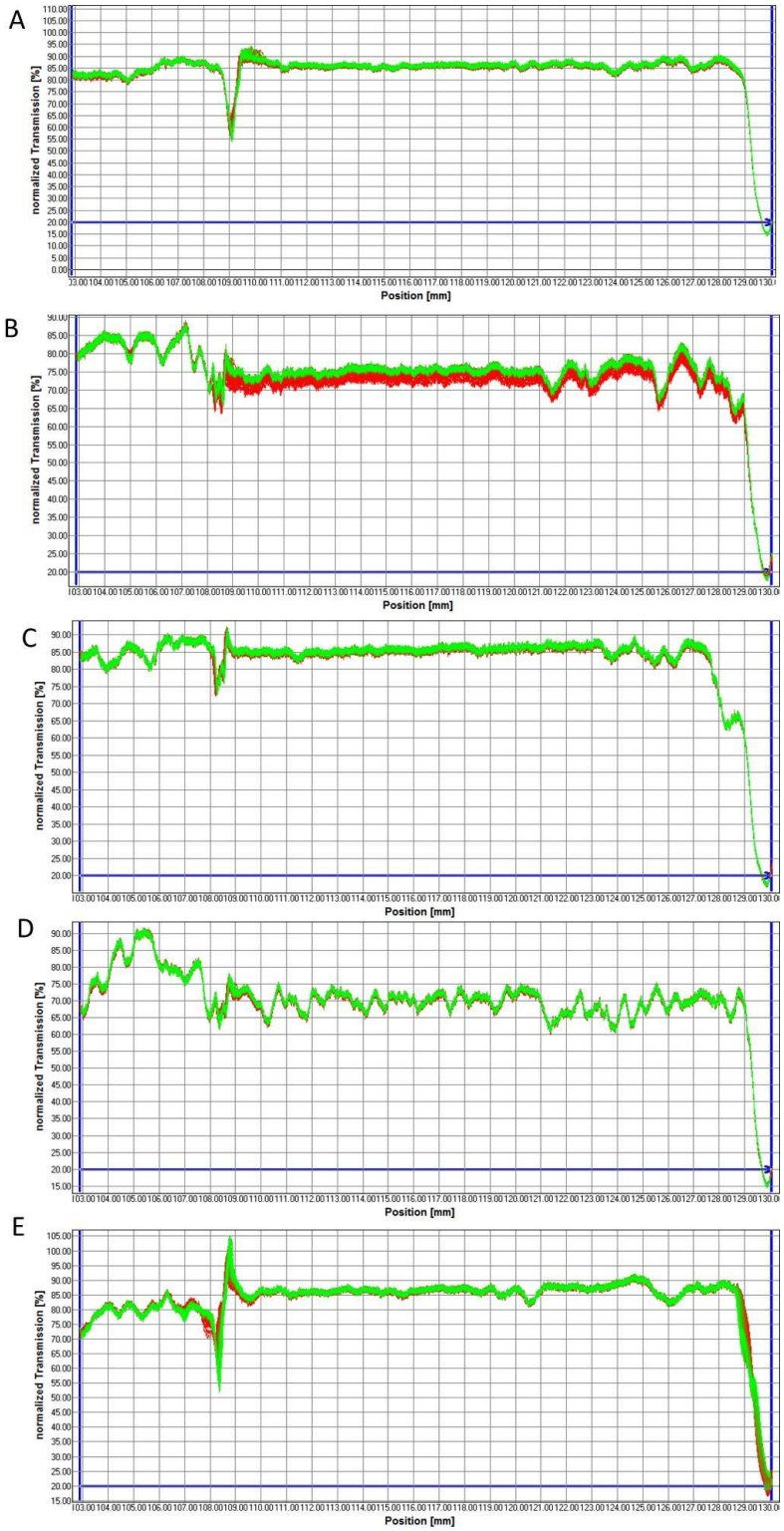


Figura 14- Perfil de transmissão das formulações na ausência da PcAlCl. Em A) LDE; Em B) lipossoma convencional (CL); Em C) lipossoma ultraderfomável com Tween 80 (UDLT80); Em D) lipossoma ultraderfomável com Span 80 (UDLS80); Em E) lipossoma ultraderfomável com desoxicolato de sódio (UDLCS). Os primeiros perfis estão em vermelho e os últimos em verde.

As velocidades de sedimentação e de clarificação são calculadas por meio da análise dos perfis de transmissão pelo Software SEPView 5.1 (LUM GmbH, Berlin, Alemanha). A inclinação da reta obtida pela integração dos perfis de transmissão I(r), numa região de interesse dentro da amostra ($\Delta r = r_2 - r_1$) corresponde à velocidade de clarificação, onde r é o raio de rotação, (PETZOLD et al., 2009). A velocidade de sedimentação é calculada pelo modo "*front track*" do software, que utiliza um algoritmo que acompanha a evolução dos perfis de transmissão, detectando a posição de interface sobrenadante/suspensão em um perfil de transmissão mínima e máxima da amostra. A inclinação da reta obtida corresponde à velocidade de sedimentação (HAREL et al., 2013).

Os resultados obtidos das velocidades de clarificação e sedimentação são apresentados na Tabela 2. Estes resultados mostram que tanto na ausência como na presença da PcAlCl as velocidades de sedimentação e clarificação ficaram próximos de zero. Processos de clarificação e sedimentação de formulações são caracterizados com eventos de instabilidade que podem ocorrer nas formulações, sendo que quanto menor for o valor da sua velocidade mais estável é a formulação (CHIU et al., 2012).

Os resultados das velocidades juntamente com a simetria apresentada pelos perfis de transmissão das formulações no decorrer do experimento, indicam a estabilidade das formulações por um período de tempo de 17 meses.

Tabela II: Velocidade de sedimentação e de clarificação

Formulação	Velocidade de sedimentação (%/h)	Velocidade de clarificação (µm/s)
LDE	0,0768	0,0002
LDEPc	0,0259	0,0004
CL	0,1948	0,001
CLPc	0,5084	0,0114
UDLT80	0,213	0,004
UDLT80Pc	0,1177	0,0017
UDLS80	0,1039	0,0174
UDLS80Pc	0,4437	0,0038
UDLCS	0,0077	0,0064
UDLCSPc	0,0581	0,0081

CL = Lipossoma convencional; **CLPc** = Lipossoma convencional incorporado com PcAlCl; **UDLT80** = Lipossoma ultradeformável com Tween 80; **UDLT80Pc** = Lipossoma ultradeformável com Tween 80 e incorporado com PcAlCl; **UDLS80** = Lipossoma ultradeformável com Span 80; **UDLS80Pc** = Lipossoma ultradeformável com Span 80 e incorporado com PcAlCl; **UDLCS** = Lipossoma ultradeformável com desoxicolato de sódio; **UDLCSPc** = Lipossoma ultradeformável com desoxicolato de sódio e incorporado com PcAlCl; **LDE** = nanoemulsão rica em colesterol; **LDEPc** = nanoemulsão rica em colesterol incorporada com PcAlCl.

4.1.3 Estudo de estabilidade das formulações a longo prazo

A estabilidade físico-química das formulações foi avaliada pelas medidas de diâmetro médio, índice de polidispersividade e potencial zeta durante um período de 180 dias. As formulações foram acondicionadas a 4°C e por intervalos de tempos predeterminados. Cada formulação foi analisada com relação aos parâmetros anteriormente citados. A Figura 15 mostra o comportamento das formulações CL na ausência da PcAlCl durante o período deste estudo. Os gráficos de estabilidade das demais formulações são apresentados no Apêndice B.

Todas as formulações apresentaram estabilidade durante o período de armazenamento estudado sem variação estatisticamente significante nos parâmetros analisados de tamanho de partícula, potencial de superfície e índice de polidispersão ($p > 0,05$).

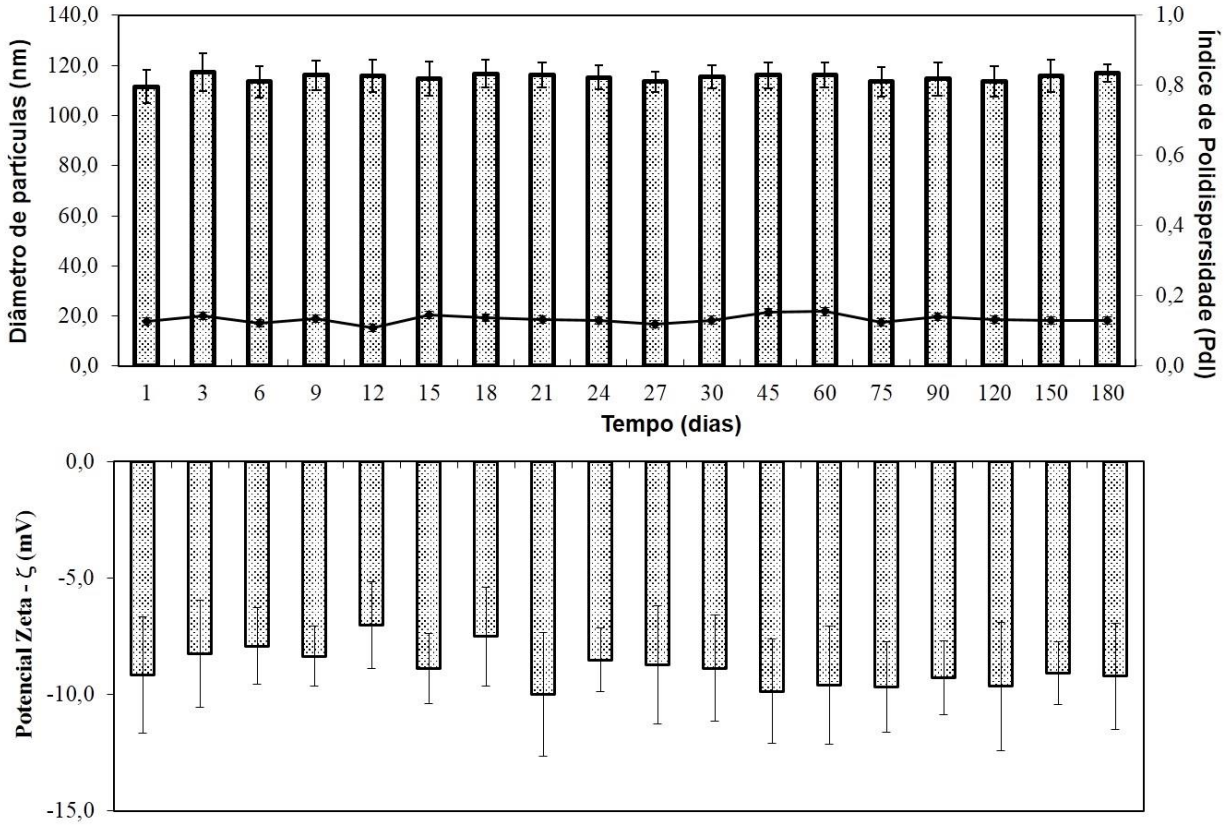


Figura 15 - A) Resultados de diâmetro médio (±DP, colunas) e Índice de polidispersão (IPd) (±DP, linhas) da formulação de lipossoma convencional (CL); B) Resultados de potencial zeta (ς) (±DP, colunas) da formulação de lipossoma convencional (CL) para o estudo de estabilidade pelo período de 180 dias.

A influência da incorporação da PcAlCl na estabilidade físico-química das formulações também foi avaliada por um período de 180 dias. Na Figura 16 é mostrada a estabilidade da formulação CLPc durante o período deste estudo. Os gráficos de estabilidade das demais formulações são apresentados no Apêndice B.

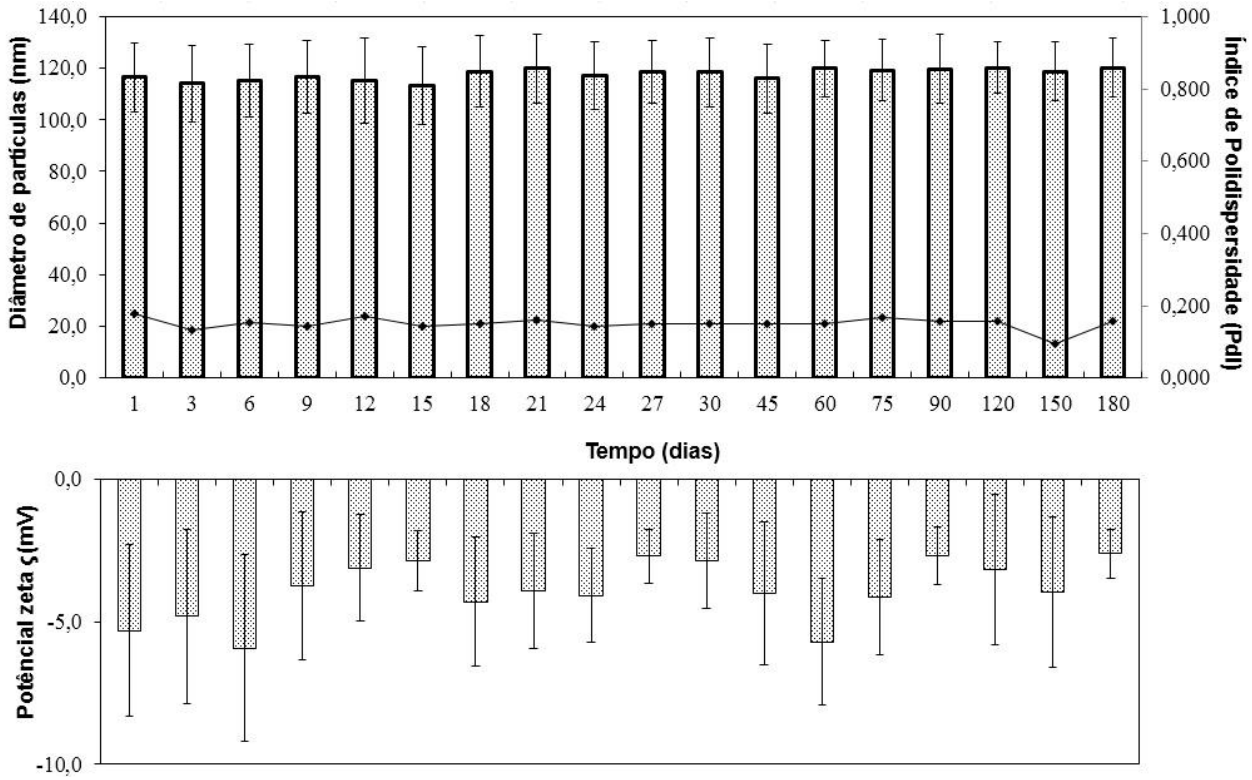


Figura 16 - A) Resultados de diâmetro médio (±DP, colunas) e Índice de polidispersão (IPd) (±DP, linhas) da formulação de lipossoma convencional incorporado com ftalocianina de cloro-alumínio (CLPc); B) Resultados de potencial zeta (ç) (±DP, colunas) da formulação de lipossoma convencional incorporado com ftalocianina de cloro-alumínio (CLPc) para o estudo de estabilidade pelo período de 180 dias.

Todas as formulações apresentaram estabilidade durante o período de armazenamento estudado não tendo sido observada nenhuma variação estatisticamente significante nos parâmetros analisados (p>0,05). Não foram observadas diferenças na estabilidade das formulações contendo a PcAlCl em comparação com as formulações vazias, mostrando que a PcAlCl não interfere na estabilidade das formulações. Resultados semelhantes foram observados por MONTANARI et al., (2007) e ZEBALLOS et al., (2012) estudando ftalocianinas de zinco incorporadas em sistemas lipossomais.

Os tensoativos ao interagirem de forma dinâmica com a bicamada lipídica tem a capacidade de influênciar a estabilidade dos lipossomas (CADDEO et al., 2015; GILLET et al., 2009; GILLET , EVRARD e PIEL, 2011). Entretanto, a incorporação dos tensoativos nas formulações de lipossoma ultraderfomável não interferiu na estabilidade das formulações em relação à formulação de lipossoma convencional no período de tempo estudado.

Devido a estas considerações, nós propusemos a preparação (de acordo com procedimento descrito no item **3.3.3**) e a caracterização espectroscópica dos sistemas lipossomais e de LDE.

Além deste estudo foram também realizadas a caracterização espectroscópica da PcAlCl em meio orgânico (etanol) como referência.

A Figura 17 indica a estabilidade fotofísica da PcAlCl na formulação CLPc. A estabilidade da PcAlCl nas demais formulações e em meio orgânico (etanol) são mostradas no Apêndice C. Para a caracterização da estabilidade das formulações foram registrados os espectros de absorção da PcAlCl incorporada no seu sistema de liberação em intervalos regulares de tempo e, por meio da variação do espectro de absorção dá PcAlCl incorporada nas formulações pode-se averiguar a sua estabilidade nas formulações durante o período de 30 dias.

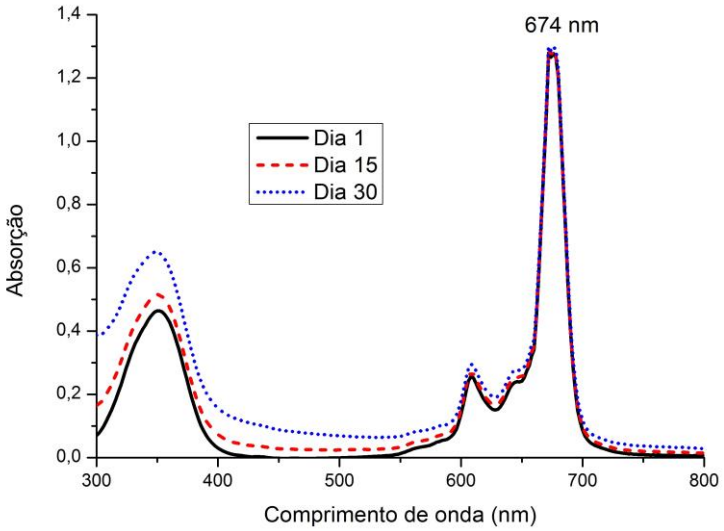


Figura 17 - Espectro de absorção da PcAlCl incorporada em lipossoma convencional (CLPc) no decorrer de 30 dias indicando a estabilidade da formulação formada.

Nas formulações de CLPc e UDLT80Pc não foram observadas variações no máximo de absorção do conjunto de bandas *Q* da PcAlCl, mostrando ser capazes de manter as características de absorção da PcAlCl por um período de 30 dias, com espectros similares aqueles obtidos em meio orgânico sob as mesmas condições (Apêndice C). Esses dados corroboram com os encontrados pelo acompanhamento de suas estabilidades por distribuição de tamanho e potencial zeta, viabilizando a sua utilização como possível sistema de veiculação para a PcAlCl.

Pela análise dos espectros de absorção foram observadas diminuições discretas na banda *Q* em 674 nm da PcAlCl nos lipossomas UDLS80Pc e UDLCSPc (Apêndice C). Esses resultados correspondem a uma diminuição de cerca de 10% na absorção da PcAlCl nessas formulações. As formulações lipossomais, assim que produzidas foram armazenadas em ependorfs e recobertos com papel alumínio impedindo assim a fotodegradação da PcAlCl. Portanto, e como não houve mudanças

na distribuição de tamanho e potencial zeta das formulações, essa diminuição observada de absorção pode estar relacionada com a mudança de local onde a ftalocianina se encontra na bicamada lipídica (MILENKOVIC et al., 2013). Estes resultados proporcionam a confiabilidade quanto à capacidade dos sistemas lipossomais na manutenção da estabilidade físico-químicas da PcAlCl durante todos os experimentos propostos neste trabalho.

4.2 Determinação da deformidade das partículas

A deformação das partículas dos lipossomas ultradeformáveis é uma propriedade que os diferenciam do lipossoma convencional, cuja membrana não é elásticas o que dificulta a sua permeação pelas barreiras biológicas. Por essa razão, a determinação da deformidade é um importante parâmetro para a caracterização de sistemas lipossomais ultradeformáveis.

A membrana do lipossoma ultraderfomável, durante a passagem por poros menores que seu diâmetro de partícula, deve ser flexível permitindo que o lipossoma modifique sua estrutura sem que haja rompimento de sua bicamada lipídica ou altere significativamente seu diâmetro de partícula (GILLET et al. 2011; ROMERO et al. 2013).

Os resultados obtidos da deformidade dos lipossomas ultradeformáveis desenvolvidos estão mostrados na tabela III.

Os resultados apresentados mostram que os lipossomas preparados apresentam a capacidade de se deformar comparando com a formulação de lipossoma convencional. A capacidade de deformação foi de até 8 vezes maior para a formulação de UDLCS comparando com a formulação CL. Essa capacidade foi mantida mesmo após a incorporação da PcAlCl.

Entretanto, a formulação de lipossoma ultraderfomável contendo o tensoativo Span80 (UDLS80) apresentou uma deformidade inferior a formulação de lipossoma convencional (CL). Essa diminuição da deformidade foi ainda maior após a incorporação da PcAlCl (UDLS80Pc). Esses resultados são atribuídos a presença do Span 80 na membrana do lipossoma. Por possuir um valor de HLB de 4,3, a molécula de Span 80 tem uma interação maior com os lipídios da membrana lipossomal e junto com a presença da PcAlCl dentro da membrana (UDLS80Pc), confere uma menor capacidade de deformação dessas formulações.

Tabela III: Deformidade das partículas nas formulações

Formulação	Deformidade
CL	0,56 ± 0,06
CLPc	0,69 ± 0,04
UDLT80	1,08 ± 0,13
UDLT80Pc	1,40 ± 0,06
UDLS80	0,68 ± 0,05
UDLS80Pc	0,20 ± 0,02
UDLCS	3,97 ± 0,18
UDLCSPc	4,13 ± 0,10

CL = Lipossoma convencional; **CLPc** = Lipossoma convencional incorporado com PcAlCl; **UDLT80** = Lipossoma ultradeformável com Tween 80; **UDLT80Pc** = Lipossoma ultradeformável com Tween 80 e incorporado com PcAlCl; **UDLS80** = Lipossoma ultradeformável com Span 80; **UDLS80Pc** = Lipossoma ultradeformável com Span 80 e incorporado com PcAlCl; **UDLCS** = Lipossoma ultradeformável com desoxicolato de sódio; **UDLCSPc** = Lipossoma ultradeformável com desoxicolato de sódio e incorporado com PcAlCl;

4.2 Caracterização Fotofísica

4.2.1 Determinação do espectro de absorção e de emissão de fluorescência (UV-visível)

A característica mais importante de um fármaco fotossensibilizante na TFD é que ele deve absorver preferencialmente na região do vermelho do espectro visível, ou na

chamada “janela terapêutica”, localizada entre 600 nm e 800 nm. Esta região corresponde ao máximo de penetração de luz nos tecidos dos mamíferos (DÀBROWSKA et al., 2016; QASSEM e KYRIACOU, 2015; ROSSETTI et al., 2016).

O efeito dos fármacos fotossensibilizantes em sistemas biológicos não é determinado somente por suas propriedades fotofísicas, mas também pela forma como ele interage com os sistemas biológicos. Essa interação determina sua localização preferencial no tecido alvo, afetando não só a TFD, mas também o mecanismo que leva a destruição do tecido alvo (Tipo I ou Tipo II) (ALLISON e MOGHISSI, 2013).

A escolha adequada do sistema de liberação deve ser baseada na investigação de sua influência nos parâmetros fotofísicos em solução homogênea e nesses sistemas micro heterogêneos, que além de melhorar a seletividade tumoral mimetizem ao máximo os sistemas biológicos, oferecendo assim uma maior segurança quanto a sua toxicidade.

Com base nas considerações apresentadas, nessa etapa do trabalho foram realizados estudos espectroscópicos no estado fundamental (espectroscopia de absorção e de emissão de fluorescência no estado estacionário) da PcAlCl em etanol e incorporada nos sistemas lipossomais.

O espectro de absorção da PcAlCl em meio etanólico e nos sistemas lipossomais é característico de espécies não agregadas (Figura 18). Estes espectros de absorção mostraram a presença clássica da banda *Soret* (entre 300 nm – 410 nm), que corresponde às transições eletrônicas do tipo π-π^*, e um conjunto de bandas *Q* localizadas entre 630 nm a 740 nm.

Quando comparamos os perfis espectrais de absorção no meio orgânico (etanol) com os perfis apresentados pelos lipossomas na mesma concentração molar (5 µM),

observamos perfis de absorção praticamente sem alterações da PcAlCl após a incorporação. Foi observado uma pequena diminuição da absorção em 674 nm, resultado das mudanças no microambiente no qual a PcAlCl encontra-se, favorecendo interações inter-moleculares entre a PcAlCl e os adjuvantes das formulações.

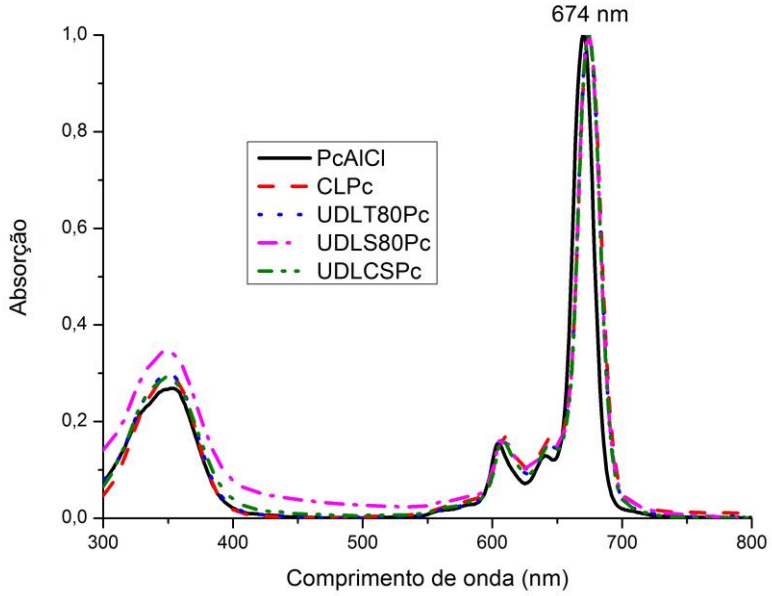


Figura 18 - Espectro de absorção no UV-visível normalizado da PcAlCl em etanol espectroscópico e incorporada em meio lipossomal tamponado (5 µM) na faixa espectral 300-800 nm. **CLPc** = Lipossoma convencional incorporado com PcAlCl; **UDLT80Pc** = Lipossoma ultradeformável com Tween 80 e incorporado com PcAlCl; **UDLS80Pc** = Lipossoma ultradeformável com Span 80 e incorporado com PcAlCl; **UDLCSPc** = Lipossoma ultradeformável com desoxicolato de sódio e incorporado com PcAlCl.

Na formulação de UDLS80Pc e LDEPc foram observadas, na região de 300 nm - 400 nm, um deslocamento da linha de base, o qual é resultado do espalhamento de luz nessa região, típico de sistemas vesiculares em meio heterogêneo. Esse deslocamento não foi observado nos outros sistemas lipossomais por apresentarem distribuição de tamanho inferior ao apresentado pela formulação UDLS80Pc e LDEPc de 143 nm e 129 nm respectivamente.

Foram observados também um leve descolamento batocrômico na banda máxima de absorção da PcAlCl de 4 nm e um leve deslocamento hepercrômico na banda *Soret* de 4 nm para UDLT80Pc e UDLS80Pc e para 8 nm nas formulações de UDLCSPc. Analisando esses resultados podemos considerar que o perfil espectral de absorção da PcAlCl foi mantido sem mudanças significativas mesmo após a incorporação nos sistemas lipossomais.

Uma das principais preocupações quando se utiliza a TFD para o tratamento contra o melanoma maligno de pele é a competição entre as bandas de absorção de luz do agente fármaco fotossensibilizante e do pigmento de melanina que tem absorção máxima em 530 nm. Entretanto, as formulações desenvolvidas contendo a PcAlCl apresentaram banda de absorção superior à da melanina mostrando serem promissoras na terapia contra o melanoma, pois além de terem uma maior penetração tecidual da luz, não terão competição com a absorção de luz pela melanina.

A espectroscopia de fluorescência também foi utilizada para a caracterização das propriedades fotofísicas da PcAlCl incorporada nos lipossomas. Pode-se observar um deslocamento de *Stokes* no espectro de fluorescência da PcAlCl de 674 nm (etanol) para 681 nm incorporada nos sistemas lipossomais (Figura 19).

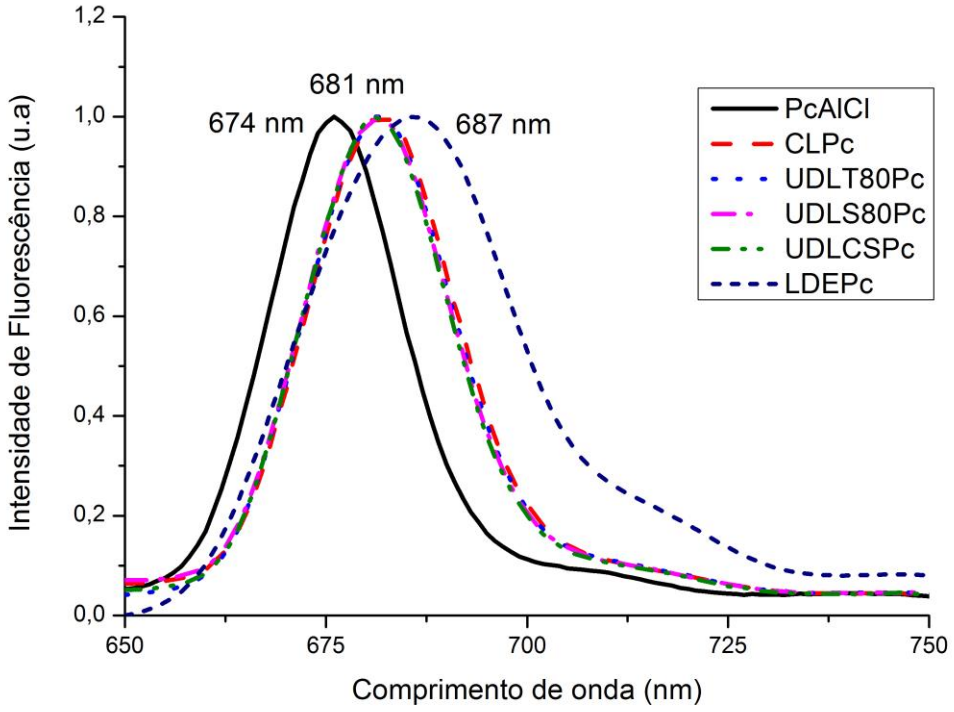


Figura 19 - Espectro de fluorescência normalizado da PcAlCl em etanol espectroscópico (-) (0,5 µM) e incorporada em meio lipossomal tamponado (- -) (0,5 µM) na faixa espectral 650-800 nm com λ_{exi}= 614nm. **CLPc** = Lipossoma convencional incorporado com PcAlCl; **UDLT80Pc** = Lipossoma ultradeformável com Tween 80 e incorporado com PcAlCl; **UDLS80Pc** = Lipossoma ultradeformável com Span 80 e incorporado com PcAlCl; **UDLCSPc** = Lipossoma ultradeformável com desoxicolato de sódio e incorporado com PcAlCl; **LDEPc** = Nanoemulsão de LDE incorporada com PcAlCl

Esse deslocamento esta relacionado com a solvatação da PcAlCl pelas formulações. Essa solvatação modificou a energia emitida pela PcAlCl no estado excitado, deslocando assim sua banda de emissão para uma região menos energética (VALE et al., 2015).

Os resultados obtidos indicaram que os sistemas de liberação utilizados não afetaram de maneira significativa as propriedades fotofísicas no estado estacionário da PcAlCl e que a incorporação do agente fármaco fotossensibilizante em lipossomas

pode ser empregada como sistema de veiculação do fármaco fotossensibilizante PcAlCl para a aplicação na terapia fotodinâmica.

4.2.2 Determinação do rendimento quântico de fluorescência (Φ_F) da PcAlCl em etanol e incorporada nas formulações

Uma molécula em seu estado fundamental (S_o), ao absorver um fóton de luz, promove seus elétrons aos estados excitados singletos de maior energia (S_n), de onde os mesmos podem retornar para um estado de menor energia singleto (S_1), nesse estado essa molécula pode então voltar para o estado fundamental por processos radiativos (emissão de luz) e não radiativos (emissão de calor). A razão entre os números de fótons emitidos a partir do estado excitado singleto por processo radiativo (denominado fluorescência) e o número total de fótons absorvidos, define um parâmetro fotofísico denominado rendimento quântico de fluorescência (TURRO , RAMAMURTHY e SCAIANO, 2012). O rendimento quântico de fluorescência fornece a probabilidade de que uma molécula em seu estado excitado seja desativada por emissão de fluorescência e não por outros processos (não radiativos).

Uma vez que a TFD é altamente dependente da produção de $^1O_2$, o rendimento quântico de fluorescência é uma propriedade fotofísica de grande importância para os fármacos fotossensibilizantes. Compostos altamente fluorescentes usualmente são pouco eficientes como agentes fotodinâmicos uma vez que é baixa a produção de estados excitados tripletos formados pelo processo de cruzamento intersistemas e que origina, por processos de transferência de energia, o oxigênio singleto.

Os rendimentos quântico de fluorescência (Φ_F) geralmente são determinados de forma relativa às propriedades previamente definidas para um composto padrão (DE PAULA et al., 2013), conforme descrito nos procedimentos experimentais (item **3.3.12**).

Os valores das absorbâncias dos espectros de absorção do padrão (PcZn em etanol), no comprimento de onda de 614 nm, os valores das áreas dos espectros de emissão de fluorescência corrigidos, tanto para o padrão, como das soluções preparadas nos meios considerados, foram analisadas por meio da Equação 3, determinando-se assim, rendimento quântico de fluorescência (Φ_F).

$$\phi_F = \left(\frac{A_x}{A_{(p)}}\right).\left(\frac{DO_{(p)}}{DO_x}\right).\left(\frac{n^2{}_{(p)}}{n^2{}_{(x)}}\right).\phi_{F_{(p)}} \qquad \textbf{Equação 3}$$

Os valores de Φ_F nos meios estudados estão sumarizados na Tabela III.

Tabela IV: Valores do Φ_F para a PcZn em etanol (padrão), para a PcAlCl em etanol e incorporada nas formulações.

Sistema	Φ_F
PcZn em etanol	0,28
PcAlCl em etanol	0,26
CLPc	0,17
UDLT80Pc	0,19
UDLS80Pc	0,19
UDLCSPc	0,12
LDEPc	0,22

A incorporação da PcAlCl nos sistemas lipossomais causou uma diminuição no valor do Φ_F em relação a PcAlCl em etanol, podendo chegar a uma redução de 53% para a formulação de lipossoma ultradeformável UDLCSPc. Essa diminuição do Φ_F esta

relacionada com o deslocamento de strokes observado na espectroscopia de fluorescência da PcAlCl quando incorporada nos sistemas de liberação.

A PcAlCl no seu estado excitado, ao interagir com o sistema lipossomal, pode favorecer a desativação por outros mecanismos, diminuindo assim a quantidade de moléculas de PcAlCl que desativam pelo processo de fluorescência, ou seja, diminuindo o valor de seu Φ_F.

A diminuição do Φ_F pode indicar o cruzamento intersistema da PcAlCl, formando assim seus estados excitados tripletos e, portanto, levaria a uma maior produção de $^1O_2$. O estado tripleto excitado só pode ser formado a partir de uma molécula no seu estado singleto excitado, já que a transição do estado fundamental para o estado tripleto excitado é proibida por spin (ALLISON e MOGHISSI, 2013).

4.2.3 Medidas de fluorescência resolvida no tempo: determinação do tempo de vida singleto-singleto (τ_F)

O tempo de vida de uma molécula em seu estado singleto excitado é definido como o tempo médio que uma molécula permanece em seu estado excitado antes de retornar para seu estado fundamental, sendo assim, o tempo de vida de fluorescência pode fornecer informações importantes das interações da PcAlCl em seu microambiente (ERDOGMUS e NYOKONG, 2010; GIRIBABU et al., 2013). Os decaimentos exponenciais para o cálculo do tempo de tida de fluorescência para as amostras de PcAlCl em etanol e PcAlCl incorporada nos sistemas carreadores são mostrados no Apêndice D.

Na tabela 4 estão os resultados obtidos pela a análise do decaimento do tempo de vida de fluorescência.

Tabela V: Dados de espectroscopia de fluorescência resolvida no tempo

Sistema	A (%)	τ_F
PcAlCl em etanol	100	7,90 ns
LDEPc	57	5,30 ns
	43	0,90 ns
CLPc	100	7,40 ns
UDLT80Pc	100	7,60 ns
UDLS80Pc	100	7,80 ns
UDLCSPc	100	8,00 ns

Ao comparar os resultados obtidos para a PcAlCl em etanol e incorporada em sistemas lipossomais, foram observadas pequenas diferenças nos tempos de vida de fluorescência, mas continuam na mesma grandeza de tempo (ns). Portanto, a diminuição do Φ_F da PcAlCl incorporada se deve a supressão estática pelo microambiente proporcionado pelas formulações lipossomais. Ao incorporar a PcAlCl em LDE houve uma diminuição no tempo de vida da PcAlCl e apresentou dois tempos de vida: um em 5,30 ns (57%) e outro em 0,90 ns (43%). JAYME , CALORI e TEDESCO (2016) estudando a agregação da PcAlCl em meios aquosos, observaram que a PcAlCl apresentava um segundo tempo de vida em 1,4 ns com 50% em relação ao tempo de vida das espécies monoméricas de 7 ns, onde atribuíram esse tempo a emissão de fluorescência aos agregados menores (dímeros de PcAlCl).

O sistema de LDE é formado por vários componentes e proporciona uma maior quantidade de diferentes microambientes para que a PcAlCl possa interagir. Ao interagir com um microambiente de caráter mais polar favorece a agregação das moléculas de PcAlCl, levando assim ao surgimento de um segundo tempo de vida.

4.2.4 Determinação da eficiência de encapsulação de PcAlCl em sistemas lipossomais

A quantificação do conteúdo de PcAlCl nas formulações lipossomais, bem como a determinação da fração de PcAlCl livre, foi realizada por método espectrofluorimétrico com excitação fixa em 615 nm e emissão em 684 nm. Os dados de eficiência de encapsulação são mostrados na Tabela VI.

Tabela VI: Eficiência de encapsulação dos sistemas lipossomais

Formulação	Eficiência de Encapsulação (%)
CLPc	68,2
UDLT80Pc	74,6
UDLS80Pc	84,7
UDLCSPc	50,3
LDEPc	81,1

A eficiência de encapsulação de formulações de composição lipídica está associada com à solubilidade do fármaco nos microambientes hidrofóbicos. Assim, fármacos hidrossolúveis têm valores de encapsulação inferiores (~10%) aos fármacos que são lipossolúveis (~70%) (COUVREUR et al., 2002; MORA-HUERTAS , FESSI e ELAISSARI, 2010). A eficiência de encapsulação observada para as formulações está de acordo com o descrito na literatura para outras formulações de composição lipídicas, uma vez que o caráter hidrofóbico da PcAlCl proporcionou uma alta eficiência de encapsulação. Na formulação UDLCSPc obteve-se um rendimento abaixo do esperado para compostos lipossolúveis, contudo, ainda apresentou uma quantidade suficiente que permite a utilização nos testes biológicos.

As diferenças nas eficiências de encapsulação da PcAlCl nos lipossomas ultradeformáveis pode ser explicada pelo: equilíbrio hidrofílico/lipofílico (HLB) dos

tensoativos, pela localização do fármaco fotossensível PcAlCl no lipossoma e pelo tamanho do lipossoma.

A PcAlCl por possuir característica mais lipofílica tende a se localizar numa maior quantidade entre os lipídios da membrana do lipossoma, a mesma localização esperada dos tensoativos podendo influênciar a quantidade de PcAlCl presente na membrana do lipossoma. Pelos valores de HLB dos tensoativos, foi observado o aumento da eficiência de encapsulação com a diminuição do valor do HLB (UDLS80Pc>LDEPc>UDLT80Pc>CLPc>UDLCSPc).

O Span 80 ao interagir com a membrana lipossomal, desestabiliza a organização da bicamada lipídica proporcionando o aparecimento de espaços entre os lipídios da bicamada lipídica facilitando a incorporação da PcAlCl na formulação. Essa característica, juntamente com o maior tamanho de partícula obtido pela formulação UDLS80Pc, corroboraram com o aumento da eficiência de encapsulação da PcAlCl.

4.2.5 Determinação indireta do rendimento quântico de produção do oxigênio singleto (Φ_Δ)

O rendimento quântico de oxigênio singleto (Φ_Δ) é um parâmetro determinado a partir da excitação de um fármaco fotossensível para o estado tripleto por meio de fotólise por pulso laser, gerando a espécie reativa $^1O_2$ que interage de forma a oxidar vários substratos e outros radicais livres como $OH^\bullet$, $^\bullet O^{2-}$ e $H_2O_2^\bullet$ que, podem atuar separadamente ou em conjunto ocasionando diferentes danos as estruturas das células tumorais desencadeando um processo de morte celular (ALLISON e MOGHISSI, 2013; CLEMENT et al., 2016).

Dentro desse contexto as formulações contendo a PcAlCl foram avaliadas quanto à geração de oxigênio singleto. Dentre os diferentes métodos utilizados para a determinação da produção de oxigênio singleto está o uso de sondas químicas como o álcool furfurílico, cujo uso é voltado para meios aquosos na captação do oxigênio singleto.

Ao irradiar as formulações contendo PcAlCl, o fármaco fotossensibilizante (Pc) sai do seu estado fundamental ($^1S_0$) de menor energia passando a popular um estado eletrônico singleto de maior energia ($^1S^*$), assim podendo efetuar um cruzamento intersistemas gerando seu estado tripleto. Neste estado ele pode transferir sua energia para oxigênio molecular, levando à formação de $^1O_2$, o qual é capaz de reagir prontamente com o álcool furfurílico, de forma irreversível, levando à formação de seus endoperóxidos (Figura 20).

$$^1S_o \longrightarrow {}^1S^*$$

$$^1S^* \longrightarrow {}^3S^*$$

$$^3S^* + {}^3O_2 \longrightarrow {}^1S_o + {}^1O_2$$

$$^1O_2 + AFF \longrightarrow AFF.O_2$$

Figura 20 - Mecanismo fotoquímico envolvido no consumo de oxigênio singleto pelo AFF.

A produção do $^1O_2$ gerado por meio da excitação das formulações no comprimento de onda de 660 nm, na presença de AFF, foi avaliada por meio do monitoramento eletrônico pela variação da quantidade de oxigênio dissolvido em solução, em função do tempo de irradiação.

O gráfico de consumo de oxigênio versus tempo de irradiação é apresentado na Figura 21. A constante de reação entre o AFF e o oxigênio singleto (*K*) para as diferentes formulações lipossomais foram calculados pela inclinação da curva de regressão linear do consumo de oxigênio em função do tempo de irradiação (Figura 21).

Como padrão foi utilizado uma solução de azul de metileno com rendimento quântico conhecido, após a obtenção do consumo do $^1O_2$ pelo AFF, foi possível calcular a eficiência de geração de oxigênio singleto (Φ_Δ). O valor de rendimento quântico de formação de $^1O_2$ foi calculado para cada complexo em triplicata, com base na equação abaixo.

$$\phi_\Delta = \left(\frac{k_x}{k_{(p)}}\right).\left(\frac{I_{(p)}}{I_{(x)}}\right).\phi_{\Delta_{(p)}}$$

Onde os subscritos *x* e *p* são referentes à amostra e ao padrão, respectivamente, *k* é a constate de reação do AFF e o $^1O_2$, I é a intensidade de luz absorvida pelo padrão e pela amostra, respectivamente. Φ_Δ é o rendimento quântico de produção de oxigênio singleto.

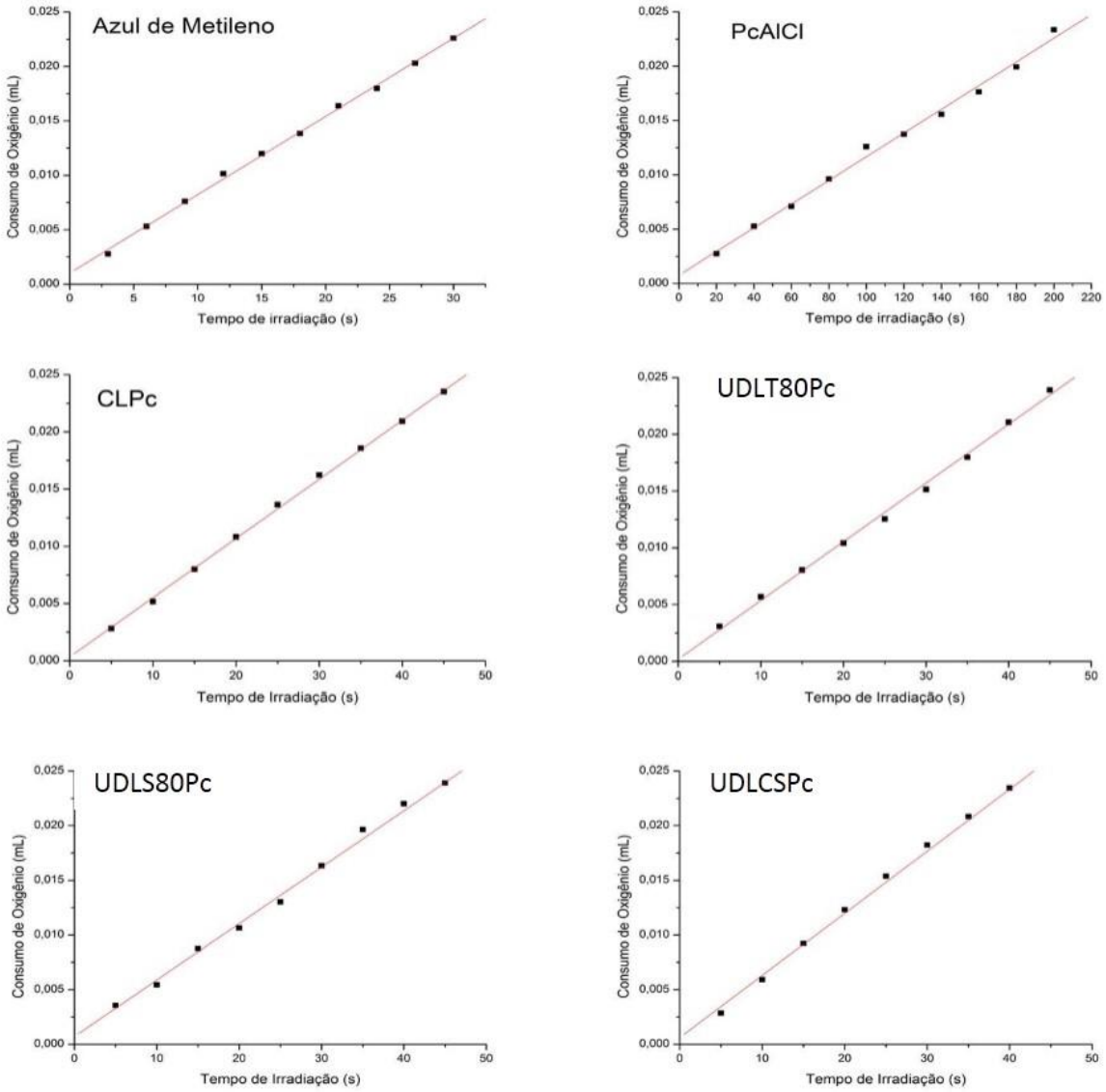


Figura 21 - Consumo de oxigênio pelo álcool furfurílico em função do tempo de irradiação. **CLPc** = Lipossoma convencional incorporado com PcAlCl; **UDLT80Pc** = Lipossoma ultradeformável com Tween 80 e incorporado com PcAlCl; **UDLS80Pc** = Lipossoma ultradeformável com Span 80 e incorporado com PcAlCl; **UDLCSPc** = Lipossoma ultradeformável com desoxicolato de sódio e incorporado com PcAlCl.

Os valores de Φ_{Δ} para os sistemas lipossomais incorporados com a PcAlCl obtidos encontram-se descritos na Tabela VII.

Tabela VII Rendimentos quânticos de oxigênio singleto (Φ_Δ) para os sistemas lipossomais.

Amostra	Φ_Δ
Azul de metileno	0,50
PcAlCl	0,11
CLPc	0,90
UDLT80Pc	0,35
UDLS80Pc	0,43
UDLCSPc	0,55

Os fármacos fotossensibilizantes disponíveis atualmente para a utilização na terapia fotodinâmica vêm mostrando alta eficiência na produção do oxigênio singleto (DINÇER et al., 2015; OGBODU e NYOKONG, 2015; OLUWOLE et al., 2016). As ftalocianinas são caracterizadas por apresentarem rendimentos quânticos próximos a 0,50 (TASTEMEL et al., 2015; VILSINSKI et al., 2015).

Os valores de rendimento quântico obtidos para as formulações lipossomais são maiores quando comparados com a PcAlCl não incorporada. Esse resultado é explicado pela baixa solubilidade da PcAlCl em meio aquoso, que pode sofrer auto agregação e ou formar dímeros, características essas que diminuem ou inativam a sua ação de fármaco fotossensibilizante oriundo da baixa formação de seu estado tripleto e consequentemente a baixa eficiência na produção do $^1O_2$ (WANG et al., 2015; ZHANG et al., 2014b).

Como observado nos espectros de absorção da PcAlCl incorporada nos sistemas lipossomais, a PcAlCl em meio aquoso apresenta-se predominantemente em seu estado monomérico, diferente de sua forma livre. As formulações de lipossoma ultradeformável apresentaram rendimento quântico de oxigênio singleto menor do que o obtido pela formulação de lipossoma convencional. A formação e o tempo de vida do $^1O_2$ são diretamente dependentes do microambiente no qual ocorre o processo difusional do $^1O_2$, que pode favorecer ou dificultar a configuração eletrônica destas

espécies transientes (DE SOUZA et al., 2016; TASTEMEL et al., 2015). Contudo, o rendimento quântico de $^1O_2$ obtido é maior mesmo que se comparado com a PcAlCl em seu estado monomérico em meio orgânico (DMSO) que apresenta rendimento de 0,23 (STAICU et al., 2013).

Os microambientes proporcionados pelos tensoativos presentes na bicamada lipídica dos lipossomas podem estar interferindo com a solvatação da PcAlCl na bicamada lipídica, resultando em um comportamento fotoquímico e fotofísico diferente do encontrado na formulação de lipossoma convencional, o que levaria a uma menor formação do seu estado tripleto e consequentemente levou a uma menor produção do oxigênio.

Considerando que o oxigênio singleto é uma das principais espécies que é responsável por desencadear uma resposta fotobiológica, podemos dizer que a incorporação da PcAlCl nos sistemas lipossomais, levou à um aumento na produção desta espécie, mostrando ser um ambiente químico favorável para sua formação, contudo a presença de tensoativos na bicamada lipídica interfere nessa formação.

4.3 Estudos envolvendo células neoplásicas

4.3.1 Toxicidade do composto fotossensível sobre a cultura celular na ausência de luz

Uma característica fundamental esperada para um fármaco fotossensibilizante aplicado à TFD é que o mesmo deve possuir um baixo nível de toxicidade na ausência da luz (CASTANO , DEMIDOVA e HAMBLIN, 2004; BECHET et al., 2008). Os experimentos com cultura de células foram iniciados pela avaliação da toxicidade do fármaco PcAlCl sobre o meio biológico, representado por células da linhagem U87MG,

na ausência de radiação. Para este objetivo, foram analisadas diferentes concentrações de: PcAlCl livre, LDEPc, CL e UDLs que nos fornece a toxicidade da formulação nas células neoplásicas.

Figura 22 mostra os resultados dos estudos *in vitro* de citotoxicidade de três lotes das formulações na ausencia da PcAlCl, utilizando a linhagem de células U87MG e B16F10 como um modelo biológico. Foram feitos 3 experimentos independentes em quaduplicata. Para analisar o possivel efeito citotóxico dos componentes da formulação dos sistemas de liberação, as formulações na ausensia da PcAlCl foram testadas na concentração de 10% do volume final do poço, para as quais não observamos um efeito de citotoxicidade significativa em relação ao controle (p<0,5). As viabilidades das células de glioblastoma (U87MG) e de melanoma (B16F10), permaneceram próximas de 100%.

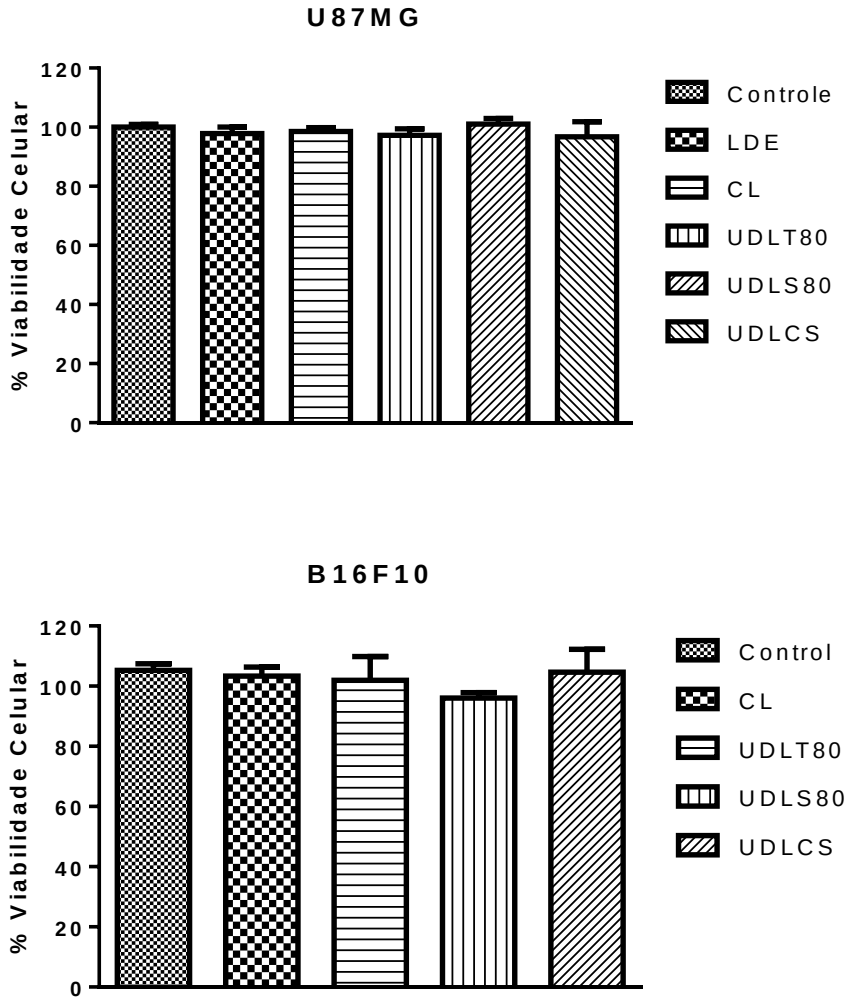


Figura 22 - Avaliação da toxicidade das formulações e na ausência da ftalocianina de cloro-aluminio em células de glioblastoma (U87MG) e melanoma (B16F10). LDE = Nanoemulsão de LDE; CL = Lipossoma concenvional; UDLT80 = Lipossoma ultradeformável com Tween 80; UDLS80 = Lipossoma ultradeformável com Span 80; UDLCS = Lipossoma ultradeformável com desoxicolato de sódio. Dados corresponde a três ensaios independentes em triplicata (n=3).

Esses resultados coraboram com os principios do emprego de sistemas de liberação, onde se espera que a formulação vazia não seja capaz de induzir efeito de citotoxicidade celular e apenas atuar como sistema de liberação.

As formulações incorporadas com PcAlCl também foram avaliadas quanto a influência da concentração do fármaco fotossensibilizante na citotoxicidade das células

U87MG e da B16F10. Não foram observadas mudanças significativas na viabilidade celular na faixa de concentração de 0,25 µM - 2,0 µM para a PcAlCl livre e incorporada nas formulações em relação ao grupo controle em ambas as linhagens celulares (*p*<0,5). A Figura 23 mostra a viavilidade celular de U87MG e B16F10 na concentração de 2,0 µM.

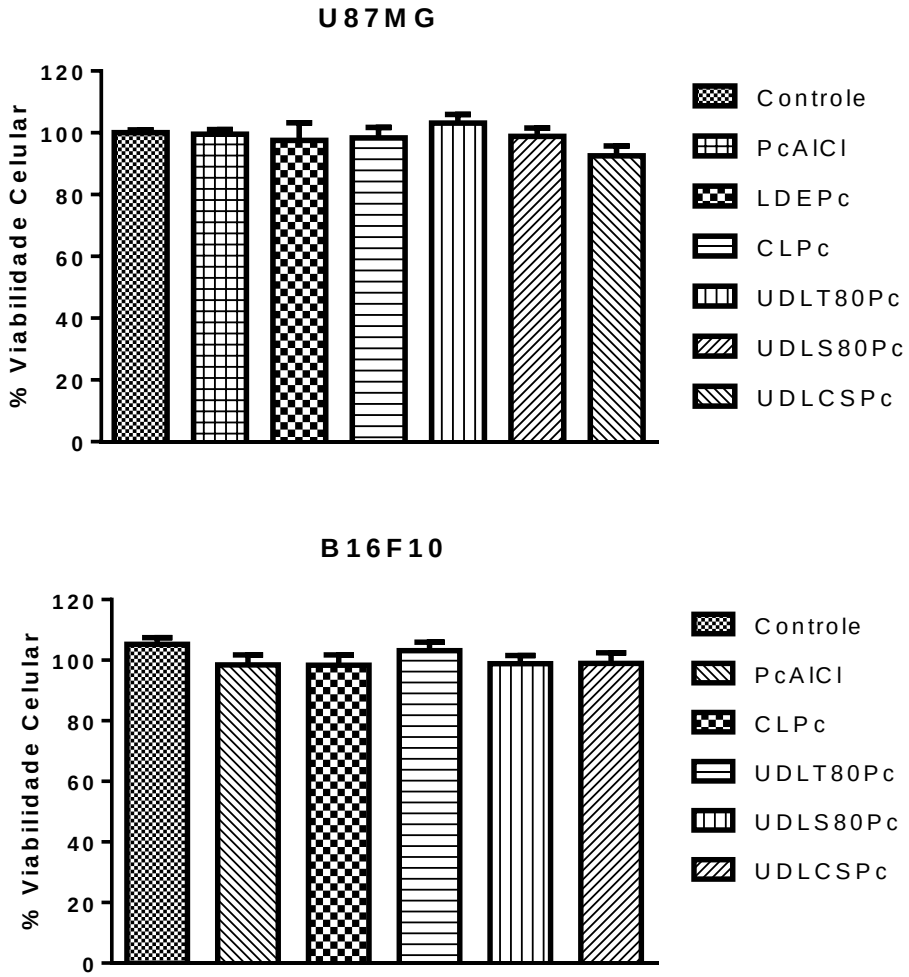


Figura 23 - Avaliação da toxicidade das formulações incorporadas com PcAlCl (2 µM) na ausência de luz em células de glioblastoma (U87MG) e melanoma (B16F10). PcAlCl = Ftalocianina de cloro-alumínio; CLPc = Lipossoma convencional incorporado com PcAlCl; UDLT80Pc = Lipossoma ultradeformável com Tween 80 e incorporado com PcAlCl; UDLS80Pc = Lipossoma ultradeformável com Span 80 e incorporado com PcAlCl; UDLCSPc = Lipossoma ultradeformável com desoxicolato de sódio e incorporado com PcAlCl; LDEPc = Nanoemulsão de LDE incorporada com PcAlCl. Dados corresponde a três ensaios independentes em triplicata (n=3).

Esses resultados mostram que as formulaçãoes desenvolvidas não apresentaram efeito na diminuição da viabilidade celular na ausensia de luz permitindo a continuidade dos próximos estudos na presença da irradiação com laser. Para os testes de fototoxicidade foi escolhida a concentração de 1 µM das formulaçãos

4.3.2 Estudos de Fototoxicidade

A determinação do efeito fototóxicos foi obtida de forma direta em monocamada celular da linhagem de glioblastoma U87MG e de melanoma B16F10. Para este objetivo, foram analisadas as concentrações de 1 µM de PcAlCl livre e incorporada nas formulações sob a fluência de energia que variou de 0,1 J/cm^2 – 1 J/cm^2, que nos fornece a fototoxicidade da formulação nas células neoplásicas.

Os dados de fototoxicidade na linhagem U87MG são mostrados na Figura 24. Foi possível observar que quando as células são irradiadas sem a presença da PcAlCl (grupo Laser) não há mudanças significativas na viabilidade celular (p<0,001). Esse resultado é um importante parâmetro para a TFD onde se espera que somente a combinação da luz com o fármaco fotossensível tenha efeito de diminuir a viabilidade celular.

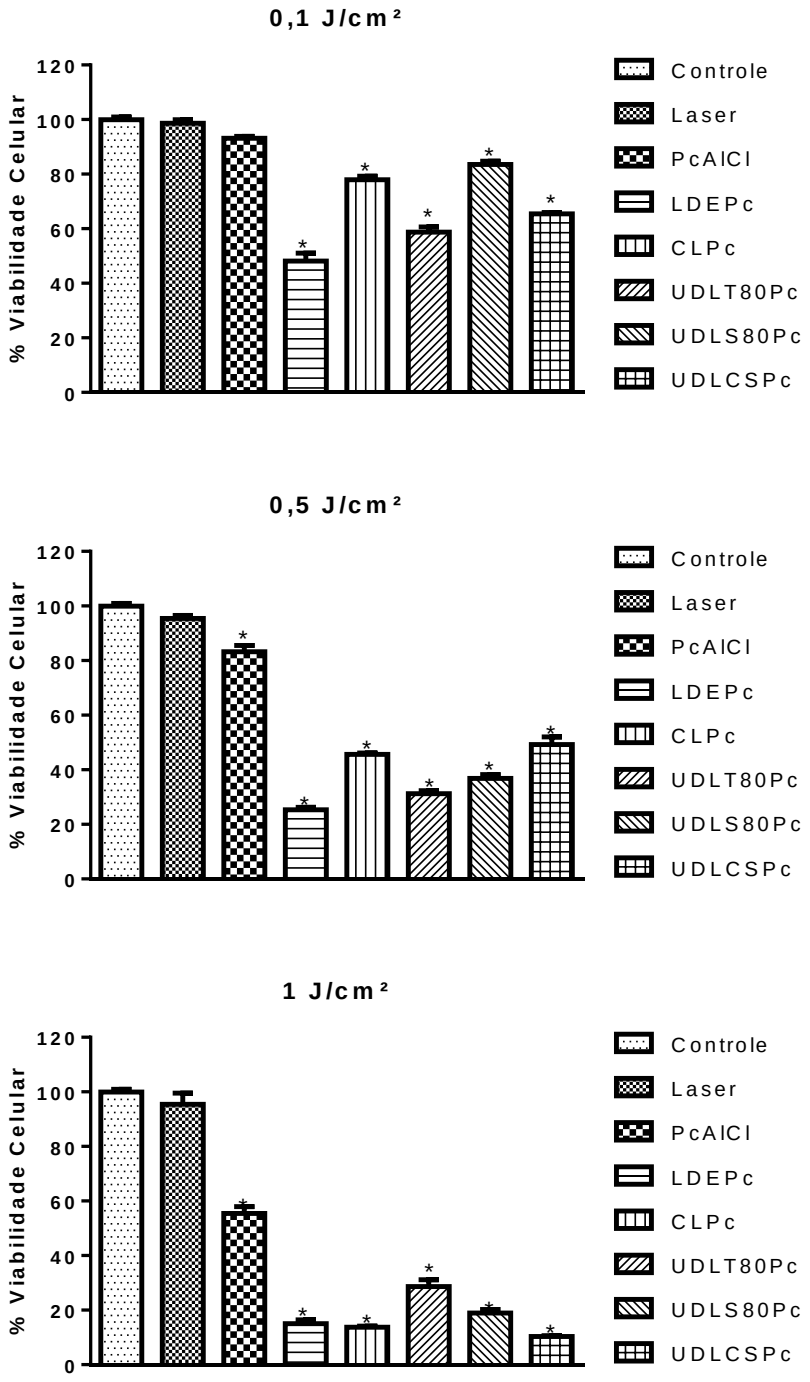


Figura 24 - a Viabilidade celular das células de glioblastoma da linhagem U87MG determinado por ensaio de MTT após 24 h da TFD com a PcAlCl e PcAlCl incorporada nas formulações. PcAlCl = Ftalocianina de cloro-alumínio; CLPc = Lipossoma convencional incorporado com PcAlCl; UDLT80Pc = Lipossoma ultradeformável com Tween 80 e incorporado com PcAlCl; UDLS80Pc = Lipossoma ultradeformável com Span 80 e incorporado com PcAlCl; UDLCSPc = Lipossoma ultradeformável com desoxicolato de sódio e incorporado com PcAlCl; LDEPc = Nanoemulsão de LDE incorporada com PcAlCl. Analise da variância (ANOVA) mostrou diferenças significativas entre as concentrações ($p<0.01$*) em relação ao grupo controle. Dados são expressos em medias ± desvio padrão (*$n=3$*).*

Quando as células foram incubadas com PcAlCl na concentração de 1 µM seguida da irradiação com diferentes fluências de energia, foi observada uma diminuição significativa da viabilidade celular de maneira dose-luz dependente para $p<0,01$ em relação ao grupo controle. Na fluência de 0,1 J/cm² a viabilidade celular diminuiu para 93% seguida de sucessiva diminuição até a fluência máxima de 1 J/cm² que diminuir a viabilidade para 55%.

Quando as células foram incubadas com LDEPc também na concentração de 1 µM seguida de irradiação, o efeito dose de luz dependente também foi observado, conseguindo diminuir de maneira significativa a viabilidade celular para $p<0,5$. Foi observado que em todas as fluências de energia estudadas o efeito da PcAlCl incorporada em LDE foi maior em comparação com a PcAlCl livre.

Na fluência de 0,1 J/cm² a viabilidade celular diminuiu para 48% seguida de sucessiva diminuição até a fluência máxima de 1 J/cm² que diminuiu a viabilidade para 15%. Os resultados encontrados mostraram um aumento de 68% da atividade da PcAlCl em comparação a sua forma livre frente a linhagem celular de glioblastoma U87MG.

CONTENTE et al., (2014) obteve resultados similares utilizando o fármaco antitumoral N-oleil-daunorubicina (oDNR) incorporado em nanoemulsão de LDE frente células da linhagem de melanoma murino (B16F10). O resultados mostraram um aumento da atividade antitumoral do oDNR quando incorporado em LDE, o que foi atribuido a uma maior internalização do fármaco pelas células.

Nas fluências de energia de 0,1 e 0,5 J/cm² a formulação de LDEPc obteve uma maior ação fotodinâmica do que a formulação de CL e UDLs. Esse resultado corrobora com o princípio de que o LDE tem a capacidade de entrar na célula por

intermédio de um receptor (rLDL), que é uma via mais eficiente do que a apresentada pelos sistemas lipossomais que permeiam a célula por endocitose e/ou por fusão de lipídios da formulação com a da membrana da célula (POZZI et al., 2015; ZHANG et al., 2016).

Quando as células foram também incubadas com as formulações de UDLs na concentração de 1 μM após a irradiação, um efeito de dose de luz dependente foi observado. As formulações foram capazes de reduzir significativamente a viabilidade celular para $p < 0,001$. Também foi observado que em todas as doses de energia o efeito de PcAlCl incorporado em sistemas lipossomais foi superior ao PcAlCl livre. Entretanto obteve um efeito menor se comparado as formulações de LDEPc e CLPc nas fluências de 0,1 J/cm² e 0,5 J/cm², com exceção da formulação UT80Pc que nessas fluências de energia obteve uma atividade fotodinâmica maior ($p<0,01$).

A uma fluência de 0,1 J/cm² a viabilidade celular diminui para 78%, 58,7%, 83,5% e 65% seguido de diminuição sucessiva na viabilidade onde na fluência máxima de 1 J/cm² a viabilidade diminuiu para 14%, 28%, 19% e 10% para as formulações de CL, UT80Pc, US80Pc e UCSPc, respectivamente. Os resultados mostraram um aumento de cerca de 80% na atividade fotodinâmica em comparação com PcAlCl em sua forma livre na linha de células de glioblastoma U87MG. Na fluência de 1 J/cm² não foram observadas diferenças estatisticamente significativas p ($<0,001$) entre as formulações CL, US80Pc e UCSPc.

Essa resposta frente à atividade fotodinâmica observada, corrobora resultados obtidos de rendimento quântico de oxigênio singleto, onde a as formulações que obtiveram um maior rendimento quântico de oxigênio singleto, obtiveram uma maior atividade fotodinâmica frente a linhagem celular de glioblastoma U87MG.

O ensaio de fototoxicidade em células B16-F10 avaliou a ação fotodinâmica sobre células de melanoma pigmentadas e também correlacionou tal efeito entre a PcAlCl livre e incorporada nos sistemas lipossomais (Figura 25).

Ao analisar a Figura 25 percebe-se claramente uma diminuição gradativa da viabilidade celular em função do aumento da dose de energia aplicada para todas as formulações estudadas. Entretanto, quando as células foram irradiadas na ausência do fármaco fotossensibilizante não foi observado mudanças na viabilidade celular.

Na menor dose de luz utilizada (0,1 J/cm²), a viabilidade celular foi de apenas 52%, 75%, 58%, 63% e 55% para a PcAlCl livre e para as formulações de CL, UT80Pc, US80Pc e UCSPc, respectivamente. Curiosamente, a PcAlCl nessa fluência de energia apresentou uma maior ação fotodinâmica em relação aos sistemas lipossomais. Contudo, o efeito não se acentua muito na fluência de 0,5 J/cm² e 1 J/cm². Na maior dose de irradiação aplicada (1 J/cm²), as formulações mostraram uma alta atividade fotodinâmica, diminuindo a viabilidade celular para 27%, 22%, 10%, 29%, 4% para a PcAlCl livre e para as formulações de CL, UT80Pc, US80Pc e UCSPc, respectivamente.

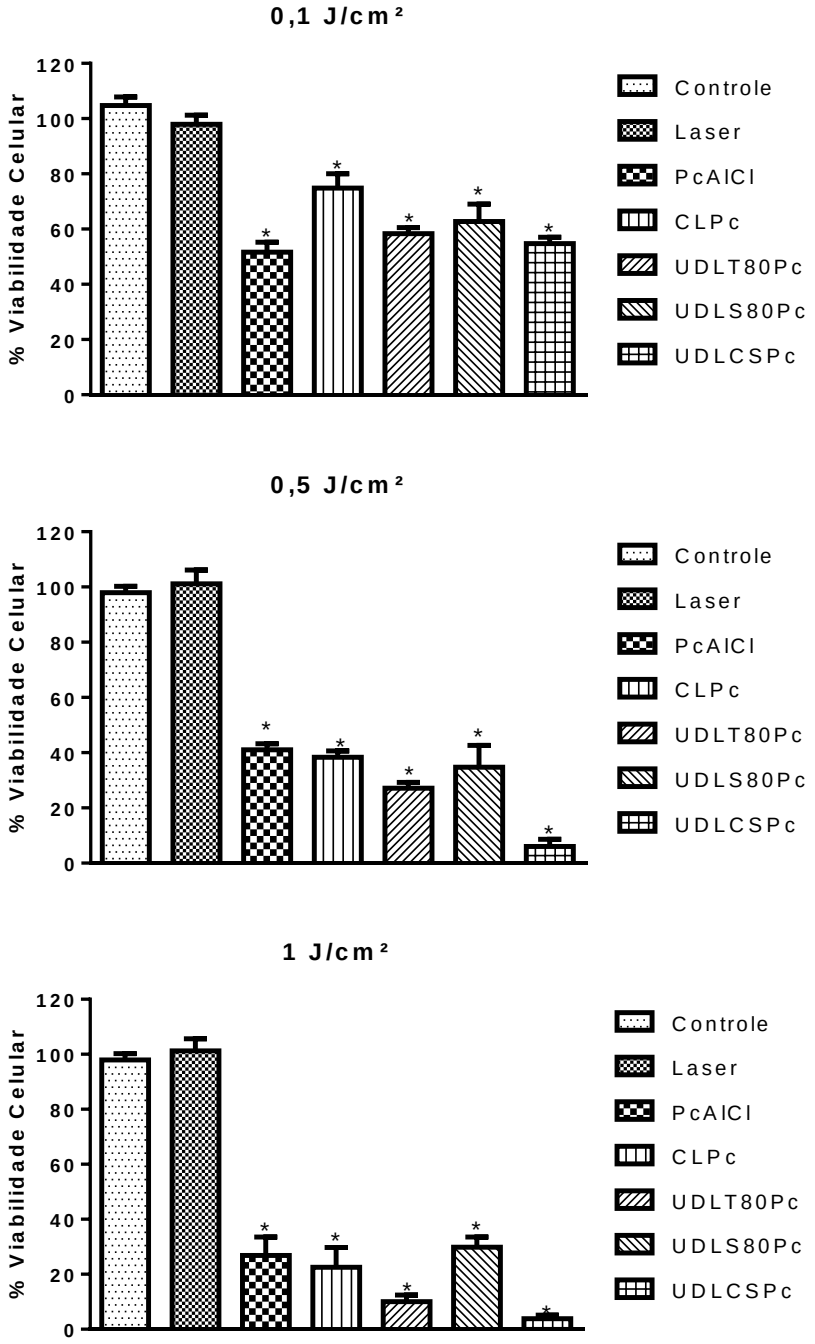


Figura 25 - a Viabilidade celular das células de melanoma da linhagem B16F10 determinado por ensaio de MTT após 24 h da TFD com a PcAlCl e PcAlCl incorporada nas formulações. PcAlCl = Ftalocianina de cloro-alumínio; CLPc = Lipossoma convencional incorporado com PcAlCl; UDLT80Pc = Lipossoma ultradeformável com Tween 80 e incorporado com PcAlCl; UDLS80Pc = Lipossoma ultradeformável com Span 80 e incorporado com PcAlCl; UDLCSPc = Lipossoma ultradeformável com desoxicolato de sódio e incorporado com PcAlCl; LDEPc = Nanoemulsão de LDE incorporada com PcAlCl. Analise da variância (ANOVA) mostrou diferenças significativas entre as concentrações ($p<0.01$*) em relação ao grupo controle. Dados são expressos em medias ± desvio padrão (*$n=3$*).*

A ação fotodinâmica das formulações lipossomais aumentou na seguinte ordem: US80Pc<CL<UT80Pc<UCSPc. Essa diferença na atividade fotodinâmica pode estar associada ao tamanho de partícula das formulações, onde a formulação que apresentou um menor tamanho (USCPc), apresentou maior ação fotodinâmica e a que apresentou maior tamanho de partícula (US80Pc), obteve uma resposta menor do que se comparada com as demais formulações.

Os resultados mostrados pelos sistemas lipossomais corroboram com os dados encontrados por KOLAROVA; TOMANKOVA e KOLAR, (2008) e KOLAROVA et al., (2009) que avaliaram a influência de várias concentrações utilizando uma ftalocianina hidrofílica (Ftalocianina de cloroalumínio dissulfonada, $ClAlPcS_2$) sobre células de melanoma humano (G361). Este estudo demonstrou que o efeito fototóxico máximo foi obtido utilizando 9 μM de $ClAlPcS_2$ em combinação com a dose de energia de 25 J/cm^2. Entretanto, no presente trabalho, de acordo com a linhagem celular estudada, o máximo efeito fototóxico foi obtido com 1 J/cm^{-2} combinado com 1 μM de PcAlCl incorporada. Portanto, um efeito fotocitotóxico similar foi alcançado com uma dose de luz laser 25 vezes menor e uma concentração de fármaco 9 vezes menor. Tais resultados podem ser explicados pela excelente interação entre os sistemas lipossomais e as células, a qual favorece uma maior captação pelas células tumorais comparado com compostos não veiculados (AHMAD et al., 2016; GOLKAR , TAMADDON e SAMANI, 2016; PRZYBYLO et al., 2016)

Esses resultados mostram que ao incorporar a PcAlCl nos sistemas de liberação estudados, aumenta o efeito fotodinâmico da PcAlCl, o que corrobora com a premissa de que os sistemas de liberação podem aumentar o efeito do fármaco fotossensibilizante por promover uma maior internalização do fármaco pelas células.

4.3.3 Determinação do mecanismo de morte celular

As células foram incubadas com os marcadores de apoptose (anexina V) e necrose (7–AAD) por 24 h após a TFD a fim de definir o mecanismo de morte celular pelo qual a TFD induziu. A Figura 26 revela que, de acordo com os dados obtidos, a irradiação com laser não tem a capacidade de induzir morte da célula sob as condições estudadas; enquanto o tratamento TFD (0,5 J / cm²) com PcAlCl livre, CLPc, UDLCSPc e LDEPc (1 μM) exibiu claramente um efeito retardado (24 h), onde a apoptose (anexina V positiva: 13,8%, 59,1 %, 66,1% e 58, % $p < 0,05$, respectivamente) foi vista como a via principal de morte. Esses resultados corroboram com os encontrados anteriormente (JIANG et al., 2014; LI et al., 2014a; LI et al., 2014b; ZHANG et al., 2014a; SILVA et al., 2014).

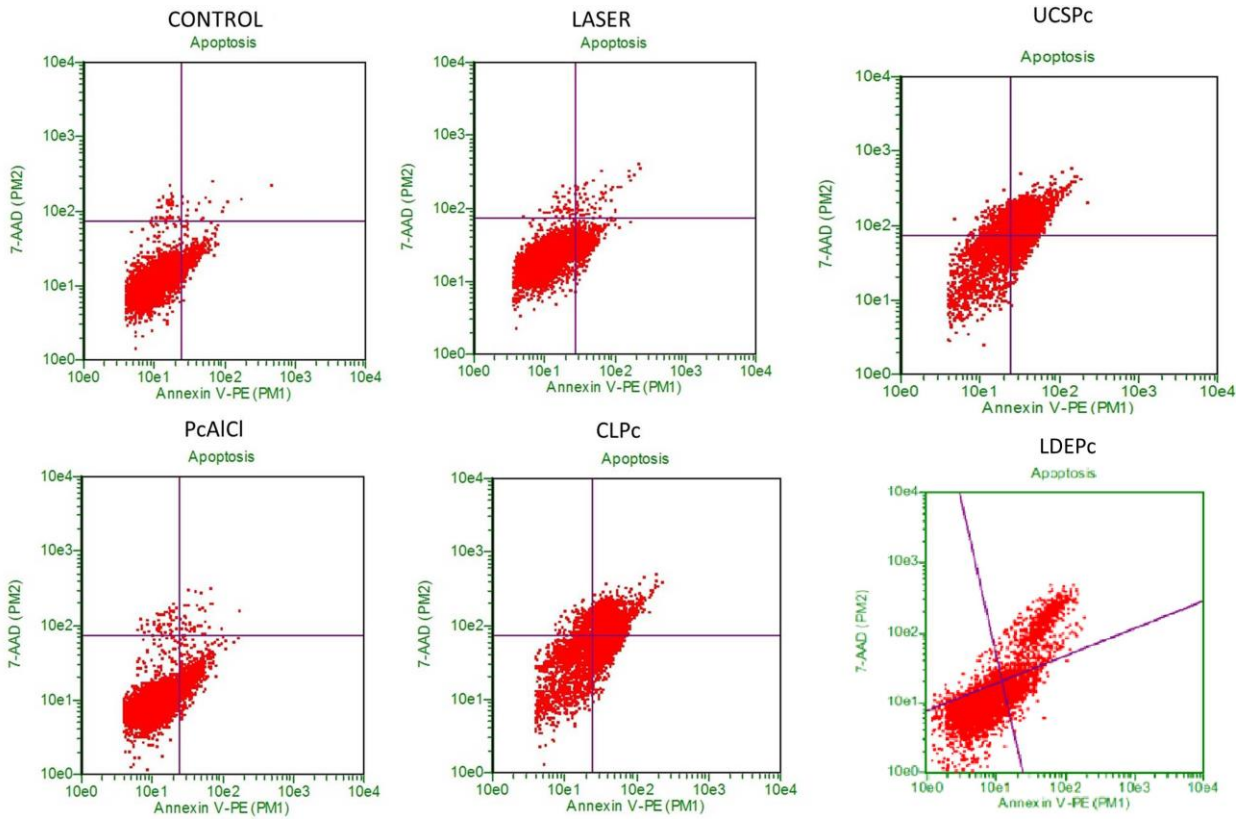


Figura 26 - Gráficos representativos de apoptose e necrose de células U87MG incubadas com annexin V-PE e 7-AAD após 24 h da Terapia Fotodinâmica.

5. Conclusão

As formulações apresentaram características desejáveis como reprodutibilidade, tamanho de partícula, estabilidade em curto e longo prazo e deformidade adequados para a utilização como meio de veiculação da PcAlCl. Obteve-se uma formulação com propriedades físico-químicas de acordo com o exigido pelos princípios da tecnologia farmacêutica e conforme proposto nos objetivos do projeto de tese, possuindo propriedades nanotecnológicas, alta compatibilidade biológica e eficiência adequada de incorporação de fármaco.

Pela análise dos estudos fotofísicos de rendimento quântico de fluorescência (Φ_F), tempo de vida de fluorescência (τ) e rendimento quântico de oxigênio singleto (Φ_Δ) da PcAlCl em etanol e incorporada nas formulações, pode-se observar que a incorporação a um veículo de liberação melhorou as características da PcAlCl que propicia sua utilização em ensaios *in vitro* e testes fotobiológicos.

A presença dos tensoativos nas formulações de lipossoma ultradeformáveis alteraram as características fotofísicas e fotobiológicas da PcAlCl melhorando suas propriedades em comparação a formulação de lipossoma convencional.

Os experimentos com cultura de célula nos forneceram dados com relação à toxicidade das formulações em estudo, e nenhum dos sistemas apresentou citotoxicidade na ausência de luz, sendo está uma característica importante, já que os sistemas só podem apresentar ação na presença da luz. Contudo, as formulações apresentaram um aumento da atividade fotodinâmica da PcAlCl em relação à PcAlCl livre, o que corrobora com o emprego de sistemas de liberação para o aumento da atividade fotodinâmica da PcAlCl.

6.Referências Bibliográficas

ABBOTT, N. J.; PATABENDIGE, A. A. K.; DOLMAN, D. E. M.; YUSOF, S. R.; BEGLEY, D. J. Structure and function of the blood-brain barrier, ***Neurobiology of Disease***, v. 37, p. 13-25, 2010.

ABBOTT, N. J.; RONNBACK, L.; HANSSON, E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier, ***Nat Rev Neurosci***, v. 7, p. 41-53, 2006.

AGGARWAL, N.; GOINDI, S. Preparation and evaluation of antifungal efficacy of griseofulvin loaded deformable membrane vesicles in optimized guinea pig model of Microsporum canis-Dermatophytosis, ***International Journal of Pharmaceutics***, v. 437, p. 277-287, 2012.

AGRAWAL, U.; GUPTA, M.; VYAS, S. P. Vesicular Carriers for Transcutaneous Immunization. In: DRAGICEVIC, N., MAIBACH, H. **Percutaneous Penetration Enhancers: Chemical Methods in Penetration Enhancement**. 2016. Capítulo 21, p. 319-333.

AHMAD, M. Z.; ALKAHTANI, S. A.; AKHTER, S.; AHMAD, F. J.; AHMAD, J.; AKHTAR, M. S.; MOHSIN, N.; ABDEL-WAHAB, B. A. Progress in nanotechnology-based drug carrier in designing of curcumin nanomedicines for cancer therapy: current state-of-the-art, ***Journal of Drug Targeting***, v. 24, p. 273-293, 2016.

AKILOV, O. E.; KOSAKA, S.; O'RIORDAN, K.; HASAN, T. Photodynamic therapy for cutaneous leishmaniasis: the effectiveness of topical phenothiaziniums in parasite

eradication and Th1 immune response stimulation, ***Photochemical & Photobiological Sciences***, v. 6, p. 1067-1075, 2007.

ALANAZI, F. K.; HAQ, N.; RADWAN, A. A.; ALSARRA, I. A.; SHAKEEL, F. Formulation and evaluation of cholesterol-rich nanoemulsion (LDE) for drug delivery potential of cholesteryl-maleoyl-5-fluorouracil, ***Pharmaceutical Development and Technology***, v. 20, p. 266-270, 2015.

ALGAZI, A. P.; SOON, C. W.; DAUD, A. I. Treatment of cutaneous melanoma: current approaches and future prospects, ***Cancer management and research***, v. 2, p. 197-211, 2010.

ALLEN, T. M.; CULLIS, P. R. Liposomal drug delivery systems: From concept to clinical applications, ***Advanced Drug Delivery Reviews***, v. 65, p. 36-48, 2013.

ALLISON, R. R.; MOGHISSI, K. Photodynamic Therapy (PDT): PDT Mechanisms, ***Clinical Endoscopy***, v. 46, p. 24-29, 2013.

ALOMRANI, A. H.; SHAZLY, G. A.; IMARA, A. A.; BADRAN, M. M. Itraconazole-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin loaded deformable liposomes: In vitro skin penetration studies and antifungal efficacy using Candida albicans as model, ***Colloids and Surfaces B-Biointerfaces***, v. 121, p. 74-81, 2014.

AMAR-LEWIS, E.; AZAGURY, A.; RAMESH, C.; GOLDBART, R.; TRAITEL, T.; PRESTWOOD, J.; LANDESMAN-MILO, D.; PEER, D.; KOST, J. Quaternized starch-based carrier for siRNA delivery: From cellular uptake to gene silencing, ***Journal of Controlled Release*** 2014.

ANDRADE, B.; SONG, Z. Y.; LI, J.; ZIMMERMAN, S. C.; CHENG, J. J.; MOORE, J. S.; HARRIS, K.; KATZ, J. S. New Frontiers for Encapsulation in the Chemical Industry, ***Acs Applied Materials & Interfaces***, v. 7, p. 6359-6368, 2015.

ANSELMO, A. C.; MITRAGOTRI, S. Impact of particle elasticity on particle-based drug delivery systems, ***Advanced Drug Delivery Reviews*** 2016.

ARIAS, J. L.; CLARES, B.; MORALES, M. E.; GALLARDO, V.; RUIZ, M. A. Lipid-Based Drug Delivery Systems for Cancer Treatment, ***Current Drug Targets***, v. 12, p. 1151-1165, 2011.

ASCENSO, A.; RAPOSO, S.; BATISTA, C.; CARDOSO, P.; MENDES, T.; PRACA, F. G.; BENTLEY, M. V. L. B.; SIMOES, S. Development, characterization, and skin delivery studies of related ultradeformable vesicles: transfersomes, ethosomes, and transethosomes, ***International Journal of Nanomedicine***, v. 10, p. 5837-5851, 2015.

BAPTISTA, M. S.; WAINWRIGHT, M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT) for the treatment of malaria, leishmaniasis and trypanosomiasis, ***Brazilian Journal of Medical and Biological Research***, v. 44, p. 1-10, 2011.

BARBUGLI, P. A.; SIQUEIRA-MOURA, M. P.; ESPREAFICO, E. M.; TEDESCO, A. C. In Vitro Phototoxicity of Liposomes and Nanocapsules Containing Chloroaluminum Phthalocyanine on Human Melanoma Cell Line, ***Journal of Nanoscience and Nanotechnology***, v. 10, p. 569-573, 2010.

BATISTA, C. M.; CARVALHO, C. M. B.; MAGALHAES, N. S. S. Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: estado da arte, ***Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas***, v. 43, p. 167-179, 2007.

BAUMANN, N.; PHAM-DINH, D. Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system, ***Physiological Reviews***, v. 81, p. 871-927, 2001.

BEAUCHESNE, P.; QUILLIEN, V.; FAURE, G.; BERNIER, V.; NOEL, G.; QUETIN, P.; GORLIA, T.; CARNIN, C.; PEDEUX, R. A concurrent ultra-fractionated radiation therapy and temozolomide treatment: A promising therapy for newly diagnosed, inoperable glioblastoma, ***International Journal of Cancer***, v. 138, p. 1538-1544, 2016.

BECHET, D.; MORDON, S. R.; GUILLEMIN, F.; BARBERI-HEYOB, M. A. Photodynamic therapy of malignant brain tumours: A complementary approach to conventional therapies, ***Cancer Treatment Reviews***, v. 40, p. 229-241, 2014.

BECHET, D.; COULEAUD, P.; FROCHOT, C.; VIRIOT, M. L.; GUILLEMIN, F.; BARBERI-HEYOB, M. Nanoparticles as vehicles for delivery of photodynamic therapy agents, ***Trends in Biotechnology***, v. 26, p. 612-621, 2008.

BISWAS, T. Simulation Of Contrast Enhancement Of Various Brain Lesions (Without Iv Gadolinium) By Using The Neural Network. **The Internet Journal of Radiology** , v.14, n.1, p.1-12, 2012.

BOLFARINI, G. C.; SIQUEIRA-MOURA, M. P.; DEMETS, G. J. F.; TEDESCO, A. C. Preparation, characterization, and in-ávitro phototoxic effect of zinc phthalocyanine cucurbit[7]uril complex encapsulated into liposomes, ***Dyes and Pigments***, v. 100, p. 162-167, 2014.

BOVIS, M. J.; WOODHAMS, J. H.; LOIZIDOU, M.; SCHEGLMANN, D.; BOWN, S. G.; MACROBERT, A. J. Improved in vivo delivery of m-THPC via pegylated liposomes for use in photodynamic therapy, ***Journal of Controlled Release***, v. 157, p. 196-205, 2012.

CADDEO, C.; MANCONI, M.; SINICO, C.; VALENTI, D.; CELIA, C.; MONDUZZI, M.; FADDA, A. M. Penetration Enhancer-Containing Vesicles: Does the Penetration Enhancer Structure Affect Topical Drug Delivery?, ***Current Drug Targets***, v. 16, p. 1438-1447, 2015.

ÇAKIR, D.; GOKSEL, M.; ÇAKIR, V.; DURMUS, M.; BIYIKLIOGLU, Z.; KANTEKIN, H. Amphiphilic zinc phthalocyanine photosensitizers: synthesis, photophysicochemical properties and in vitro studies for photodynamic therapy, ***Dalton Transactions***, v. 44, p. 9646-9658, 2015.

CALIXTO, G. M. F.; BERNEGOSSI, J.; DE FREITAS, L. M.; FONTANA, C. R.; CHORILLI, M. Nanotechnology-Based Drug Delivery Systems for Photodynamic Therapy of Cancer: A Review, ***Molecules***, v. 21, p. 342-360, 2016.

CAMUR, M.; AHSEN, V.; DURMUS, M. The first comparison of photophysical and photochemical properties of non-ionic, ionic and zwitterionic gallium (III) and

indium (III) phthalocyanines, ***Journal of Photochemistry and Photobiology A-Chemistry***, v. 219, p. 217-227, 2011.

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

CENGEL, K. Adapting Preclinical Concepts for Use in Clinical Trials of Serosal and Interstitial Photodynamic Therapy, ***Journal of the National Comprehensive Cancer Network***, v. 10, p. S18-S22, 2012.

CEVC, G.; BLUME, G. Lipid Vesicles Penetrate Into Intact Skin Owing to the Transdermal Osmotic Gradients and Hydration Force, ***Biochimica et Biophysica Acta***, v. 1104, p. 226-232, 1992.

CEYLAN, N.; GUMURKCU, G.; KARAOGLAN, G. K.; GUL, A. Synthesis, characterization, fluorescence spectra and energy transfer properties of a novel unsymmetrical zinc phthalocyanine with peripherally coordinated Ru(II) complex, ***Synthetic Metals***, v. 206, p. 55-60, 2015.

CHEN, W. J.; CUI, H. X.; ZHAO, X.; CUI, J. H.; WANG, Y.; SUN, C. J.; CUI, B.; LEI, F. Characterization and Insights Into the Nano Liposomal Magnetic Gene Vector Used for Cell Co-Transfection, ***Journal of Nanoscience and Nanotechnology***, v. 15, p. 5530-5536, 2015a.

CHEN, X. Q.; GREGOIRE, S.; FORMANEK, F.; GALEY, J. B.; RIGNEAULT, H. Quantitative 3D molecular cutaneous absorption in human skin using label free nonlinear microscopy, ***Journal of Controlled Release***, v. 200, p. 78-86, 2015b.

CHEN, X.; WANG, F.; HYUN, J. Y.; WEI, T.; QIANG, J.; REN, X.; SHIN, I.; YOON, J. Recent progress in the development of fluorescent, luminescent and colorimetric probes for detection of reactive oxygen and nitrogen species, ***Chemical Society Reviews***, v. 45, p. 2976-3016, 2016.

CHIU, H. T.; YANG, H. M.; LIU, C. S.; HSU, H. Y. Synthesis, Stability and Properties of Polyurethane/Acrylic Hybrids Using m-TMXDI-based Anionic Poly(urethane-urea) Dispersion, ***Polymer-Plastics Technology and Engineering***, v. 51, p. 943-951, 2012.

CLEMENT, S. et al. X-ray induced singlet oxygen generation by nanoparticle-photosensitizer conjugates for photodynamic therapy: determination of singlet oxygen quantum yield. **SCIENTIFIC REPORTS** , v.6, n.p.1215-25, 2016.

CONTENTE, T. C.; KRETZER, I. F.; FILIPPIN-MONTEIRO, F. B.; MARIA, D. A.; MARANHAO, R. C. Association of daunorubicin to a lipid nanoemulsion that binds to low-density lipoprotein receptors enhances the antitumour action and decreases the toxicity of the drug in melanoma-bearing mice, ***Journal of Pharmacy and Pharmacology***, v. 66, p. 1698-1709, 2014.

COUVREUR, P.; BARRATT, G.; FATTAL, E.; LEGRAND, P.; VAUTHIER, C. Nanocapsule technology: A review, ***Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems***, v. 19, p. 99-134, 2002.

DÀBROWSKA, A. K.; ROTARU, G. M.; DERLER, S.; SPANO, F.; CAMENZIND, M.; ANNAHEIM, S.; ST+ÑMPFLI, R.; SCHMID, M.; ROSSI, R. M. Materials used to simulate physical properties of human skin, ***Skin Research and Technology***, v. 22, p. 3-14, 2016.

DE ASSIS, D. N.; MOSQUEIRA, V. C. F.; VILELA, J. M. C.; ANDRADE, M. S.; CARDOSO, V. N. Release profiles and morphological characterization by atomic force microscopy and photon correlation spectroscopy of (99m)Technetium-fluconazole nanocapsules, ***International Journal of Pharmaceutics***, v. 349, p. 152-160, 2008.

DE PAULA, C. S.; TEDESCO, A. C.; PRIMO, F. L.; VILELA, J. M. C.; ANDRADE, M. S.; MOSQUEIRA, V. C. F. Chloroaluminium phthalocyanine polymeric nanoparticles as photosensitisers: Photophysical and physicochemical characterisation, release and phototoxicity in vitro, ***European Journal of Pharmaceutical Sciences***, v. 49, p. 371-381, 2013.

DE PAULA, L. B.; PRIMO, F. L.; PINTO, M. R.; MORAIS, P. C.; TEDESCO, A. C. Combination of hyperthermia and photodynamic therapy on mesenchymal stem cell line treated with chloroaluminum phthalocyanine magnetic-nanoemulsion, ***Journal of Magnetism and Magnetic Materials***, v. 380, p. 372-376, 2015.

DE SOUZA, T. D.; ZIEMBOWICZ, F. I.; M++LLER, D. F.; LAUERMANN, S. C.; KLOSTER, C. L.; SANTOS, R. C. V.; LOPES, L. Q. S.; OURIQUE, A. F.; MACHADO, G.; VILLETTI, M. A. Evaluation of photodynamic activity, photostability and in vitro drug release of zinc phthalocyanine-loaded nanocapsules, ***European Journal of Pharmaceutical Sciences***, v. 83, p. 88-98, 2016.

DERYCKE, A. S. L.; KAMUHABWA, A.; GIJSENS, A.; ROSKAMS, T.; DE VOS, D.; KASRAN, A.; HUWYLER, J. +.; MISSIAEN, L.; DE WITTE, P. A. M. Transferrin-Conjugated Liposome Targeting of Photosensitizer AlPcS4 to Rat Bladder Carcinoma Cells, ***Journal of the National Cancer Institute***, v. 96, p. 1620-1630, 2004.

DESAI, P.; PATLOLLA, R. R.; SINGH, M. Interaction of nanoparticles and cell-penetrating peptides with skin for transdermal drug delivery, ***Molecular Membrane Biology***, v. 27, p. 247-259, 2010.

DESMET, E.; BRACKE, S.; FORIER, K.; TAEVERNIER, L.; STUART, M. C. A.; DE SPIEGELEER, B.; RAEMDONCK, K.; VAN GELE, M.; LAMBERT, J. An elastic liposomal formulation for RNAi-based topical treatment of skin disorders: Proof-of-concept in the treatment of psoriasis, ***International Journal of Pharmaceutics***, v. 500, p. 268-274, 2016.

DETLOFF, T.; SOBISCH, T.; LERCHE, D. Particle size distribution by space or time dependent extinction profiles obtained by analytical centrifugation, ***Particle & Particle Systems Characterization***, v. 23, p. 184-187, 2006.

DHERMAIN, F. G.; HAU, P.; LANFERMANN, H.; JACOBS, A. H.; VAN DEN BENT, M. J. Advanced MRI and PET imaging for assessment of treatment response in patientswith gliomas, ***Lancet Neurology***, v. 9, p. 906-920, 2010.

DIAS, M. L. N.; CARVALHO, J. P.; RODRIGUES, D. G.; GRAZIANI, S. R.; MARANHAO, R. C. Pharmacokinetics and tumor uptake of a derivatized form of paclitaxel associated to a cholesterol-rich nanoemulsion (LDE) in patients with gynecologic cancers, ***Cancer Chemotherapy and Pharmacology***, v. 59, p. 105-111, 2007.

DINÇER, H.; MERT, H.; +ÇAL-¦+¦KAN, E.; ATMACA, G. Y. a.; ERDO-¦MU+¦, A. Synthesis and photophysicochemical studies of poly(ethylene glycol) conjugated symmetrical and asymmetrical zinc phthalocyanines, ***Journal of Molecular Structure***, v. 1102, p. 190-196, 2015.

DIXIT, S.; MILLER, K.; ZHU, Y.; MCKINNON, E.; NOVAK, T.; KENNEY, M. E.; BROOME, A. M. Dual Receptor-Targeted Theranostic Nanoparticles for Localized Delivery and Activation of Photodynamic Therapy Drug in Glioblastomas, ***Molecular Pharmaceutics***, v. 12, p. 3250-3260, 2015.

DOS SANTOS, F. K.; OYAFUSO, M. H.; KIILL, C. P.; DAFLON-GREMIAO, M. P.; CHORILLI, M. Nanotechnology-Based Drug Delivery Systems for Treatment of Hyperproliferative Skin Diseases - A Review, ***Current Nanoscience***, v. 9, p. 159-167, 2013.

DRAGICEVIC-CURIC, N.; GRAFE, S.; ALBRECHT, V.; FAHR, A. Topical application of temoporfin-loaded invasomes for photodynamic therapy of subcutaneously

implanted tumours in mice: A pilot study, ***Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology***, v. 91, p. 41-50, 2008.

DRAGICEVIC-CURIC, N.; GRAFE, S.; GITTER, B.; FAHR, A. Efficacy of temoporfin-loaded invasomes in the photodynamic therapy in human epidermoid and colorectal tumour cell lines, ***Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology***, v. 101, p. 238-250, 2010.

DUANGJIT, S.; OBATA, Y.; SANO, H.; KIKUCHI, S.; ONUKI, Y.; OPANASOPIT, P.; NGAWHIRUNPAT, T.; MAITANI, Y.; TAKAYAMA, K. Menthosomes, Novel Ultradeformable Vesicles for Transdermal Drug Delivery: Optimization and Characterization, ***Biological & Pharmaceutical Bulletin***, v. 35, p. 1720-1728, 2012.

DURANTINI, A. s. M.; GREENE, L. E.; LINCOLN, R.; MART+¡NEZ, S. R.; COSA, G. Reactive Oxygen Species Mediated Activation of a Dormant Singlet Oxygen Photosensitizer: From Autocatalytic Singlet Oxygen Amplification to Chemicontrolled Photodynamic Therapy, ***Journal of the American Chemical Society***, v. 138, p. 1215-1225, 2016.

EL MAGHRABY, G. M. M.; WILLIAMS, A. C.; BARRY, B. W. Oestradiol skin delivery from ultradeformable liposomes: refinement of surfactant concentration, ***International Journal of Pharmaceutics***, v. 196, p. 63-74, 2000.

EL-KHATIB, M.; TEPE, C.; SENGER, B.; DIBU+®-ADJEI, M.; RIEMENSCHNEIDER, J. M.; STUMMER, W.; STEIGER, J. H.; CORNELIUS, F. J. Aminolevulinic Acid-

Mediated Photodynamic Therapy of Human Meningioma: An in Vitro Study on Primary Cell Lines, v. 16, 2015.

ERDOGMUS, A.; NYOKONG, T. Synthesis of zinc phthalocyanine derivatives with improved photophysicochemical properties in aqueous media, ***Journal of Molecular Structure***, v. 977, p. 26-38, 2010.

FANG, Y. P.; TSAI, Y. H.; WU, P. C.; HUANG, Y. B. Comparison of 5-aminolevulinic acid-encapsulated liposome versus ethosome for skin delivery for photodynamic therapy, ***International Journal of Pharmaceutics***, v. 356, p. 144-152, 2008.

FARAHI, S.; MONTEMEZZANI, G.; GRABAR, A. A.; HUIGNARD, J. P.; RAMAZ, F. Photorefractive acousto-optic imaging in thick scattering media at 790 nm with a Sn2P2S6:Te crystal, ***Optics Letters***, v. 35, p. 1798-1800, 2010.

FEITOSA-FILHO, G. S. et al. Transferências Lipídicas para HDL em Diabéticos Tipo 2: Associações com Microalbuminúria, Estatina e Insulina. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia** , v.92, n.6, p.100-6, 2009.

FRANCHI, L. P.; MANSHIAN, B. B.; DE SOUZA, T. A. J.; SOENEN, S. J.; MATSUBARA, E. Y.; ROSOLEN, J. M.; TAKAHASHI, C. S. Cyto- and genotoxic effects of metallic nanoparticles in untransformed human fibroblast, ***Toxicology in Vitro***, v. 29, p. 1319-1331, 2015.

GANTA, S.; DESHPANDE, D.; KORDE, A.; AMIJI, M. A review of multifunctional nanoemulsion systems to overcome oral and CNS drug delivery barriers, ***Molecular Membrane Biology***, v. 27, p. 260-273, 2010.

GARBE, C.; EIGENTLER, T. K.; KEILHOLZ, U.; HAUSCHILD, A.; KIRKWOOD, J. M. Systematic Review of Medical Treatment in Melanoma: Current Status and Future Prospects, ***Oncologist***, v. 16, p. 5-24, 2011.

GARG, T.; JAIN, N.; RATH, G.; GOYAL, A. K. Nanotechnology-Based Photodynamic Therapy: Concepts, Advances, and Perspectives, ***Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems***, v. 32, p. 389-439, 2015.

GHARIB, R.; GREIGE-GERGES, H.; FOURMENTIN, S.; CHARCOSSET, C.; AUEZOVA, L. Liposomes incorporating cyclodextrin-drug inclusion complexes: Current state of knowledge, ***Carbohydrate Polymers***, v. 129, p. 175-186, 2015.

GILLET, A.; EVRARD, B.; PIEL, G. Liposomes and parameters affecting their skin penetration behaviour, ***Journal of Drug Delivery Science and Technology***, v. 21, p. 35-42, 2011.

GILLET, A.; GRAMMENOS, A.; COMPERE, P.; EVRARD, B.; PIEL, G. Development of a new topical system: Drug-in-cyclodextrin-in-deformable liposome, ***International Journal of Pharmaceutics***, v. 380, p. 174-180, 2009.

GIRIBABU, L.; SINGH, V. K.; JELLA, T.; SOUJANYA, Y.; AMAT, A.; DE ANGELIS, F.; YELLA, A.; GAO, P.; NAZEERUDDIN, M. K. Sterically demanded unsymmetrical zinc phthalocyanines for dye-sensitized solar cells, ***Dyes and Pigments***, v. 98, p. 518-529, 2013.

GOLKAR, N.; TAMADDON, A. M.; SAMANI, S. M. Effect of lipid composition on incorporation of trastuzumab-PEG-lipid into nanoliposomes by post-insertion

method: physicochemical and cellular characterization, ***Journal of Liposome Research***, v. 26, p. 113-125, 2016.

GOMES, M. J.; DAS NEVES, J.; SARMENTO, B. Nanoparticle-based drug delivery to improve the efficacy of antiretroviral therapy in the central nervous system, ***International Journal of Nanomedicine***, v. 9, p. 1757-1769, 2014.

HAREL, Y.; AZOUBEL, S.; MAGDASSI, S.; LELLOUCHE, J. P. A dispersability study on poly(thiophen-3-yl-acetic acid) and PEDOT multi-walled carbon nanotube composites using an analytical centrifuge, ***Journal of Colloid and Interface Science***, v. 390, p. 62-69, 2013.

HUEBINGER, J.; HAN, H. M.; HOFNAGEL, O.; VETTER, I. R.; BASTIAENS, P. I. H.; GRABENBAUER, M. Direct Measurement of Water States in Cryopreserved Cells Reveals Tolerance toward Ice Crystallization, ***Biophysical Journal***, v. 110, p. 840-849, 2016.

INCA Instituto Nacional de Câncer. *Pele Melanoma*. 2 Feb 2016.

JAYME, C. C.; CALORI, I. R.; TEDESCO, A. C. Spectroscopic analysis of aluminum chloride phthalocyanine in binary water/ethanol systems for the design of a new drug delivery system for photodynamic therapy cancer treatment, ***Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy***, v. 153, p. 178-183, 2016.

JEE, B. A.; LIM, H.; KWON, S. M.; JO, Y.; PARK, M. C.; LEE, I. J.; WOO, H. G. Molecular classification of basal cell carcinoma of skin by gene expression profiling, ***Molecular Carcinogenesis***, v. 54, p. 1605-1612, 2015.

JIANG, Y.; LEUNG, A. W.; WANG, X.; ZHANG, H.; XU, C. Effect of photodynamic therapy with hypocrellin B on apoptosis, adhesion, and migration of cancer cells, ***International Journal of Radiation Biology***, v. 90, p. 575-579, 2014.

JIN, H. L.; CHEN, J.; LOVELL, J. F.; ZHANG, Z. H.; ZHENG, G. Synthesis and Development of Lipoprotein-Based Nanocarriers for Light-Activated Theranostics, ***Israel Journal of Chemistry***, v. 52, p. 715-727, 2012.

JOHANSSON, A.; PALTE, G.; SCHNELL, O.; TONN, J. C.; HERMS, J.; STEPP, H. 5-Aminolevulinic Acid-induced Protoporphyrin IX Levels in Tissue of Human Malignant Brain Tumors, ***Photochemistry and Photobiology***, v. 86, p. 1373-1378, 2010.

JUNGERSTED, J. M.; SCHEER, H.; MEMPEL, M.; BAURECHT, H.; CIFUENTES, L.; HOGH, J. K.; HELLGREN, L. I.; JEMEC, G. B. E.; AGNER, T.; WEIDINGER, S. Stratum corneum lipids, skin barrier function and filaggrin mutations in patients with atopic eczema, ***Allergy***, v. 65, p. 911-918, 2010.

KALUDERCIC, N.; GIORGIO, V. The Dual Function of Reactive Oxygen/Nitrogen Species in Bioenergetics and Cell Death: The Role of ATP Synthase, ***Oxidative Medicine and Cellular Longevity***, v. 2016, p. 1-17, 2016.

KALYANARAMAN, B.; HARDY, M.; ZIELONKA, J. A Critical Review of Methodologies to Detect Reactive Oxygen and Nitrogen Species Stimulated by NADPH Oxidase Enzymes: Implications in Pesticide Toxicity, ***Current Pharmacology Reports***p. 1-9, 2016.

KARRER, S.; KOHL, E.; FEISE, K.; HIEPE-WEGENER, D.; LISCHNER, S.; PHILIPP-DORMSTON, W.; PODDA, M.; PRAGER, W.; WALKER, T.; SZEIMIES, R. M. Photodynamic therapy for skin rejuvenation: review and summary of the literature GÇô results of a consensus conference of an expert group for aesthetic photodynamic therapy, ***JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft***, v. 11, p. 137-148, 2013.

KASEMSARN, P.; BOSCO, J.; NIXON, R. L. The Role of the Skin Barrier in Occupational Skin Diseases, ***Current Problems in Dermatology***, v. 49, p. 135-143, 2016.

KASSAB, K.; ABD EL FADEEL, D.; FADEL, M. Topical photodynamic therapy using transfersomal aluminum phthalocyanine tetrasulfonate: in vitro and in vivo study, ***Lasers in Medical Science***, v. 28, p. 1353-1361, 2013.

KERN, K. U.; WEISER, T. Topical ambroxol for the treatment of neuropathic pain. A first clinical observation, ***Schmerz***, v. 29, p. 632-640, 2015.

KIM, J.; SANTOS, O. A.; PARK, J. H. Selective photosensitizer delivery into plasma membrane for effective photodynamic therapy, ***Journal of Controlled Release***, v. 191, p. 98-104, 2014.

KOLAROVA, H.; TOMANKOVA, K.; BAJGAR, R.; KOLAR, P.; KUBINEK, R. Photodynamic and Sonodynamic Treatment by Phthalocyanine on Cancer Cell Lines, ***Ultrasound in Medicine and Biology***, v. 35, p. 1397-1404, 2009.

KOLAROVA, H.; TOMANKOVA, K.; KOLAR, P. **Sonodynamic and photodynamic effect induced by light, ultrasound and disulfonated chloroaluminium phthalocyanine on G361 melanoma cell lines** 2008, p. 484-488.

KULBACKA, J. Nanosecond pulsed electric fields (nsPEFs) impact and enhanced Photofrin II (R) delivery in photodynamic reaction in cancer and normal cells. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy** , v.12, n.4, p.621-9, 2015.

LARJAVAARA, S.; MANTYLA, R.; SALMINEN, T.; HAAPASALO, H.; RAITANEN, J.; JAASKELAINEN, J.; AUVINEN, A. Incidence of gliomas by anatomic location, ***Neuro-Oncology***, v. 9, p. 319-325, 2007.

LEE, E. H.; KIM, A.; OH, Y. K.; KIM, C. K. Effect of edge activators on the formation and transfection efficiency of ultradeformable liposomes, ***Biomaterials***, v. 26, p. 205-210, 2005.

LI, K. T.; ZHANG, J.; DUAN, Q. Q.; BI, Y.; BAI, D. Q.; OU, Y. S. Apoptosis triggered by pyropheophorbide-alpha methyl ester-mediated photodynamic therapy in a giant cell tumor in bone, ***Laser Physics***, v. 24, 2014a.

LI, Q.; LIU, Q.; WANG, P.; FENG, X.; WANG, H.; WANG, X. The effects of Ce6-mediated sono-photodynamic therapy on cell migration, apoptosis and autophagy in mouse mammary 4T1 cell line, ***Ultrasonics***, v. 54, p. 981-989, 2014b.

LI, X. Y.; ZHAO, Y.; SUN, M. G.; SHI, J. F.; JU, R. J.; ZHANG, C. X.; LI, X. T.; ZHAO, W. Y.; MU, L. M.; ZENG, F.; LOU, J. N.; LU, W. L. Multifunctional liposomes loaded with paclitaxel and artemether for treatment of invasive brain glioma, ***Biomaterials***, v. 35, p. 5591-5604, 2014c.

LONGO, J. P. F.; DE MELO, L. N. D.; MIJAN, M. C.; VALOIS, C. R. A.; JOANITTI, G. A.; SIMIONI, A. R.; TEDESCO, A. C.; DE AZEVEDO, R. B. Photodynamic Therapy Mediated by Liposomal Chloroaluminum-Phthalocyanine Induces Necrosis in Oral Cancer Cells, ***Journal of Biomaterials and Tissue Engineering***, v. 3, p. 148-156, 2013.

MACHADO, A. H. A.; MORAES, K. C. M.; SOARES, C. P.; BELTRAME, M.; DA SILVA, N. S. Cellular Changes After Photodynamic Therapy on HEp-2 Cells Using the New ZnPcBr8 Phthalocyanine, ***Photomedicine and Laser Surgery***, v. 28, p. S143-S149, 2010.

MAESTRELLI, F.; GONZALEZ-RODRIGUEZ, M. L.; RABASCO, A. M.; GHELARDINI, C.; MURA, P. New "drug-in cyclodextrin-in deformable liposomes" formulations to improve the therapeutic efficacy of local anaesthetics, ***International Journal of Pharmaceutics***, v. 395, p. 222-231, 2010.

MALAM, Y.; LOIZIDOU, M.; SEIFALIAN, A. M. Liposomes and nanoparticles: nanosized vehicles for drug delivery in cancer, ***Trends in Pharmacological Sciences***, v. 30, p. 592-599, 2009.

MARANHAO, R. C.; TAVARES, E. R.; PADOVEZE, A. R.; VALDUGA, C. J.; RODRIGUES, D. G.; PEREIRA, M. D. Paclitaxel associated with cholesterol-rich nanoemulsions promotes atherosclerosis regression in the rabbit, ***Atherosclerosis***, v. 197, p. 959-966, 2008.

MARCHISIO, A.; MINELLA, M.; MAURINO, V.; MINERO, C.; VIONE, D. Photogeneration of reactive transient species upon irradiation of natural water samples: Formation quantum yields in different spectral intervals, and implications for the photochemistry of surface waters, ***Water Research***, v. 73, p. 145-156, 2015.

MATTAR, A.; FERREIRA, L. B.; GEBRIM, L. H.; HEGG, R.; MARANHAO, R. C. Safety and feasibility of neoadjuvant combined chemotherapy of breast cancer with paclitaxel carried in a lipid nanoemulsion (LDE) associated with adriamycin and cyclophosphamide, ***Cancer Research***, v. 75, 2015.

MEYER, S.; PETERS, N.; MANN, T.; WOLBER, R.; P+ÂRTNER, R.; NIERLE, J. In Vitro Efficacy and Release Study with Anti-Inflammatory Drugs Incorporated in Adhesive Transdermal Drug Delivery Systems, ***Journal of Pharmaceutical Sciences***, v. 103, p. 1142-1148, 2014.

MILANIC, M.; JIA, W. C.; NELSON, J. S.; MAJARON, B. Numerical Optimization of Sequential Cryogen Spray Cooling and Laser Irradiation for Improved Therapy of Port Wine Stain, ***Lasers in Surgery and Medicine***, v. 43, p. 164-175, 2011.

MILENKOVIC, S. M.; BARBINTA-PATRASCU, M. E.; BARANGA, G.; MARKOVIC, D. Z.; TUGULEA, L. Comparative spectroscopic studies on liposomes containing chlorophyll a and chlorophyllide a, ***General Physiology and Biophysics***, v. 32, p. 559-567, 2013.

MILIOTI, N.; BERMUDEZ-FAJARDO, A.; PENICHET, M. L.; OVIEDO-ORTA, E. Antigen-induced immunomodulation in the pathogenesis of atherosclerosis, ***Clinical & Developmental Immunology*** 2008.

MONTANARI, J.; PEREZ, A. P.; DI SALVO, F.; DIZ, V.; BARNADAS, R.; DICELIO, L.; DOCTOROVICH, F.; MORILLA, M. J.; ROMERO, E. L. Photodynamic ultradeformable liposomes: Design and characterization, ***International Journal of Pharmaceutics***, v. 330, p. 183-194, 2007.

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

MORRENS, J.; VAN DEN BROECK, W.; KEMPERMANN, G. Glial cells in adult neurogenesis, ***Glia***, v. 60, p. 159-174, 2012.

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.

MUEHLMANN, L. A.; MA, B. C.; LONGO, J. P. F.; MENEZES, M. D.; SANTOS, A.; AZEVEDO, R. B. A luminum-phthalocyanine chloride associated to poly(methyl

vinyl ether-co-maleic anhydride) nanoparticles as a new third-generation photosensitizer for anticancer photodynamic therapy, ***International Journal of Nanomedicine***, v. 9, p. 1199-1213, 2014.

NAGARATNAM, n.; NAGARATNAM, K.; CHEUK, G. Skin disorder in the Elderly. In: **Disease in Eldery:Age-Related Changes and Pathophysiology**. Springer International Publishing, 2016. Capítulo 8, p. 215-226.

NATARAJAN, V. T.; GANJU, P.; RAMKUMAR, A.; GROVER, R.; GOKHALE, R. S. Multifaceted pathways protect human skin from UV radiation, ***Nature Chemical Biology***, v. 10, p. 542-551, 2014.

NAYAK, S.; MUNIZ, J.; SALES, C. M.; TIKEKAR, R. V. Fructose as a novel photosensitizer: Characterization of reactive oxygen species and an application in degradation of diuron and chlorpyrifos, ***Chemosphere***, v. 144, p. 1690-1697, 2016.

NWOGU, C. et al. Photodynamic therapy of human lung cancer xenografts in mice. **JOURNAL OF SURGICAL RESEARCH** , v.200, n.1, p.8-12, 2016.

OGBODU, R. O.; LIMSON, J. L.; PRINSLOO, E.; NYOKONG, T. Photophysical properties and photodynamic therapy effect of zinc phthalocyanine-spermine-single walled carbon nanotube conjugate on MCF-7 breast cancer cell line, ***Synthetic Metals***, v. 204, p. 122-132, 2015.

OGBODU, R. O.; NYOKONG, T. Enhanced triplet state parameters for zinc carboxy phenoxy phthalocyanine following conjugation to ascorbic acid: Effects of

adsorption on single walled carbon nanotubes, ***Polyhedron***, v. 90, p. 175-182, 2015.

OGUNSIPE, A.; NYOKONG, T. Photophysicochemical consequences of bovine serum albumin binding to non-transition metal phthalocyanine sulfonates, ***Photochemical & Photobiological Sciences***, v. 4, p. 510-516, 2005.

OH, E. K.; JIN, S. E.; KIM, J. K.; PARK, J. S.; PARK, Y.; KIM, C. K. Retained topical delivery of 5-aminolevulinic acid using cationic ultradeformable liposomes for photodynamic therapy, ***European Journal of Pharmaceutical Sciences***, v. 44, p. 149-157, 2011.

OHGAKI, H.; KLEIHUES, P. Genetic profile of astrocytic and oligodendroglial gliomas, ***Brain Tumor Pathology***, v. 28, p. 177-183, 2011.

OLUWOLE, D. O.; TILBURY, C. M.; PRINSLOO, E.; LIMSON, J.; NYOKONG, T. Photophysicochemical properties and in vitro cytotoxicity of zinc tetracarboxyphenoxy phthalocyanine GÇô quantum dot nanocomposites, ***Polyhedron***, v. 106, p. 92-100, 2016.

OMURO, A.; DEANGELIS, L. M. Glioblastoma and Other Malignant Gliomas A Clinical Review, ***Jama-Journal of the American Medical Association***, v. 310, p. 1842-1850, 2013.

PENJWEINI, R. et al. Explicit dosimetry for 2-(1-hexyloxyethyl)-2-devinyl pyropheophorbide-a-mediated photodynamic therapy: macroscopic singlet

oxygen modeling. **JOURNAL OF BIOMEDICAL OPTICS** , v.20, n.12, p.128003, 2015.

PEREIRA, M. A.; MOSIQUEIRA, V. C.; VILELA, J. M. C.; ANDRADE, M. S.; RAMALDES, G. A.; CARDOSO, V. N. PLA-PEG nanocapsules radiolabeled with (99m)Technetium-HMPAO: Release properties and physicochemical characterization by atomic force microscopy and photon correlation spectroscopy, ***European Journal of Pharmaceutical Sciences***, v. 33, p. 42-51, 2008.

PEREZ, A. P.; CASASCO, A.; SCHILRREFF, P.; TESORIERO, M. V. D.; DUEMPELMANN, L.; ALTUBE, M. J.; HIGA, L.; MORILLA, M. J.; PETRAY, P.; ROMERO, E. L. Enhanced photodynamic leishmanicidal activity of hydrophobic zinc phthalocyanine within archaeolipids containing liposomes, ***International Journal of Nanomedicine***, v. 9, p. 3335-3345, 2014.

PERRY, J. D.; POLITO, S. C.; CHUNDURY, R. V.; SINGH, A. D.; FRITZ, M. A.; VIDIMOS, A. T.; GASTMAN, B. R.; KOYFMAN, S. A. Periocular Skin Cancer in Solid Organ Transplant Recipients, ***Ophthalmology***, v. 123, p. 203-208, 2016.

PETZOLD, G.; GOLTZSCHE, C.; MENDE, M.; SCHWARZ, S.; JAEGER, W. Monitoring the Stability of Nanosized Silica Dispersions in Presence of Polycations by a Novel Centrifugal Sedimentation Method, ***Journal of Applied Polymer Science***, v. 114, p. 696-704, 2009.

PIMENTEL, L. c. F.; J+ÍCOME J+¦NIOR, A. T.; MOSQUEIRA, V. C. F.; SANTOS-MAGALH+ÚES, N. S. Nanotecnologia farmac+¬utica aplicada ao tratamento da

mal+ía, ***Revista Brasileira de Ci+¬ncias Farmac+¬uticas***, v. 43, p. 503-514, 2007.

POZZI, F. S.; MARANHAO, R. C.; GUEDES, L. K.; BORBA, E. F.; LAURINDO, I. M. M.; BONFA, E.; VINAGRE, C. G. Plasma kinetics of an LDL-Like non-protein nanoemulsion and transfer of lipids to high-density Lipoprotein (HDL) in patients with rheumatoid arthritis, ***Journal of Clinical Lipidology***, v. 9, p. 72-80, 2015.

PRZYBYLO, M.; GLOGOCKA, D.; DOBRUCKI, J. W.; FRACZKOWSKA, K.; PODBIELSKA, H.; KOPACZYNSKA, M.; BOROWIK, T.; LANGNER, M. The cellular internalization of liposome encapsulated protoporphyrin IX by HeLa cells, ***European Journal of Pharmaceutical Sciences***, v. 85, p. 39-46, 2016.

QASSEM, M.; KYRIACOU, P. A. Reflectance near-infrared measurements for determining changes in skin barrier function and scattering in relation to moisturizer application, ***JOURNAL OF BIOMEDICAL OPTICS***, v. 20, 2015.

RABELLO, T. **Guia de produtos cosméticos** 9 ed. São Paulo: Editora Senac São Paulo, 2011,224.

RANGSIMAWONG, W.; OPANASOPIT, P.; ROJANARATA, T.; NGAWHIRUNPAT, T. Terpene-Containing PEGylated Liposomes as Transdermal Carriers of a Hydrophilic Compound, ***Biological & Pharmaceutical Bulletin***, v. 37, p. 1936-1943, 2014.

RANYUK, E.; CAUCHON, N.; KLARSKOV, K.; GUERIN, B.; VAN LIER, J. E. Phthalocyanine-Peptide Conjugates: Receptor-Targeting Bifunctional Agents for

Imaging and Photodynamic Therapy, ***Journal of Medicinal Chemistry***, v. 56, p. 1520-1534, 2013.

RASTOGI, R.; ANAND, S.; KOUL, V. Flexible polymerosomes-An alternative vehicle for topical delivery, ***Colloids and Surfaces B-Biointerfaces***, v. 72, p. 161-166, 2009.

REDMAN, J. M.; GIBNEY, G. T.; ATKINS, M. B. Advances in immunotherapy for melanoma, ***Bmc Medicine***, v. 14, 2016.

ROBERTS, D. W.; VALDES, P. A.; HARRIS, B. T.; FONTAINE, K. M.; HARTOV, A.; FAN, X. Y.; JI, S. B.; LOLLIS, S. S.; POGUE, B. W.; LEBLOND, F.; TOSTESON, T. D.; WILSON, B. C.; PAULSEN, K. D. Coregistered fluorescence-enhanced tumor resection of malignant glioma: relationships between delta-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX fluorescence, magnetic resonance imaging enhancement, and neuropathological parameters Clinical article, ***Journal of Neurosurgery***, v. 114, p. 595-603, 2011.

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

ROMERO, E. L.; MORILLA, M. J. Highly deformable and highly fluid vesicles as potential drug delivery systems: theoretical and practical considerations, ***International Journal of Nanomedicine***, v. 8, p. 3171-3186, 2013.

RONZANI, F.; ARZOUMANIAN, E.; BLANC, S.; BORDAT, P.; PIGOT, T.; CUGNET, C.; OLIVEROS, E.; SARAKHA, M.; RICHARD, C.; LACOMBE, S. Efficient cyanoaromatic photosensitizers for singlet oxygen production: synthesis and characterization of the transient reactive species, ***Physical Chemistry Chemical Physics***, v. 15, p. 17219-17232, 2013.

ROSSETTI, F. C.; DEPIERI, L. v. V.; PRA+ºA, F. o. G.; DEL CIAMPO, J. O.; FANTINI, M. C. A.; PIERRE, M. B. R.; TEDESCO, A. n. C.; BENTLEY, M. V. r. L. B. Optimization of protoporphyrin IX skin delivery for topical photodynamic therapy: Nanodispersions of liquid-crystalline phase as nanocarriers, ***European Journal of Pharmaceutical Sciences***, v. 83, p. 99-108, 2016.

SAINI, R.; POH, C. F. Photodynamic therapy: a review and its prospective role in the management of oral potentially malignant disorders, ***Oral Diseases***, v. 19, p. 440-451, 2013.

SAUVAGEOT, C. M. E.; WEATHERBEE, J. L.; KESARI, S.; WINTERS, S. E.; BARNES, J.; DELLAGATTA, J.; RAMAKRISHNA, N. R.; STILES, C. D.; KUNG, A. L. J.; KIERAN, M. W.; WEN, P. Y. C. Efficacy of the HSP90 inhibitor 17-AAG in human glioma cell lines and tumorigenic glioma stem cells, ***Neuro-Oncology***, v. 11, p. 109-121, 2009.

SCHAFFER, M.; HOFSTETTER, A.; ERTL-WAGNER, B.; BATASH, R.; P+ÂSCHL, J.; SCHAFFER, P. M. Treatment of astrocytoma grade-áIII with Photofrin-áII as a radiosensitizer, ***Strahlenther Onkol***, v. 189, p. 972-976, 2013.

SCHNEIDER, M.; STR+ÂBELE, S.; NONNENMACHER, L.; SIEGELIN, M. D.; TEPPER, M.; STROH, S.; HASSLACHER, S.; ENZENM++LLER, S.; STRAUSS, G.; BAUMANN, B.; KARPEL-MASSLER, G.; WESTHOFF, M. A.; DEBATIN, K. M.; HALATSCH, M. E. A paired comparison between glioblastoma GÇ£stem cellsGÇØ and differentiated cells, ***International Journal of Cancer***, v. 138, p. 1709-1718, 2016.

SEHMER, E. A. J.; HALL, G. J.; GREENBERG, D. C.; O'HARA, C.; WALLINGFORD, S. C.; WRIGHT, K. A.; GREEN, A. C. Incidence of glioma in a northwestern region of England, 2006-2010, ***Neuro-Oncology***, v. 16, p. 971-974, 2014.

SEN, K.; MANDAL, M. Second generation liposomal cancer therapeutics: Transition from laboratory to clinic, ***International Journal of Pharmaceutics***, v. 448, p. 28-43, 2013.

SERCOMBE, L.; VEERATI, T.; MOHEIMANI, F.; WU, S. Y.; SOOD, A. K.; HUA, S. Advances and Challenges of Liposome Assisted Drug Delivery, ***Frontiers in Pharmacology***, v. 6, 2015.

SHAKEEL, F.; ALANAZI, F. K.; RAISH, M.; HAQ, N.; RADWAN, A. A.; ALSARRA, I. A. Pharmacokinetic and in vitro cytotoxic evaluation of cholesterol-rich nanoemulsion of cholesteryl-succinyl-5-fluorouracil, ***Journal of Molecular Liquids***, v. 211, p. 164-168, 2015.

SILVA, E. P. O.; MITTMANN, J.; FERREIRA, V. T. P.; CARDOSO, M. A. G.; BELTRAME, M. Photodynamic effects of zinc phthalocyanines on intracellular

amastigotes of Leishmania amazonensis and Leishmania braziliensis, ***Lasers in Medical Science***, v. 30, p. 347-354, 2015.

SILVA, J.; FERREIRA-STRIXINO, J.; FONTANA, L.; PAULA, L.; RANIERO, L.; MARTIN, A.; CANEVARI, R. Apoptosis-associated genes related to photodynamic therapy in breast carcinomas, ***Lasers in Medical Science***, v. 29, p. 1429-1436, 2014.

SIQUEIRA-MOURA, M. P.; PRIMO, F. L.; PETI, A. P. F.; TEDESCO, A. C. Validated spectrophotometric and spectrofluorimetric methods for determination of chloroaluminum phthalocyanine in nanocarriers, ***Pharmazie***, v. 65, p. 9-14, 2010.

SIQUEIRA-MOURA, M. P.; PRIMO, F. L.; ESPREAFICO, E. M.; TEDESCO, A. C. Development, characterization, and photocytotoxicity assessment on human melanoma of chloroaluminum phthalocyanine nanocapsules, ***Materials Science and Engineering: C***, v. 33, p. 1744-1752, 2013.

SRISUK, P.; THONGNOPNUA, P.; RAKTANONCHAI, U.; KANOKPANONT, S. Physico-chemical characteristics of methotrexate-entrapped oleic acid-containing deformable liposomes for in vitro transepidermal delivery targeting psoriasis treatment, ***International Journal of Pharmaceutics***, v. 427, p. 426-434, 2012.

STAICU, A.; PASCU, A.; NUTA, A.; SORESCU, A.; RADITOIU, V.; PASCU, M. L. Studies About Phthalocyanine Photosensitizers to be Used in Photodynamic Therapy, ***Romanian Reports in Physics***, v. 65, p. 1032-1051, 2013.

STUPP, R.; MASON, W. P.; VAN DEN BEUF, M. J. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for newly diagnosed glioblastoma (vol 352, pg 19, 2005), ***Annals of Oncology***, v. 16, p. 949, 2005.

TASTEMEL, A.; KARACA, B. Y.; DURMUS, M.; BULUT, M. Photophysical and photochemical properties of novel metallophthalocyanines bearing 7-oxy-3-(m-methoxyphenyl) coumarin groups, ***Journal of Luminescence***, v. 168, p. 163-171, 2015.

TEIXEIRA, R. S.; VALDUGA, C. J.; BENVENUTTI, L. A.; SCHREIER, S.; MARANHAO, R. C. Delivery of daunorubicin to cancer cells with decreased toxicity by association with a lipidic nanoemulsion that binds to LDL receptors, ***Journal of Pharmacy and Pharmacology***, v. 60, p. 1287-1295, 2008.

THOMPSON, D. F.; BROOKS, K. G. Systematic review of topical amitriptyline for the treatment of neuropathic pain, ***Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics***, v. 40, p. 496-503, 2015.

TIBBITT, M. W.; DAHLMAN, J. E.; LANGER, R. Emerging Frontiers in Drug Delivery, ***Journal of the American Chemical Society***, v. 138, p. 704-717, 2016.

TURRO, N. J.; RAMAMURTHY, V.; SCAIANO, J. C. Modern Molecular Photochemistry of Organic Molecules, ***Photochemistry and Photobiology***, v. 88, p. 1033, 2012.

TYAGI, R. K.; GARG, N. K.; JADON, R.; SAHU, T.; KATARE, O. P.; DALAI, S. K.; AWASTHI, A.; MAREPALLY, S. K. Elastic liposome-mediated transdermal

immunization enhanced the immunogenicity of P-falciparum surface antigen, MSP-1(19), ***Vaccine***, v. 33, p. 4630-4638, 2015.

VALE, B. R. C.; VIEIRA, K. O.; SOUSA, J. C. L.; FERRARI, J. L.; SCHIAVON, M. A. EFFECT OF THE MOLECULAR STRUCTURE OF SURFACE LIGANDS ON WATER-SOLUBLE CdTe QUANTUM DOTS, ***Química Nova***, v. 38, p. 22-29, 2015.

VAN TELLINGEN, O.; YETKIN-ARIK, B.; DE GOOIJER, M. C.; WESSELING, P.; WURDINGER, T.; DE VRIES, H. E. Overcoming the blood-brain tumor barrier for effective glioblastoma treatment, ***Drug Resistance Updates***, v. 19, p. 1-12, 2015.

VIEIRA, G. D.; SOUZA, C. M. Physiological aspects of the Blood Brain Barrier, ***Journal of Health and Biological Sciences***, v. 1, p. 166-170, 2013.

VILSINSKI, B. H.; GEROLA, A. P.; ENUMO, J. A.; CAMPANHOLI, K. d. S. S.; PEREIRA, P. C. d. S.; BRAGA, G.; HIOKA, N.; KIMURA, E.; TESSARO, A. L.; CAETANO, W. Formulation of Aluminum Chloride Phthalocyanine in PluronicGäó P-123 and-áF-127 Block Copolymer Micelles: Photophysical properties and Photodynamic Inactivation of Microorganisms, ***Photochemistry and Photobiology***, v. 91, p. 518-525, 2015.

VISCONTI, B.; PAOLINO, G.; CAROTTI, S.; PENDOLINO, A. L.; MORINI, S.; RICHETTA, A. G.; CALVIERI, S. Immunohistochemical expression of VDR is associated with reduced integrity of tight junction complex in psoriatic skin,

Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology, v. 29, p. 2038-2042, 2015.

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, M.; WANG, H.; ZHANG, R.; MA, M.; MEI, K.; FANG, F.; WANG, X. Photolysis of Low-Brominated Diphenyl Ethers and Their Reactive Oxygen Species-Related Reaction Mechanisms in an Aqueous System, ***PLoS ONE***, v. 10, p. e0135400, 2015.

XU, Y.; YOUNG, M. J.; BATTAGLINO, R. A.; MORSE, L. R.; FONTANA, C. R.; PAGONIS, T. C.; KENT, R.; SOUKOS, N. S. Endodontic Antimicrobial Photodynamic Therapy: Safety Assessment in Mammalian Cell Cultures, ***Journal of Endodontics***, v. 35, p. 1567-1572, 2009.

YAMADA, K.; OGATA, A.; KAISE, H.; ODA, M.; KIMURA, F.; KOMATSU, S.; NAKAMURA, Y.; HOSONAGA, M.; MATSUMURA, M.; KAWATE, T.; MIYAHARA, K.; KAWAI, Y.; UEDA, A.; TERAOKA, S.; KOHNO, N. Accuracy and validity of sentinel lymph node biopsy for breast cancer using a photosensitizer: 8-year follow-up, ***Lasers in Surgery and Medicine***, v. 45, p. 558-563, 2013.

YANG, Z. Z.; LI, J. Q.; WANG, Z. Z.; DONG, D. W.; QI, X. R. Tumor-targeting dual peptides-modified cationic liposomes for delivery of siRNA and docetaxel to gliomas, ***Biomaterials***, v. 35, p. 5226-5239, 2014.

YU, G.; ZHANG, G. J.; FLACH, C. R.; MENDELSOHN, R. Vibrational spectroscopy and microscopic imaging: novel approaches for comparing barrier physical properties in native and human skin equivalents, ***JOURNAL OF BIOMEDICAL OPTICS***, v. 18, 2013.

ZEBALLOS, N. C. L.; VIOR, M. C. G.; AWRUCH, J.; DICELIO, L. E. An exhaustive study of a novel sulfur-linked adamantane tetrasubstituted zinc(II) phthalocyanine incorporated into liposomes, ***Journal of Photochemistry and Photobiology A-Chemistry***, v. 235, p. 7-13, 2012.

ZHANG, I.; CUI, Y.; AMIRI, A.; DING, Y.; CAMPBELL, R. E.; MAYSINGER, D. Pharmacological inhibition of lipid droplet formation enhances the effectiveness of curcumin in glioblastoma, ***European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics***, v. 100, p. 66-76, 2016.

ZHANG, J.; SHAO, L.; WU, C.; LU, H.; XU, R. Hypericin-mediated photodynamic therapy induces apoptosis of myoloma SP2/0 cells depended on caspase activity in vitro, ***Cancer Cell International***, v. 15, 2014a.

ZHANG, W. L.; WANG, G. J.; FALCONER, J. R.; BAGULEY, B. C.; SHAW, J. P.; LIU, J. P.; XU, H. T.; SEE, E.; SUN, J. G.; AA, J. Y.; WU, Z. M. Strategies to Maximize

Liposomal Drug Loading for a Poorly Water-soluble Anticancer Drug, ***Pharmaceutical Research***, v. 32, p. 1451-1461, 2015.

ZHANG, X. F.; LIN, Y.; GUO, W. F.; ZHU, J. Z. Spectroscopic insights on imidazole substituted phthalocyanine photosensitizers: Fluorescence properties, triplet state and singlet oxygen generation, ***Spectrochimica Acta Part A-Molecular and Biomolecular Spectroscopy***, v. 133, p. 752-758, 2014b.

ZHU, Y. Y.; LIAO, L. M. Applications of Nanoparticles for Anticancer Drug Delivery: A Review, ***Journal of Nanoscience and Nanotechnology***, v. 15, p. 4753-4773, 2015.

Apêndice A – Estudo da estabilidade acelerada das formulações

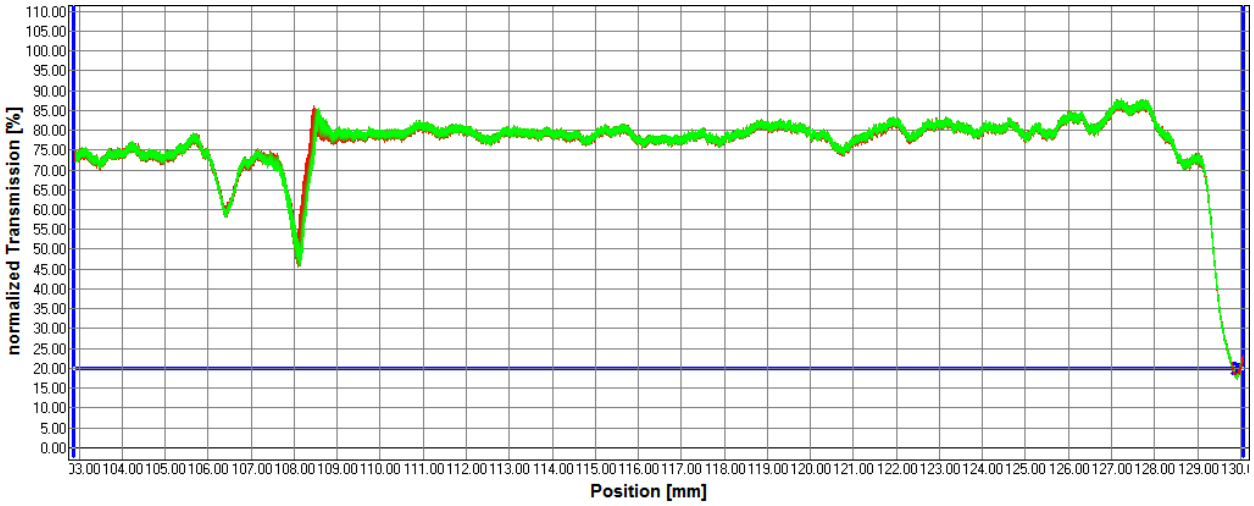


Figura 1: Perfil de transmissão da formulação de LDE incorporada com PcAlCl (LDEPc). Os primeiros perfis estão em vermelho e os últimos em verde.

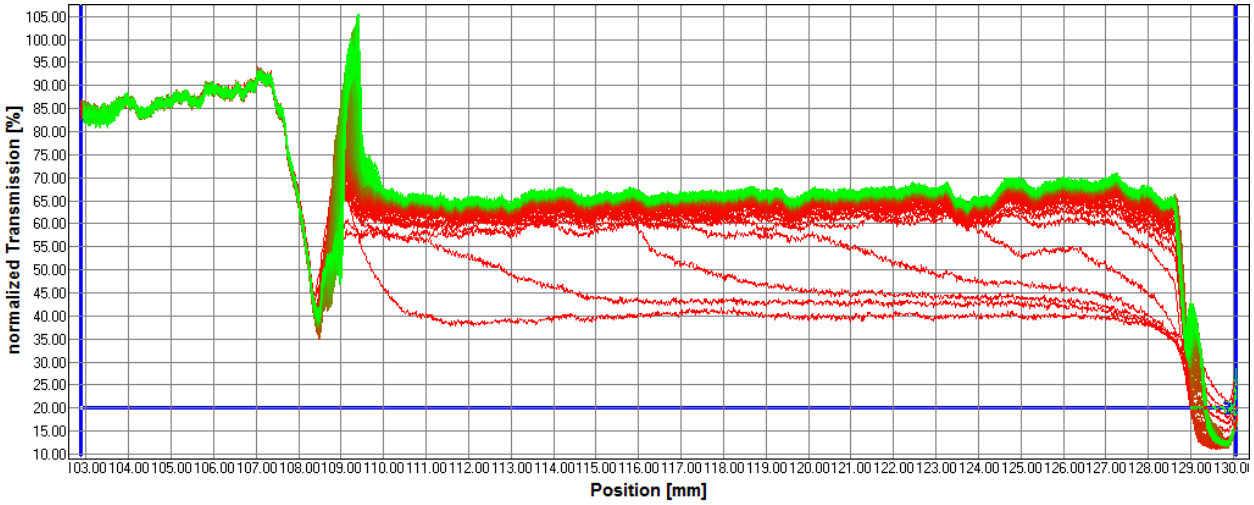


Figura 2: Perfil de transmissão da formulação de lipossoma convencional incorporada com PcAlCl (CLPc). Os primeiros perfis estão em vermelho e os últimos em verde.

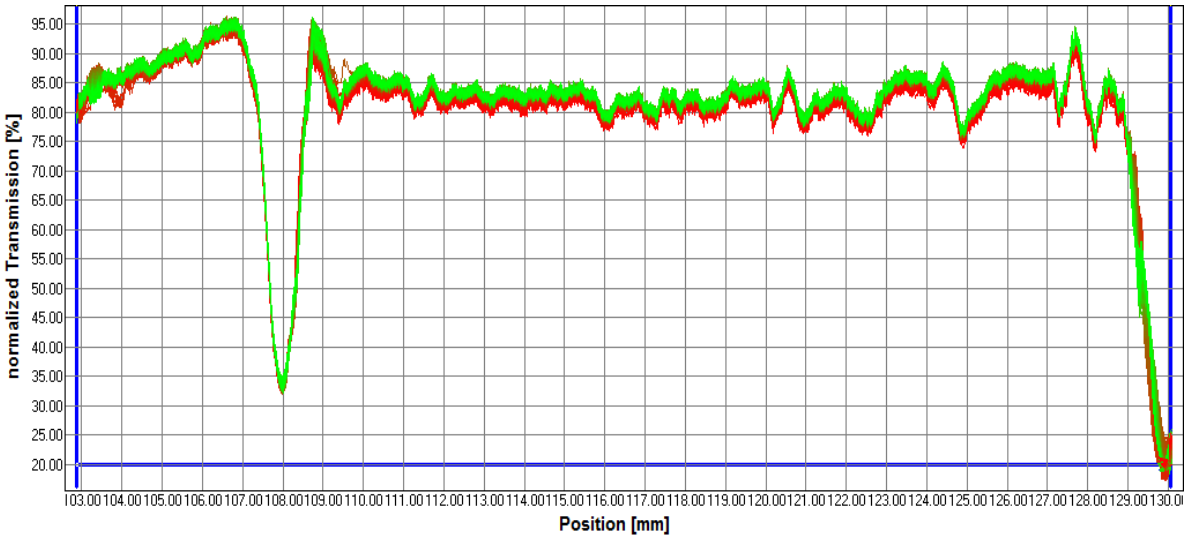


Figura 3: Perfil de transmissão da formulação de lipossoma ultraderfomável com Tween 80 incorporado com PcAlCl (UDLT80Pc). Os primeiros perfis estão em vermelho e os últimos em verde.

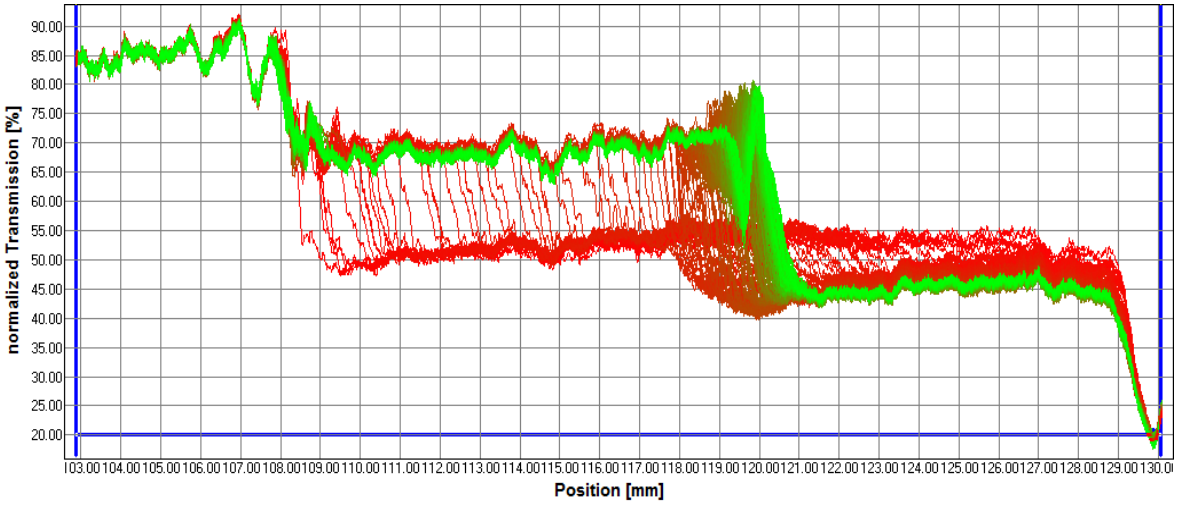


Figura 4: Perfil de transmissão da formulação de lipossoma ultraderfomável com Span 80 incorporado com PcAlCl (UDLS80Pc). Os primeiros perfis estão em vermelho e os últimos em verde.

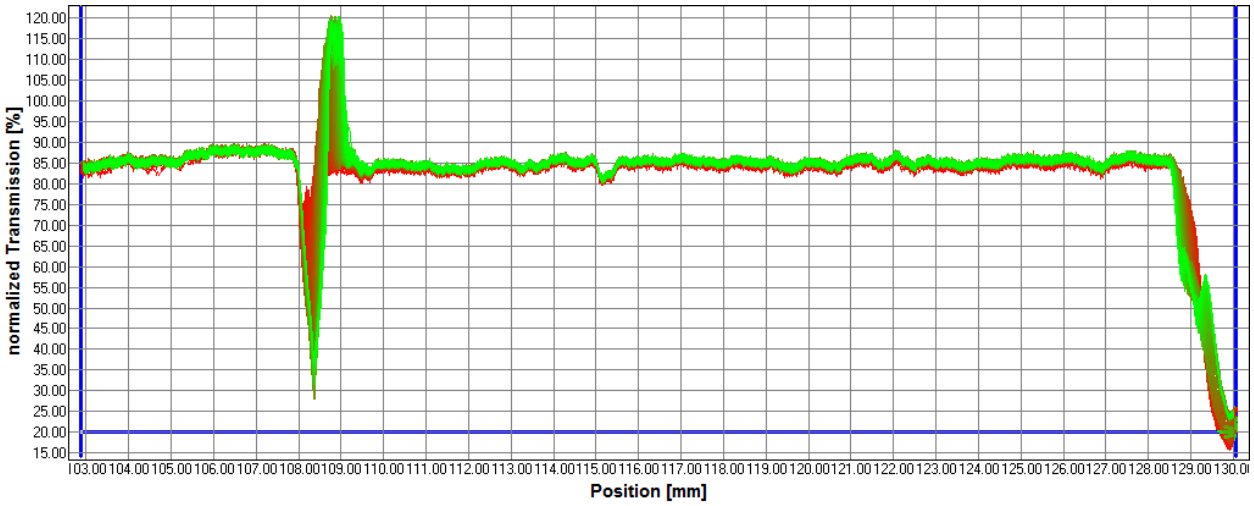


Figura 5: Perfil de transmissão da formulação de lipossoma ultraderfomável com desoxicolato de sódio incorporado com PcAlCl (UDLCSPc). Os primeiros perfis estão em vermelho e os últimos em verde.

Apêndice B – Estudo da estabilidade a longo prazo das formulações

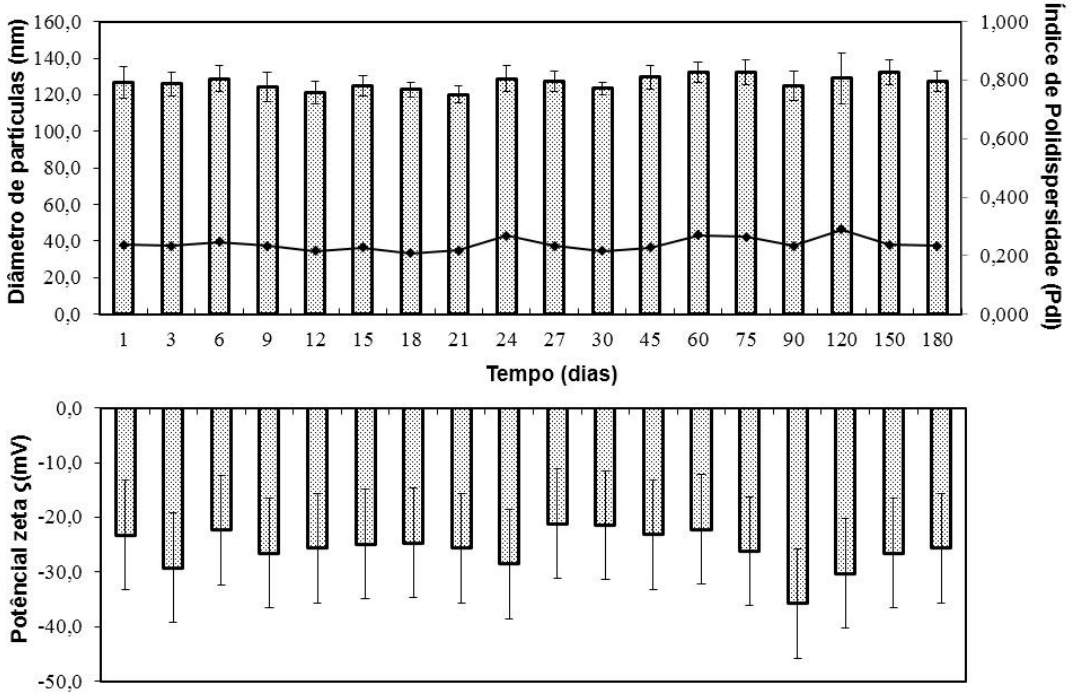


Figura 1: A) Resultados de diâmetro médio (±DP, colunas) e Índice de polidispersão (IPd) (±DP, linhas) da formulação de nanoemulsão de LDE (LDE); B) Resultados de potencial zeta (ς) (±DP, colunas) da formulação de nanoemulsão de LDE (LDE) para o estudo de estabilidade pelo período de 180 dias.

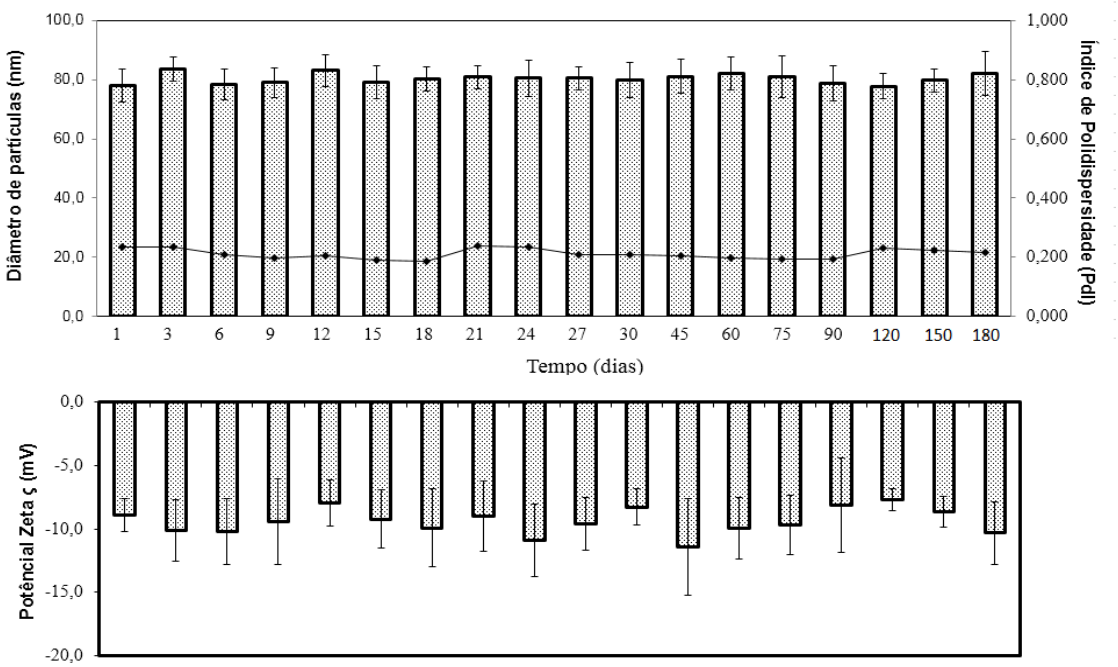


Figura 2: A) Resultados de diâmetro médio (±DP, colunas) e Índice de polidispersão (IPd) (±DP, linhas) da formulação de lipossoma ultraderfomável com Tween 80 (UDLT80); B) Resultados de potencial zeta (ς) (±DP, colunas) da formulação de lipossoma ultraderfomável com desoxicolato de sódio (UDLCS) para o estudo de estabilidade pelo período de 180 dias.

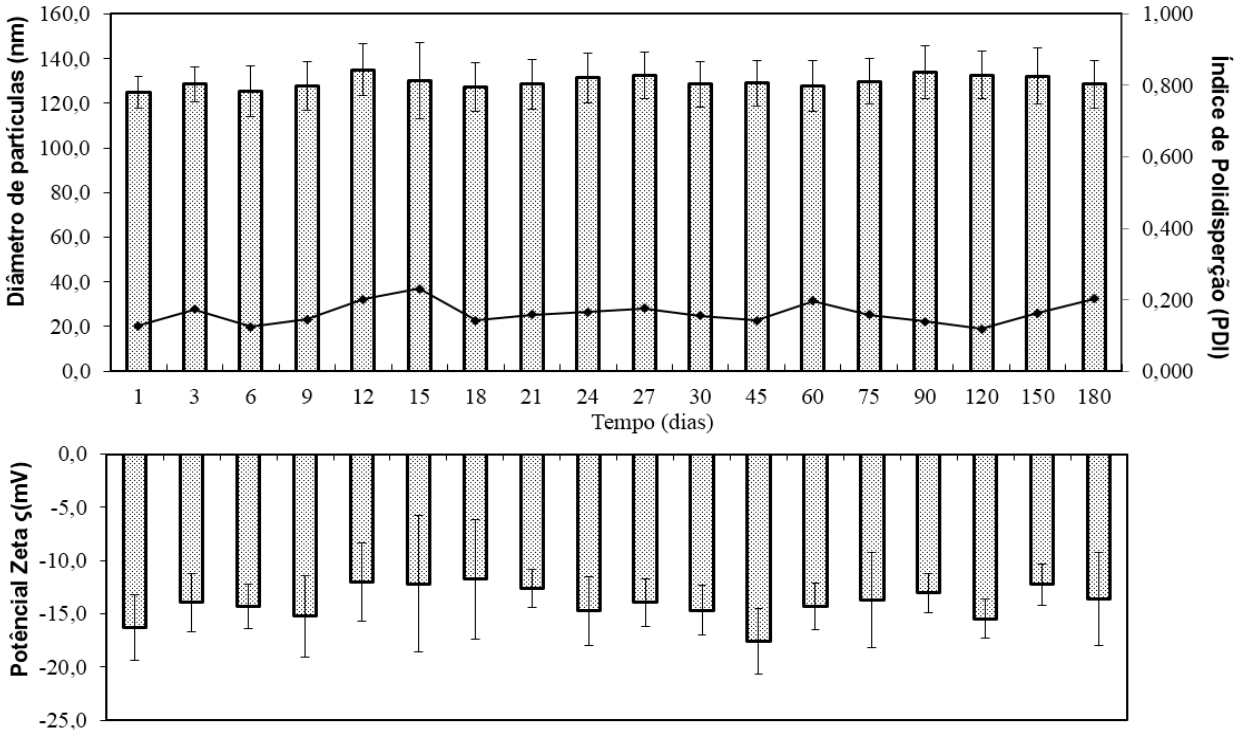


Figura 3: A) Resultados de diâmetro médio (±DP, colunas) e Índice de polidispersão (IPd) (±DP, linhas) da formulação de lipossoma ultraderfomável com Span 80 (UDLS80); B) Resultados de potencial zeta (ς) (±DP, colunas) da formulação de lipossoma ultraderfomável com Span 80 (UDLS80) para o estudo de estabilidade pelo período de 180 dias.

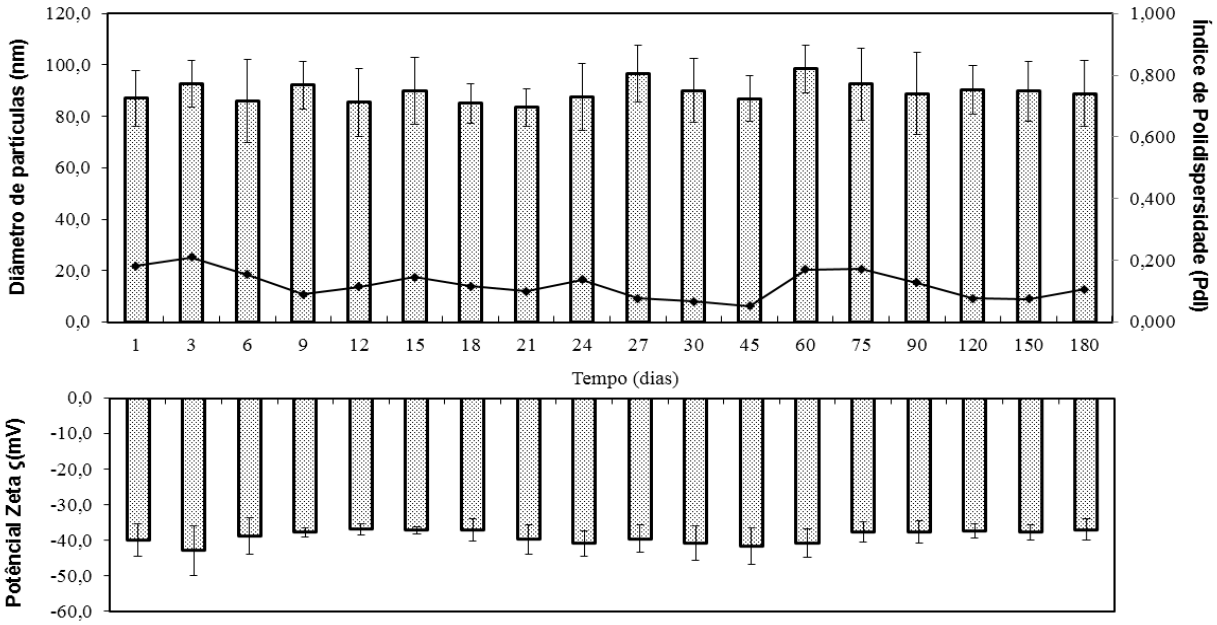


Figura 4: A) Resultados de diâmetro médio (±DP, colunas) e Índice de polidispersão (IPd) (±DP, linhas) da formulação de lipossoma ultraderfomável com desoxicolato de sódio (UDLCS); B) Resultados de potencial zeta (ς) (±DP, colunas) da formulação de lipossoma ultraderfomável com desoxicolato de sódio (UDLCS) para o estudo de estabilidade pelo período de 180 dias.

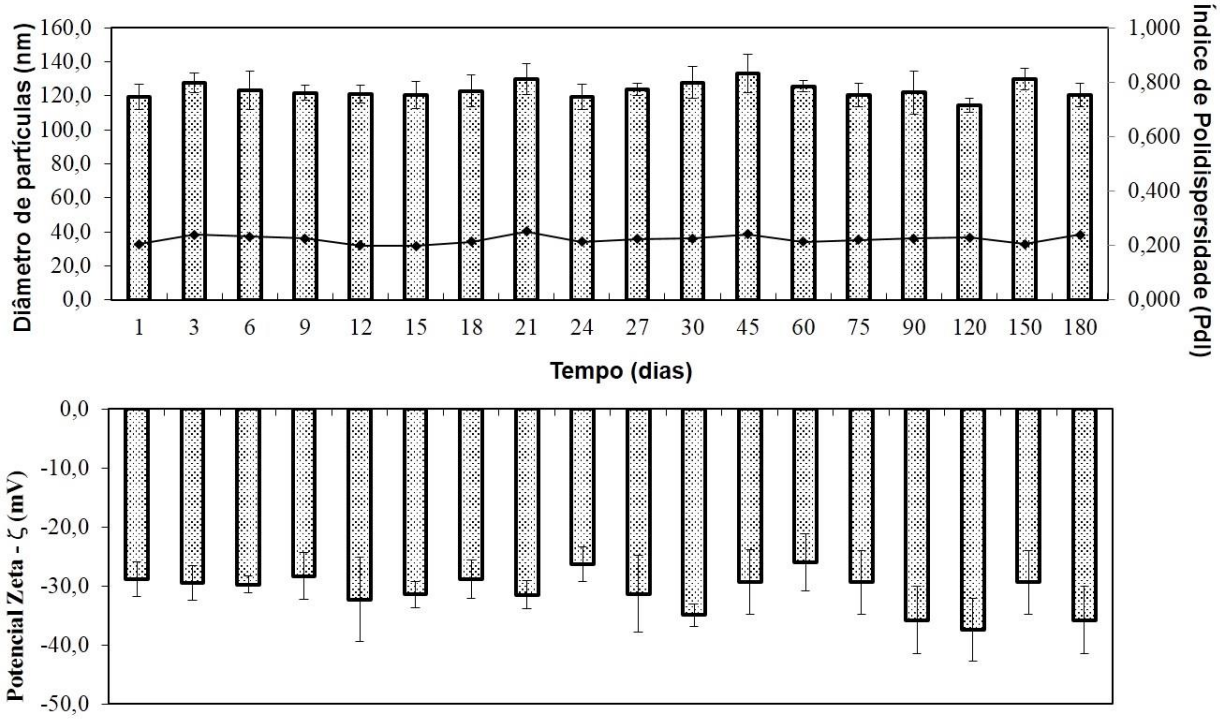


Figura 5: A) Resultados de diâmetro médio (±DP, colunas) e Índice de polidispersão (IPd) (±DP, linhas) da formulação de nanoemulsão de LDE incorporada com PcAlCl (LDEPc); B) Resultados de potencial zeta (ς) (±DP, colunas) da formulação de nanoemulsão de LDE incorporada com PcAlCl (LDEPc) para o estudo de estabilidade pelo período de 180 dias.

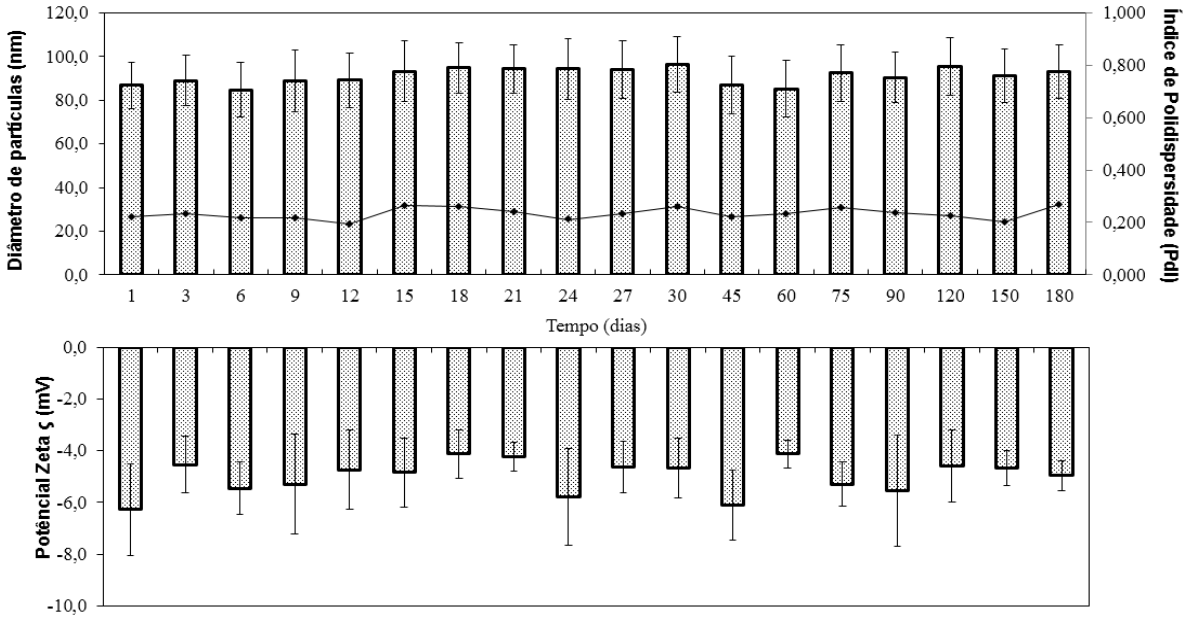


Figura 6: A) Resultados de diâmetro médio (±DP, colunas) e Índice de polidispersão (IPd) (±DP, linhas) da formulação de lipossoma ultradeformável com Tween 80 incorporado com ftalocianina de cloro-alumínio (UDLT80Pc); B) Resultados de potencial zeta (ς) (±DP, colunas) da formulação de lipossoma ultradeformável com Tween 80 incorporado com ftalocianina de cloro-alumínio (UDLT80Pc) para o estudo de estabilidade pelo período de 180 dias.

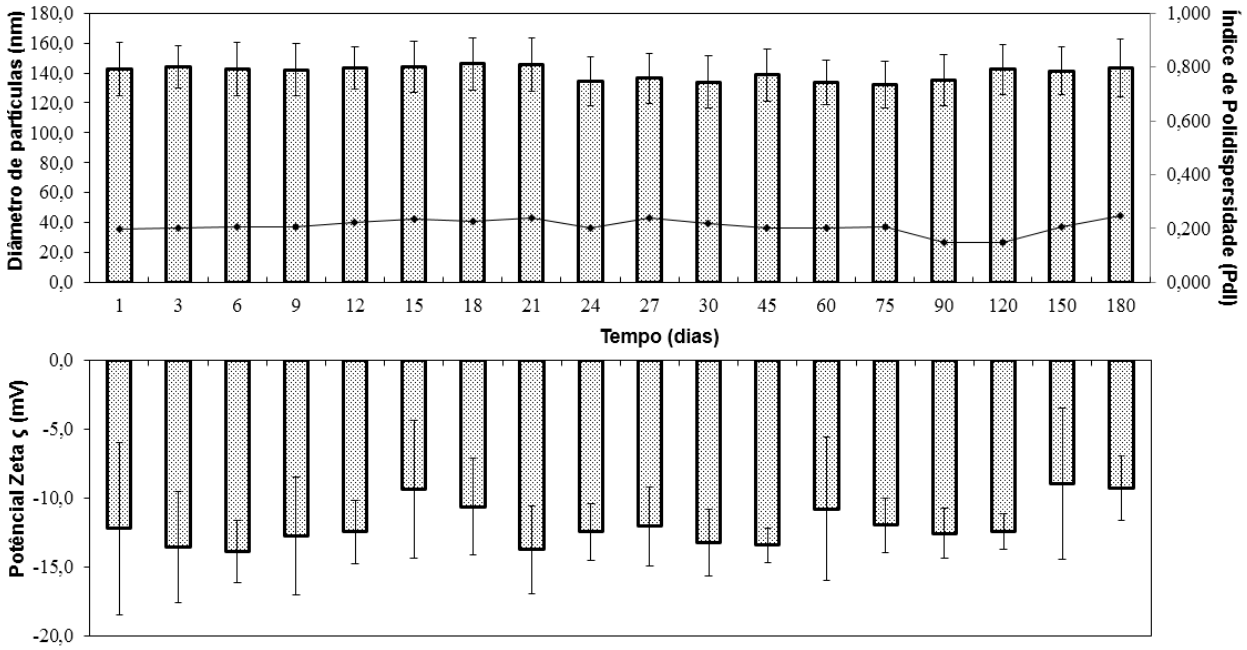


Figura 7: A) Resultados de diâmetro médio (±DP, colunas) e Índice de polidispersão (IPd) (±DP, linhas) da formulação de lipossoma ultradeformável com Span 80 incorporado com ftalocianina de cloro-alumínio (UDLS80Pc); B) Resultados de potencial zeta (ç) (±DP, colunas) da formulação de lipossoma ultradeformável com Span 80 incorporado com ftalocianina de cloro-alumínio (UDLS80Pc) para o estudo de estabilidade pelo período de 180 dias.

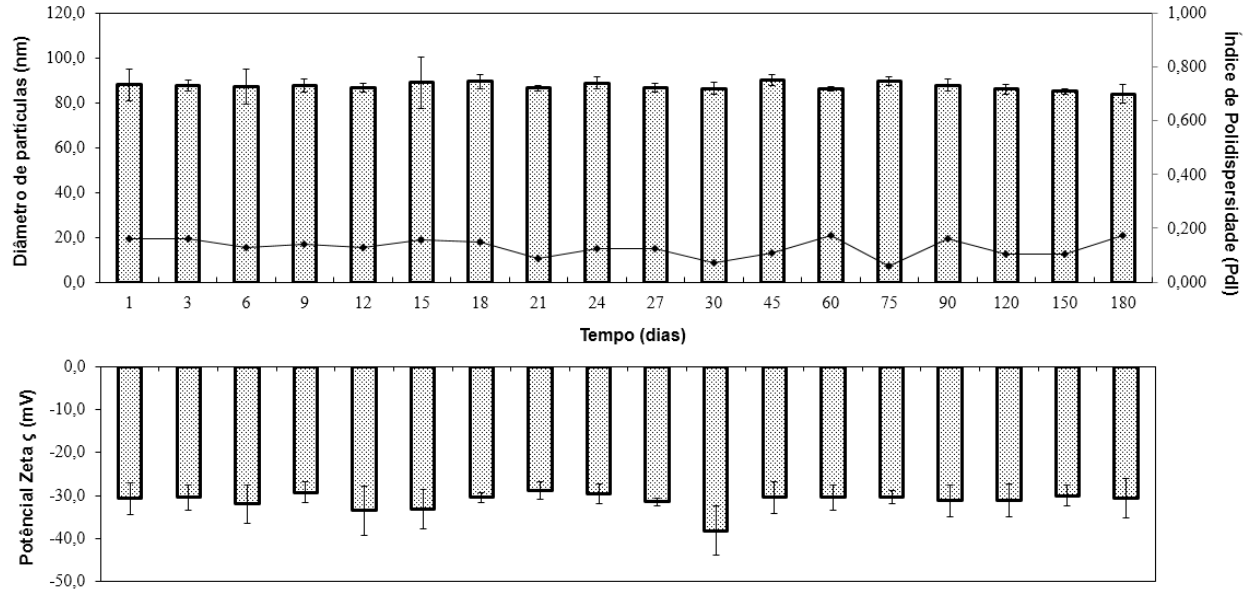


Figura 8: A) Resultados de diâmetro médio (±DP, colunas) e Índice de polidispersão (IPd) (±DP, linhas) da formulação de lipossoma ultradeformável com desoxicolato de sódio incorporado com ftalocianina de cloro-alumínio (UDLCSPc); B) Resultados de potencial zeta (ç) (±DP, colunas) da formulação de lipossoma ultradeformável com desoxicolato de sódio incorporado com ftalocianina de cloro-alumínio (UDLCSPc) para o estudo de estabilidade pelo período de 180 dias.

Apêndice C – Estudo da fotoestabilidade das formulações

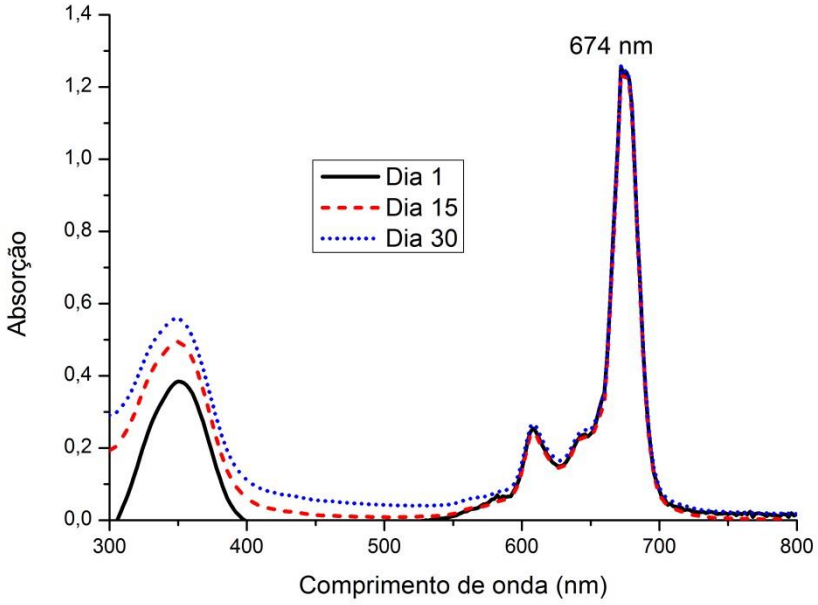


Figura 1: Espectro de absorção da PcAlCl incorporada em lipossoma ultraderfomável com Tween 80 (UDLT80Pc) no decorrer de 30 dias indicando a estabilidade da formulação formada.

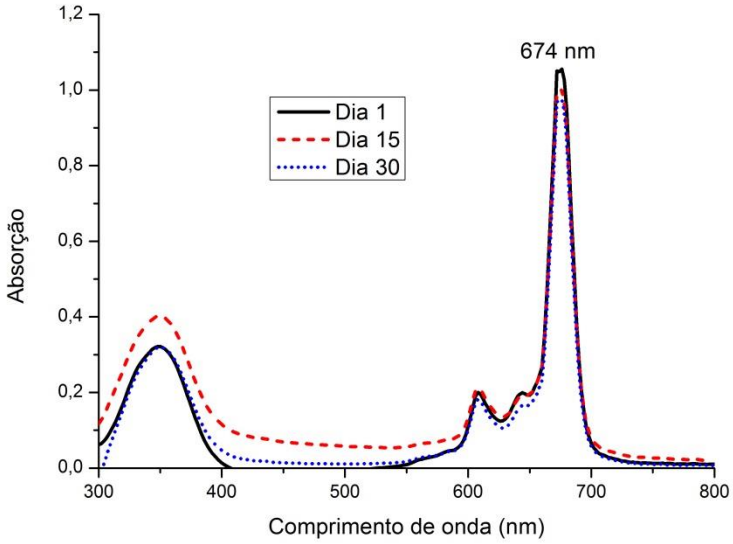


Figura 2: Espectro de absorção da PcAlCl incorporada em lipossoma ultraderfomável com Span 80 (UDLS80Pc) no decorrer de 30 dias indicando a estabilidade da formulação formada.

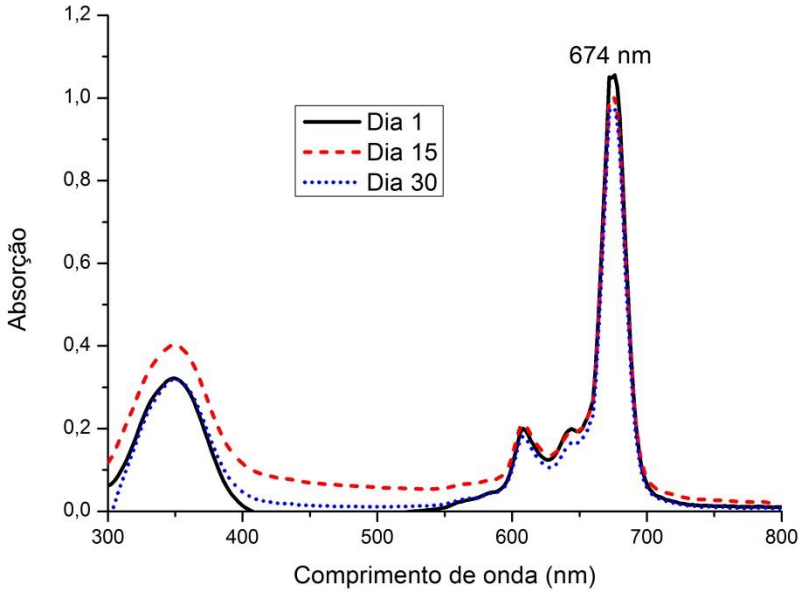


Figura 3: Espectro de absorção da PcAlCl incorporada em lipossoma ultraderfomável com desoxicolato de sódio (UDLCSPc) no decorrer de 30 dias indicando a estabilidade da formulação formada.

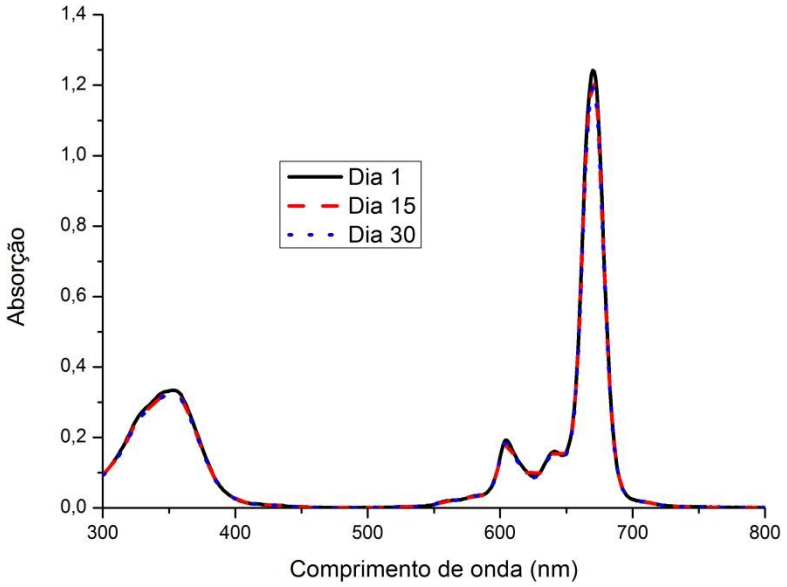


Figura 4: Espectro de absorção da PcAlCl em meio orgânico (etanol) no decorrer de 30 dias indicando a estabilidade da PcAlCl em meio orgânico.

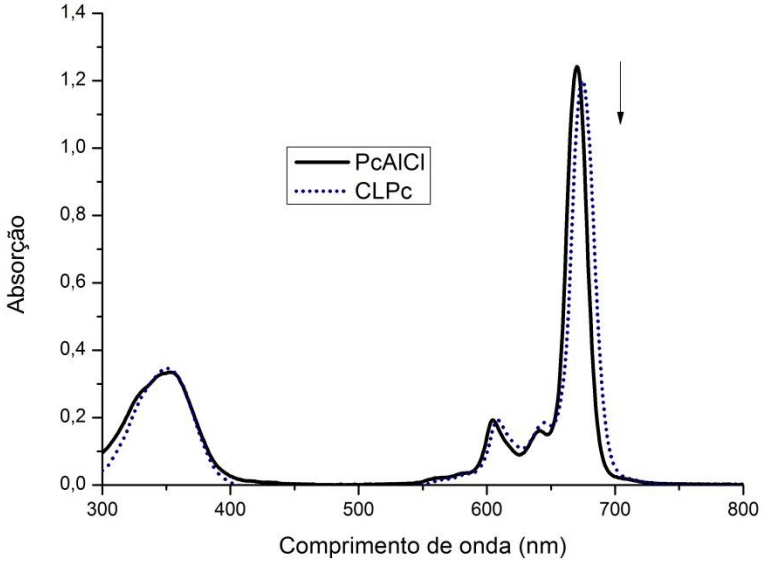


Figura 5: Espectro de absorção no UV-visível da PcAlCl em etanol espectroscópico (**-**) (5 µM) e incorporada em lipossoma convencional (**- -**) (5 µM) na faixa espectral 300-800 nm.

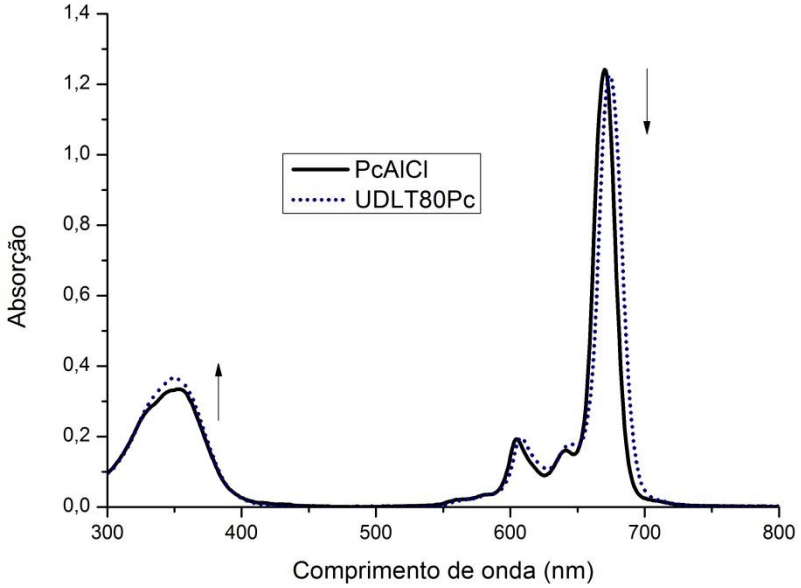


Figura 6: Espectro de absorção no UV-visível da PcAlCl em etanol espectroscópico (**-**) (5 µM) e incorporada em lipossoma ultraderfomável com Tween 80 (**- -**) (5 µM) na faixa espectral 300-800 nm.

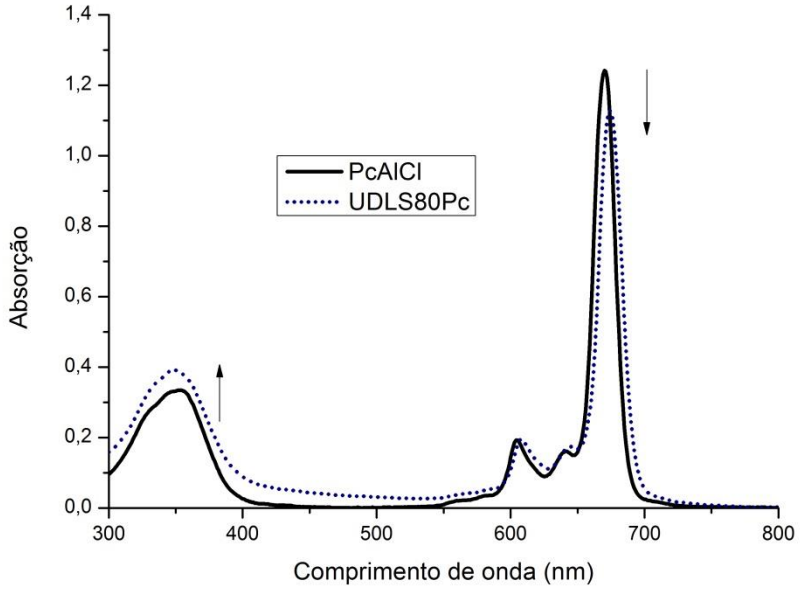


Figura 7: Espectro de absorção no UV-visível da PcAlCl em etanol espectroscópico (**-**) (5 µM) e incorporada em lipossoma ultraderfomável com Span 80 (**- -**) (5 µM) na faixa espectral 300-800 nm.

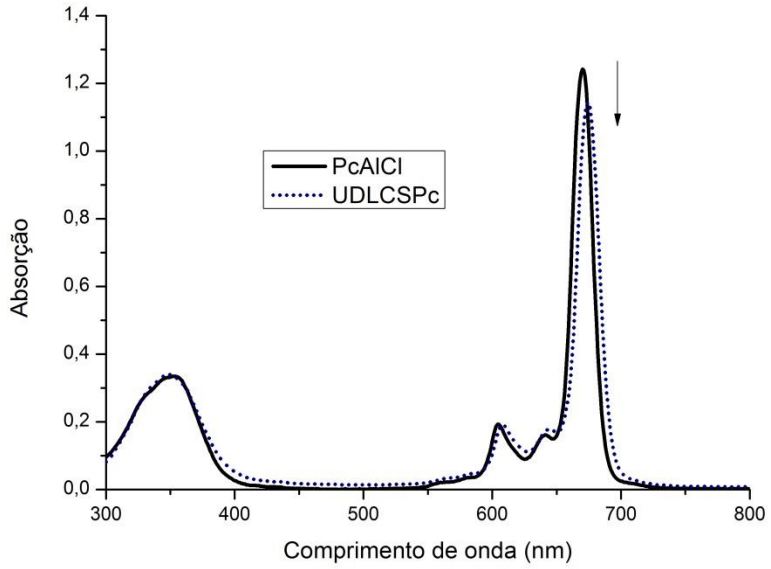


Figura 8: Espectro de absorção no UV-visível da PcAlCl em etanol espectroscópico (**-**) (5 µM) e incorporada em lipossoma ultraderfomável com desoxicolato de sódio (**- -**) (5 µM) na faixa espectral 300-800 nm.

Apêndice D – Estudo do tempo de vida de fluorescência (τ) das formulações

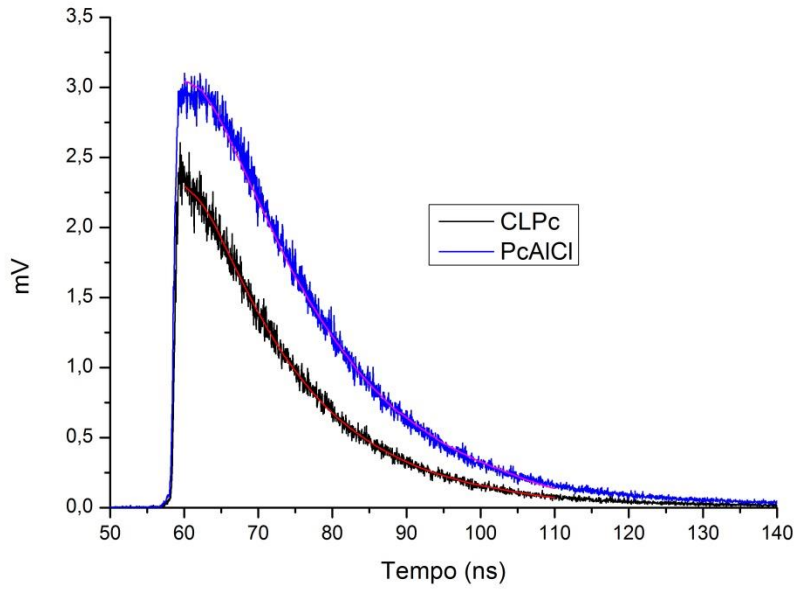


Figura 1: Decaimento de fluorescência para PcAlCl 5 µM em etanol (linha azul) e para PcAlCl incorporada em lipossoma convencional 5 µM (linha preta).

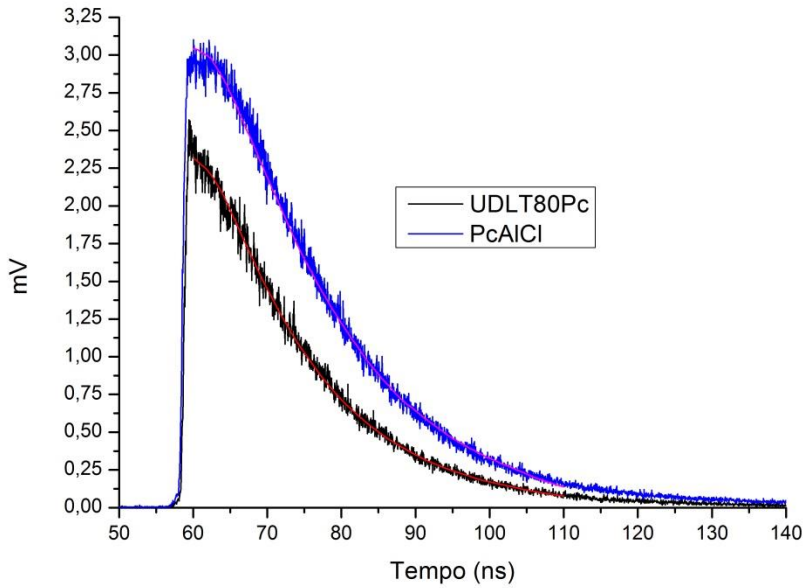


Figura 2: Decaimento de fluorescência para PcAlCl 5 µM em etanol (linha azul) e para PcAlCl incorporada em lipossoma ultradeformável com Tween 80 5 µM (linha preta).

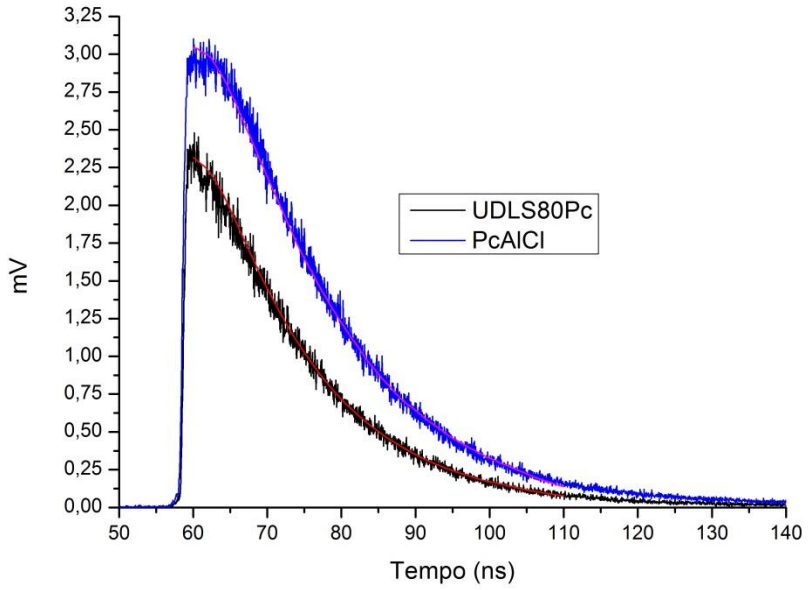


Figura 3: Decaimento de fluorescência para PcAlCl 5 µM em etanol (linha azul) e para PcAlCl incorporada em lipossoma ultraderfomável com Span 80 5 µM (linha preta).

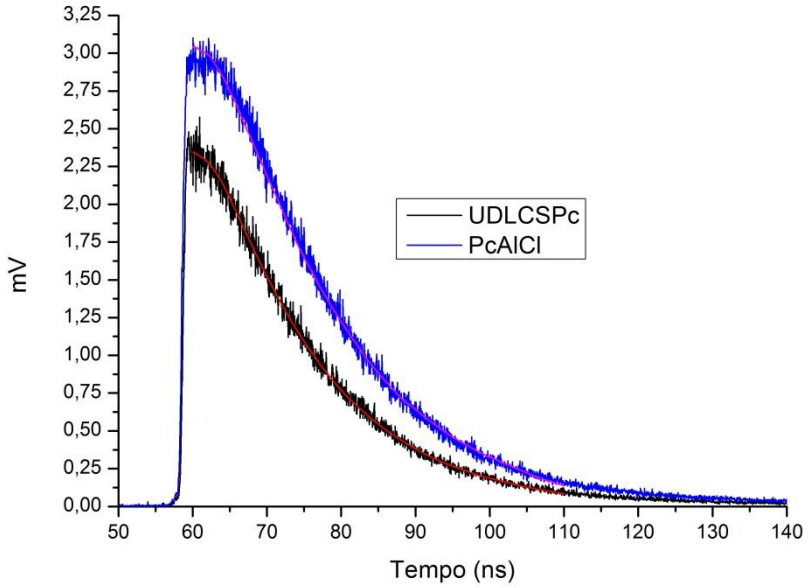


Figura 4: Decaimento de fluorescência para PcAlCl 5 µM em etanol (linha azul) e para PcAlCl incorporada em lipossoma ultraderfomável com desoxicolato de sódio 5 µM (linha preta).