UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

MA HUI LING

TESE DE DOUTORADO

Novas abordagens em terapia fotodinâmica: cultura tridimensional de células e órgão-em-chip com entrega de hipericina por sistemas de micro e nanoemulsão

Orientador: Prof. Dr. Emanuel Carrilho Co-orientadora: Profa. Dra. Janice Rodrigues Perussi

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

MA HUI LING

Novas abordagens em terapia fotodinâmica: cultura tridimensional de células e órgão-em-chip com entrega de hipericina por sistemas de micro e nanoemulsão

Tese apresentada ao Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para obtenção do título de doutor em ciências.

Exemplar revisado

O exemplar original encontra-se em acervo reservado na Biblioteca do IQSC-USP

Área de concentração: Química Analítica

Orientador: Prof. Dr. Emanuel Carrilho Co-orientadora: Profa. Dra. Janice Rodrigues Perussi

SÃO CARLOS 2022 Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Assinatura: Data:

Ficha Catalográfica elaborada pela Seção de Referência e Atendimento ao Usuário do SBI/IQSC

Hui Ling, Ma Novas abordagens em terapia fotodinâmica: cultura tridimensional de células e órgão-em-chip com entrega de hipericina por sistemas de micro e nanoemulsão / Ma Hui Ling. — São Carlos, 2022. 142 f.
Tese (Doutorado em Química Analítica e Inorgânica) — Instituto de Química de São Carlos / Universidade de São Paulo, 2022. Edição revisada
Orientador: Prof. Dr. Emanuel Carrilho

Coorientadora: Profa. Dra. Janice Rodrigues Perussi

1. Terapia fotodinâmica. 2. Hipericina. 3. Nanotecnologia. 4. Cultura celular 3D. 5. Órgão-em-chip. I. Título.

Wilneide do C. Marchi Maiorano - CRB: 3978/8



Dedico este trabalho aos meus pais por todo o amor, respeito, ensinamentos e educação que me tornaram quem sou hoje.

Agradecimentos

Primeiramente a Deus pela presença constante por me dar sabedoria e força para superar os desafios e oportunidade de conhecer pessoas maravilhosas ao longo dessa caminhada.

Aos meus pais e meus irmãos, pelo constante incentivo e apoio incondicional.

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Emanuel Carrilho**, pelo incentivo, confiança e orientação constante e tem sido um grande exemplo de pesquisador para mim.

À Prof. Dra. Janice Rodrigues Perussi pela co-orientação e contribuições no trabalho

Ao **Prof. Dr. Yu Shrike Zhang** da *Harvard Medical School* (Boston, MA, USA) pela orientação e por ter me acolhido no seu laboratório durante o estágio exterior, onde eu tive oportunidade de conviver com os melhores pesquisadores e abranger minha aprendizagem na área de *organ-on-chip*, bioimpressão e cultura celular 3D.

Ao **Prof. Dr. Anderson O. Ribeiro** da Universidade Federal do ABC (Santo André, SP, Brasil) por fornecer a hipericina para estudo deste trabalho.

Ao **Prof. Dr. Laudemir Carlos Varanda** pela disponibilidade e contribuições durante a realização deste trabalho.

Ao **Prof. Dr. Valtencir Zucolotto** e **M.s. Luana Antonio,** por auxiliar na realização dos ensaios de citometria de fluxo.

Aos **Prof. Dr. Sebastião Pratavieira** e **Prof. Dr. Francisco Guimarães**, por auxiliar na realização dos ensaios de microscopia confocal.

Ao **Prof. Dr. Vanderlei Bagnato** e **M.s. Giulia Kassab**, por disponibilizar os equipamentos e linhagens celulares.

Ao Prof. Dr. Andrei Leitão por disponibilizar as linhagens celulares.

Aos Técnicos do IQSC, Ana Claudia Curro, Alessandra Poli, Aline Silva, Fabiana Rosini, Mauro Fernandes e Virginia Martins, pela disponibilidade e suporte nas realizações de ensaios e o uso de equipamentos.

Em especial agradecimento à **Dra. Claudia Bernal** pela amizade, companhia, convivência, paciência, ensinamentos das técnicas, e carinho, tornando meus dias mais felizes, mesmo com as dificuldades do doutorado.

Em especial agradecimento à **Dra. Ana Carolina Urbaczec** pela amizade e paciência de ensinar e passar seus conhecimentos sobre *organ-on-chip*.

Aos colegas e ex-colegas do Laboratório BioMicS, Amanda Hikari, Amanda Maciel, Carlos Galinaro, Cleyton Makara, Desirée Scheidt, Eduardo Rossini, Jéssica Albuquerque,

Jéssica Feitor, Manoel Lima, Laís Brazaca, Larissa Michilini, Lucas Ximenes, Mariana Bortholazzi, Weliton Batiston e Vinícius Ferreira, pela convivência e amizade.

Aos funcionários do programa de Pós-graduação e do Departamento de Química e Física Molecular, especialmente, Andreia Moraes, Claudia Nascimento, Daniele Paiutta, Gislei Oliveira e Veroneide Athaide, do Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo pela paciência, auxílio e amizade.

Aos meus amigos, Anna Cecília Oliveira, Ana Paula Guimarães, Alice Wu & Edward Wang, Barbara Shih, Bruna Schiavon, Caroline Ceribeli, Crisiane Marangon, Fabiola Chapa, Fayene Ribeiro, Gabriela Yoshimoto, Luiza Gusmão, Mian Wang, Thayz Lima, Valerio Mainardi, Wanlu Li e Yu-Hua Tseng & Shang-Sheng Liu pela amizade e carinho.

A minha família do Brasil e do Taiwan, meus avós, tios, tias e primos pelo constante incentivo e carinho.

A todos os meus professores da graduação e pós-graduação pela paciência e amizade, contribuindo diretamente para a minha formação acadêmica.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

A todos que direta e indiretamente contribuíram na conclusão deste trabalho.

Resumo

Atualmente, em torno de 40% dos compostos terapêuticos descobertos têm sua eficiência terapêutica comprometida por serem pouco solúveis em meio aquoso. Hipericina (Hy) é um fotossensibilizador utilizado na terapia fotodinâmica (PDT) para tratamento do câncer. Entretanto, devido à baixa solubilidade de Hy em meio aquoso, os nanocarreadores, microemulsão (ME) e nanoemulsão (NE), foram selecionados para a encapsulação de Hy, com o objetivo de incrementar a biodisponibilidade de Hy em meio fisiológico e aumentar sua eficácia na PDT. Além disso, apesar do avanço acelerado no desenvolvimento de novo fármaco e terapia contra câncer, há necessidade de criar novos modelos in vitro para melhorar a previsibilidade dos ensaios tradicionais que utilizam majoritariamente a cultura estática de monocamada celular. O presente estudo visa desenvolver as ME e NE contendo Hy e utilizar os modelos de melanoma 3D e órgão-em-chip para investigar a eficiência fotodinâmica de Hy. Como resultados, as ME e NE produzidas a partir do diagrama de fases pseudoternárias e ultrasonicação, respectivamente, apresentaram tamanhos em torno de 10 a 30 nm, eficiências de encapsulação > 80%, maior fototoxicidade e acumulação intracelular comparado com a Hy livre para células tumorais. As MEs contendo Hy foram avaliadas no modelo de melanoma 3D produzido pela co-cultura de células de melanoma e fibroblastos em 6% de metacrilato de gelatina (GelMA), este apresentou uma espessura de 3 mm e módulo de Young 4,84 kPa com as semelhanças notáveis à um tecido *in vivo*, incluindo F-actina, expressão de fator indutor de hipóxia 1- alfa (HIF-1α), espessura do tecido e maior resistência a Hy-PDT do que a cultura celular 2D. A fototoxicidade e a penetração das MEs de Hy foram mais intensas do que Hy livre. O microchip criado para mimetizar o vaso sanguíneo gerou uma tensão de cisalhamento de 1,4 a 7 dina cm⁻² e demonstrou a relevância fisiológica em promover a proliferação e a expressão de fator de crescimento endotelial (VEGF) das células endoteliais, as quais exibiram uma dependência marcante de fluxo no aumento da fototoxicidade de Hy e a morte celular via necrose. Em conclusão, ME e NE são nanossistemas eficientes para carregar a Hy e aumentar seu potencial na PDT. Os modelos de melanoma 3D são sistemas robustos para avaliar os nanocarreadores nos tratamentos de câncer de pele. O microchip pode ser aplicado como um método in vitro alternativo e simples por considerar a tensão de cisalhamento do microambiente in vivo nas triagens de fotossensibilizadores e fármacos, auxiliando a melhorar a predição da sua eficácia e toxicidade em humanos.

Palavras-chave: Terapia fotodinâmica, Hipericina, nanotecnologia, melanoma, cultura celular 3D, órgão-em-chip

Abstract

Currently, around 40% of the therapeutic compounds discovered have compromised therapeutic efficiency because they are poorly soluble in aqueous media. Hypericin (Hy) is a photosensitizer used in photodynamic therapy (PDT) for cancer treatment. However, due to the low solubility of Hy in aqueous media, nanocarriers such as microemulsion (ME) and nanoemulsion (NE) were selected for Hy encapsulation, aiming to increase Hy's bioavailability in physiological media and increase its efficacy in PDT. Furthermore, despite the accelerated advance in the development of new drugs and cancer therapy, there is a need to create new in vitro models to improve the predictability of traditional assays that mostly use static monolayer cell culture. The present study aims to develop the ME and NE of Hy and use the 3D malignant melanoma models and organ-on-chip to investigate the photodynamic efficiency of Hy. As a result, ME and NE produced from pseudoternary phase diagram and ultrasonication, respectively, showed around 10 to 30 nm in size, encapsulation efficiency > 80%, higher phototoxicity, and intracellular accumulation compared to free Hy for tumor cells. Hy's MEs were evaluated in the 3D malignant melanoma model produced by co-culture of melanoma and fibroblast cells in 6% gelatin methacrylate (GelMA), this showed a 3-mm-thick and Young's modulus 4.84 kPa with the remarkable similarities to an in vivo tissue, including F-actin, expression of hypoxia-inducing factor 1-alpha (HIF-1α), tissue thickness and greater resistance to Hy-PDT than 2D cell culture. The phototoxicity and penetration of Hy from MEs were more intense than free Hy. The microchip created to mimic the blood vessel generated shear stress of 1.4 to 7 dyn cm⁻² and demonstrated the physiological relevance in promoting the proliferation and expression of endothelial growth factor (VEGF) of endothelial cells, which exhibited the marked dependence of flow in the increase of the phototoxicity of Hy and the cell death via necrosis. In conclusion, ME and NE are efficient nanosystems to carry Hy in PDT. The 3D malignant melanoma models are robust systems for evaluating the efficiency of the nanocarrier in the skin cancer treatments. The microchip can be applied as an alternative and simple in vitro method by considering the shear stress of the in vivo microenvironment in the screening of photosensitizers and drugs, helping to improve the prediction of their efficacy and toxicity in humans.

Keywords: Photodynamic therapy, Hypericin, nanotechnology, melanoma, 3D cell culture, organ-on-chip

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Espectro de absorção UV-Vis e a estrutura molecular de Hy 30 μ mol L ⁻¹ em DMSO.
Figura 2 Diagrama de Jablonski e os principais mecanismos da PDT24
Figura 3. A) tipos de emulsões: óleo em água (O/A) e água em óleo (A/O), B) tipos de
tensoativos: não-iônico, aniônico, catiônico e anfótero
Figura 4. Escala de Griffin do EHL com classificação e função dos tensoativos
Figura 5. Comparação de macroemulsões, NEs e MEs com relação ao tamanho, formato,
estabilidade, método de preparação e PDI29
Figura 6. Regiões hipotéticas de sistemas de ME são estimadas pelo diagrama de fases
pseudoternárias de óleo, água, tensoativo e co-tensoativos
Figura 7. Visão geral dos métodos de alta e baixa energia para a preparação de NEs O/A. A)
de alta energia: homogeneizadores de alta pressão e ultrasonicação de ponteira, B) de baixa
energia: ponto de inversão da emulsão e temperatura de inversão de fase
Figura 8. Preparação de ME utilizando o método de titulação da fase aquosa36
Figura 9. Esquema de preparação de NE utilizando a ultrasonicação de ponteira38
Figura 10. Curva analítica de Hy com faixa de trabalho de 0,005 a 1,00 μ g L ⁻¹ (R ² = 0,99). 43
Figura 11. Resultados da solubilidade de Hy 100 μ g mL ⁻¹ em óleos, tensoativos e co-tensoativo.
Figura 12. Diagramas de fases pseudoternárias foram empregados para mostrar a influência da
composição da fase oleosa na formação de ME: A = água destilada + 10% etanol, Smix =
Mistura de tensoativo e co-tensoativo, O = Fase oleosa. As regiões de cor azul representam
a obtenção das MEs isotrópicas. A) M1C (A = água destilada + 10% etanol, Smix = Tween
20: propilenoglicol (3: 1), O = ácido oleico). B) M1C (A = água destilada + 10% etanol,
Smix = Tween 80: propilenoglicol (3: 1), O = MCT com 3% Phosal [®] 50PG)45
Figura 13. As distribuições dos tamanhos de gotícula das MEs carregadas com Hy: M1C e
M2A analisadas pelo DLS
Figura 14. Espectros de fluorescência de Hy 100 μ g mL ⁻¹ em diferentes meios: PBS, DMSO,
M1C e M2A obtidos com excitação em 552 nm e emissão em 560 em 800 nm48
Figura 15. Imagens TEM das MEs: M1C e M2A coradas com 1% ácido fosfotúngstico49
Figura 16. A análise de estabilidade registrou a variação do diâmetro das gotículas e PDI das
MEs carregadas com Hy preparadas: (A) M1C (B) M2A, em diferentes temperaturas de
armazenamento: 5, 25 e 37 °C, ao longo de 180 dias50

Figura 18. A citotoxicidade das MEs vazias foi determinada 24 h após a incubação usando o ensaio MTT: M1C e M2A. A) células 3T3, B) células B16F10......52

Figura 20. A) A influência do tempo de ultrasonicação e as proporções de óleo (O) e tensoativo (S) no tamanho de gotícula, diferença estatística (*p < 0.01), e B) Aparência visual das NEs preparadas usando diferentes proporções de óleo e tensoativo: 1:1, 1:2 e 1:3.......55

Figura 21. A distribuição dos tamanhos de gotícula das NEs de Hy: NE-5A e NE-5B por DLS.

Figura 23. Imagens da TEM das NE-5A e NE-5B coradas com 1% ácido fosfotúngstico. 58

Figura 25. A análise de estabilidade registrou a variação do diâmetro da gotícula e PDI das NEs carregadas com Hy preparadas: (A) NE-5A (B) NE-5B, em diferentes temperaturas de armazenamento: 5, 25 e 37 °C, ao longo de 180 dias......60

Figura 26. Perfis de liberação *in vitro* de Hy a partir das: NE-5A e NE-5B, em comparação com Hy livre em DMSO e PBS, do saco de diálise com a membrana 14 kDa de acetato de celulose em tampão fosfato pH 7,4 a 37 °C......61

- Figura 28. Morfologia celular das células MCF-7 coradas por Giemsa após o tratamento PDT (com incubação de Hy por 24 h e a irradiação de LED amarelo 10 J cm⁻²), observou-se que induziu alterações morfológicas nas células MCF7. A) controle, B) Hy 200 nmol L⁻¹ livre no RPMI, C) 150 nmol L⁻¹ Hy carregada na NE-5A, D) 150 nmol L⁻¹ Hy na NE-5B. Barra de escala = 20 μm.

- Figura 33. As propriedades fundamentais dos hidrogéis para cultura celular 3D são nãocitotóxicos e biocompatíveis, além disso, devem possuir outras propriedades específicas como rigidez e elasticidade, adesão celular, porosidade, degradabilidade e bioatividade específica. Os hidrogéis podem ser classificados de acordo com suas origens: natural, sintética e semi-sintética ou híbrida. Os hidrogéis de origem biológica são proteínas ou polissacarídeos derivados de fontes naturais e biológicas. Os hidrogéis semi-sintéticos são formados por estruturas altamente repetitivas e sintéticas. Os hidrogéis semi-sintéticos ou híbridos possuem estruturas de um polímero hidrofílico sintético que é conjugado com polissacarídeos ou proteínas. A reticulação dos hidrogéis pode ser feita por diferentes

métodos químicos e físico	98	4
---------------------------	----	---

- Figura 36. As propriedades finais do GelMA incluindo rigidez do hidrogel, tamanho de poros e a proliferação celular podem ser ajustadas através dos parâmetros como concentração e grau de funcionalização do GelMA e a intensidade da luz UV usando o fotoiniciador UV.

- Figura 41. O ensaio de imunofluorescência foi conduzido para observar a viabilidade celular e a proliferação celular da co-cultura de células 3T3 e B16F10 em 6% GelMA + 0,3% LAP.
 A) Coloração de células Live/Dead. Barra de escala = 500 μm. B) Coloração de F-actina

/ núcleos por Phalloidin FITC / DAPI em 3, 7 e 14 dias. Barra de escala = 500 μ m. C) Intensidade de fluorescência de F-actina/núcleos durante 14 dias. D) células B16F10 (cor verde) e células 3T3 (cor magenta) foram marcadas com CellTrackers CMTPX e CMFDA, respectivamente. Barra de escala = 500 μ m. E) Ensaio de CCK-8 mostra a proliferação celular favorável no GelMA foto-reticulado. F) as expressões de HIF-1 α nos modelos 2D e 3D foram medidas após 1, 3 e 7 dias para ambos os sistemas e 1, 3, 7, 10 e 14 dias para o modelo 3D. Os dados são expressos como média \pm DP (n = 3) e diferença estática significativa: ns = não há diferença significativa, * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001.

- **Figura 42.** Citotoxicidade dos modelos de melanoma 3D após o tratamento com Hy-PDT usando a coloração de células vivas / mortas. As células foram previamente tratadas com Hy livre em DMEM e Hy encapsulada nas M1C e M2A seguido pela PDT (irradiação de LEDs amarelos, $\lambda = 590$ nm e 10 J cm⁻²), a cor vermelha indica célula morta (Dead) e a cor verde indica célula viva (Live). Barra de escala = 300 µm......91

- Figura 47. Os componentes dinâmicos, físicos e bioquímicos de um microambiente *in vivo* para serem mimetizados em sistemas de órgão-em-chip: biomecânicos, forças extrínsecas, interação célula-célula, receptores e moléculas de adesão, hipóxia e metabolismo e os

- Figura 48. As principais diferenças entre as culturas estática e dinâmica (sob fluxo)...........103
 Figura 49. Esquemas dos componentes do microchip, a) lâmina de poliestireno, b) fita adesiva biocompatível de dupla face cortada no cortador a laser, c) filme de poliéster d) conectores, e) dimensões laterais e transversais do microcanal, f) Dispositivo de microchip final..105

- Figura 55. As células foram cultivadas no microchip e incubada com Hy (116 nmol L⁻¹) sob tensão de cisalhamento de 1,4 a 7 dina cm⁻² por 2 h, seguido por uma irradiação de LEDs amarelos (10 J cm⁻²) e um período de pós-irradiação de 4 h. Microscopia de fluorescência

- Figura 56. As células foram cultivadas no microchip e incubada com Hy (116 nmol L⁻¹) sob tensão de cisalhamento de 1,4 a 7 dina cm⁻² por 2 h, seguido por uma irradiação de LEDs amarelos ($\lambda = 590$ nm, 10 J cm⁻²) e um período de pós-irradiação de 4 h. Quantificação de células vivas e mortas pelas imagens microscópicas de fluorescência. O controle foi feito com a incubação de Hy no escuro. Diferença estatística significativa: * *p* < 0,05. 116
- **Figura 57.** Citometria de fluxo do ensaio de caspases 3 e 7 das células HUVEC após a Hy-PDT. As células foram cultivadas no microchip e incubadas com Hy (116 nmol L⁻¹) sob tensão de cisalhamento de 1,4 a 7 dina cm⁻² por 2 h, seguido por uma irradiação de LEDs amarelos ($\lambda = 590$ nm, 10 J cm⁻²) e um período de pós-irradiação de 4 h. A) Controle (incubação de Hy no escuro) B) 0 C)1,4 D) 2,8 E) 4,2 F) 5,6 G) 7 dina cm⁻²......117

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Caracterização das MEs obtidas: M1C (2% ácido oleico, 40% Tween 80:
propilenoglicol (3:1), 58% água destilada+10% etanol). B) M1C (2% MCT com 3%
Phosal® 50PG, 30% Tween 20: propilenoglicol (3:1), 68% água destilada+10% etanol).
Tabela 2. Composição das NEs testadas nesta tese.54
Tabela 3. A caracterização físico-química das NEs de Hy por tamanho de gotículas, potencial
zeta, pH, condutividade e eficiência de encapsulação56
Tabela 4. Valores dos coeficientes de correlação (r^2) e constante da taxa de liberação de droga
(K) obtidos pelo ajuste de dados de liberação de Hy por meio de NE-5A, NE-5B, DMSO
e PBS usando modelos de ordem-zero, primeira ordem e Higuchi62
Tabela 5. Os valores de tensão de cisalhamento no microcanal gerados pelo fluxo laminar do
meio de cultura RPMI foram calculados de acorda com a equação 2, considerando a
viscosidade (μ) = 0,008 Pa s, altura (h) = 140 μ m e w = 2000 μ m

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2D	Bidimensional			
3D	Tridimensional			
3T3	Fibroblastos de camundongo BALBc /3T3 clone A31 (ATCC® CCL-163 TM)			
A/O	Água em óleo			
ANOVA	Análise de variância			
B16F10	Células derivadas de melanoma murino (ATCC® CCL-6475 TM)			
CCK-8	Cell Counting Kit-8			
DMEM	Meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle Medium			
DMSO	Dimetilsulfóxido			
EHL	Equilíbrio Hidrofílico - Lipofílico			
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay (ensaio de imunoenzimático)			
GelMA	Metacrilato de gelatina			
HIF-1α	Fator humano induzível por hipóxia-1 alfa			
HUVEC	Células endoteliais da veia umbilical humana			
Ну	Hipericina			
IC ₅₀	Concentração inibitória média			
LA/BE	Laranja de acridina/Brometo de etídio			
LED	Light Emitting Diode (diodos emissores de luz)			
Log P	Coeficiente de partição			
MA	Anidrido metacrílico			
MCF-7	Adenocarcinoma mamário humano (ATCC® HTB-22™)			
MCT	Triglicerídeos de cadeia média			
ME	Microemulsão			
MEC	Matriz extracelular			
MTT	3- (4,5-dimetil-2-tiazolil) -2,5-difenil- brometo de 2-H-tetrazólio			
NE	Nanoemulsão			
O/A	Óleo em água			
PBS	Phosphate-buffered saline (tampão de fosfato salino)			
PDI	Índice de polidispersidade			
PDMS	Polidimetilsiloxano			
PDT	Photodynamic therapy (terapia fotodinâmica)			
pН	Potencial hidrogeniônico			
ROS	Reactive oxygen species (espécies reativas de oxigênio)			
rpm	Rotação por minuto			
RPMI	Meio de cultura Roswell Park Memorial Institute 1640			
SOSG	Sensor de oxigênio singleto verde			
TEM	Transmission electron microscopy (Microscopia eletrônica de transmissão)			
UV	Ultravioleta			
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular			

SUMÁRIO

Capítulo I. Microemulsão, Nanoemulsão e Terapia fotodinâmica	
1. Introdução	
1.1. Hipericina e Terapia fotodinâmica	
1.2. Emulsões	
1.3. Microemulsão (ME)	
1.4. Nanoemulsão (NE)	
2. Objetivos	
3. Materiais e métodos	
3.1. Reagentes	
3.2. Curva analítica de hipericina	
3.3. Solubilidade	
3.4. Preparação de ME e Construção dos diagramas de fases pseudoternárias	
3.5. Preparação de NE	
3.6. Caracterização físico-química das nano e micro emulsões	
3.7. Cinética de liberação in vitro de Hy	
3.8. Geração de oxigênio singleto	40
3.9. Cultura celular	
3.10. Ensaios de citotoxicidade e fototoxicidade	
3.11. Análise de morfologia celular	41
3.12. Acumulação intracelular de Hy e de ROS	
4. Análise estatística	
5. Resultados e discussões	
5.1. Curva analítica de hipericina	
5.2. Solubilidade de Hy em tensoativos, co-tensoativos e óleos	
5.3. Microemulsão	
5.4. Nanoemulsão	
6. Conclusão	67
Capítulo II. Cultura celular tridimensional (3D)	
1. Introdução	69
1.1. Hidrogel	73
1.2. Metacrilato de gelatina (GelMA)	74

1.3. Câncer de pele e Melanoma	79
2. Objetivos	83
3. Materiais e métodos	83
3.1. Materiais	83
3.2. Cultura celular	84
3.3. Síntese do GelMA	84
3.4. Propriedade mecânica	85
3.5. Ensaio de imunofluorescência	85
3.6. Determinação de HIF-1α em modelos de melanoma 3D	86
3.7. Ensaio de citotoxicidade	86
3.8. A penetração e acumulação intracelular de Hy no modelo de melanoma 3D	87
3.9. Análise estatística	87
4. Resultados e discussões	87
4.1. Construção de modelo in vitro 3D de melanoma	87
4.2. Avaliação de citotoxicidade nos modelos 2D e 3D após a Hy-PDT	91
4.3. Intracelular acumulação das MEs carregadas com Hy no modelo de melanoma 3D	93
5. Conclusão	95
Capítulo III. Órgão-em-chip (<i>Organ-on-chip</i>)	96
Capítulo III. Órgão-em-chip (<i>Organ-on-chip</i>) 1. Introdução	96 97
 Capítulo III. Órgão-em-chip (<i>Organ-on-chip</i>) 1. Introdução 1.1. Vaso sanguíneo e tensão de cisalhamento 	96 97 101
 Capítulo III. Órgão-em-chip (<i>Organ-on-chip</i>) 1. Introdução 1.1. Vaso sanguíneo e tensão de cisalhamento 1.2. Microfabricação e Materiais de microchip 	96 97 101 103
 Capítulo III. Órgão-em-chip (<i>Organ-on-chip</i>) 1. Introdução 1.1. Vaso sanguíneo e tensão de cisalhamento 1.2. Microfabricação e Materiais de microchip 2. Objetivos 	96 97 101 103 104
 Capítulo III. Órgão-em-chip (<i>Organ-on-chip</i>) 1. Introdução 1.1. Vaso sanguíneo e tensão de cisalhamento 1.2. Microfabricação e Materiais de microchip 2. Objetivos 3. Materiais e métodos 	96 97 101 103 104 104
 Capítulo III. Órgão-em-chip (<i>Organ-on-chip</i>) 1. Introdução 1.1. Vaso sanguíneo e tensão de cisalhamento 1.2. Microfabricação e Materiais de microchip 2. Objetivos 3. Materiais e métodos 3.1. Fabricação de microchip de adesivo biocompatível 	96 97 101 103 104 104 104
 Capítulo III. Órgão-em-chip (<i>Organ-on-chip</i>) 1. Introdução 1.1. Vaso sanguíneo e tensão de cisalhamento 1.2. Microfabricação e Materiais de microchip 2. Objetivos 3. Materiais e métodos 3.1. Fabricação de microchip de adesivo biocompatível 3.2. Cálculo de tensão de cisalhamento 	96 97 101 103 104 104 104 105
 Capítulo III. Órgão-em-chip (<i>Organ-on-chip</i>) 1. Introdução 1.1. Vaso sanguíneo e tensão de cisalhamento 1.2. Microfabricação e Materiais de microchip 2. Objetivos 3. Materiais e métodos 3.1. Fabricação de microchip de adesivo biocompatível 3.2. Cálculo de tensão de cisalhamento 3.3. Cultura celular 	96 97 101 103 104 104 105 105
 Capítulo III. Órgão-em-chip (<i>Organ-on-chip</i>) 1. Introdução 1.1. Vaso sanguíneo e tensão de cisalhamento 1.2. Microfabricação e Materiais de microchip 2. Objetivos 3. Materiais e métodos 3.1. Fabricação de microchip de adesivo biocompatível 3.2. Cálculo de tensão de cisalhamento 3.3. Cultura celular 3.4. Cultura celular no microchip 	96 97 101 103 104 104 105 105 106
 Capítulo III. Órgão-em-chip (<i>Organ-on-chip</i>) 1. Introdução	96 97 101 103 104 104 105 105 106 107
 Capítulo III. Órgão-em-chip (<i>Organ-on-chip</i>) 1. Introdução 1.1. Vaso sanguíneo e tensão de cisalhamento 1.2. Microfabricação e Materiais de microchip 2. Objetivos 3. Materiais e métodos 3.1. Fabricação de microchip de adesivo biocompatível 3.2. Cálculo de tensão de cisalhamento 3.3. Cultura celular 3.4. Cultura celular no microchip 3.5. Incubação estática e dinâmica de Hy. 3.6. Quantificação da liberação de VEGF-A. 	96 97 101 103 104 104 105 105 106 107 107
 Capítulo III. Órgão-em-chip (<i>Organ-on-chip</i>) 1. Introdução 1.1. Vaso sanguíneo e tensão de cisalhamento 1.2. Microfabricação e Materiais de microchip 2. Objetivos 3. Materiais e métodos 3.1. Fabricação de microchip de adesivo biocompatível 3.2. Cálculo de tensão de cisalhamento 3.3. Cultura celular 3.4. Cultura celular no microchip 3.5. Incubação estática e dinâmica de Hy 3.6. Quantificação da liberação de VEGF-A 3.7. Viabilidade celular 	96 97 101 103 104 104 105 105 106 107 107 107
 Capítulo III. Órgão-em-chip (<i>Organ-on-chip</i>) 1. Introdução 1.1. Vaso sanguíneo e tensão de cisalhamento 1.2. Microfabricação e Materiais de microchip 2. Objetivos 3. Materiais e métodos 3.1. Fabricação de microchip de adesivo biocompatível 3.2. Cálculo de tensão de cisalhamento 3.3. Cultura celular 3.4. Cultura celular no microchip 3.5. Incubação estática e dinâmica de Hy 3.6. Quantificação da liberação de VEGF-A 3.7. Viabilidade celular 3.8. Ensaio de citometria de fluxo para avaliar as caspases - 3 e 7 <i>in vitro</i> 	96 97 101 103 104 104 105 105 106 107 107 107 108
 Capítulo III. Órgão-em-chip (<i>Organ-on-chip</i>) 1. Introdução 1.1. Vaso sanguíneo e tensão de cisalhamento 1.2. Microfabricação e Materiais de microchip 2. Objetivos 3. Materiais e métodos 3.1. Fabricação de microchip de adesivo biocompatível 3.2. Cálculo de tensão de cisalhamento 3.3. Cultura celular 3.4. Cultura celular no microchip 3.5. Incubação estática e dinâmica de Hy 3.6. Quantificação da liberação de VEGF-A 3.7. Viabilidade celular 3.8. Ensaio de citometria de fluxo para avaliar as caspases - 3 e 7 <i>in vitro</i> 	96 97 101 103 104 104 105 105 105 107 107 107 108 109
Capítulo III. Órgão-em-chip (Organ-on-chip) 1. Introdução 1.1. Vaso sanguíneo e tensão de cisalhamento 1.2. Microfabricação e Materiais de microchip 2. Objetivos 3. Materiais e métodos 3.1. Fabricação de microchip de adesivo biocompatível. 3.2. Cálculo de tensão de cisalhamento 3.3. Cultura celular 3.4. Cultura celular no microchip 3.5. Incubação estática e dinâmica de Hy. 3.6. Quantificação da liberação de VEGF-A 3.7. Viabilidade celular. 3.8. Ensaio de citometria de fluxo para avaliar as caspases - 3 e 7 <i>in vitro</i> 3.9. Análise estatística	96 97 101 103 104 104 105 105 105 107 107 107 107 108 109 109

Referências	.120
5. Conclusão	. 119
4.4. Apoptose induzida pela Hy-PDT nas células HUVEC	. 116
4.3. Diferença na eficácia da PDT entre a incubação estática e dinâmica de Hy	. 113
4.2. Tensão de cisalhamento e liberação de VEGF	. 112

Capítulo I.

Microemulsão, Nanoemulsão e Terapia fotodinâmica

1. Introdução

Atualmente, em torno de 40% dos compostos terapêuticos descobertos são poucos solúveis em água, isso gravemente afeta suas eficiências terapêuticas e é considerado o principal obstáculo para o desenvolvimento de fármacos. ¹ Nas condições fisiológicas, a extensão de um fármaco depende da sua biodisponibilidade que é definida pela taxa de até que ponto um fármaco dissolvido é absorvido e torna-se disponível no local de ação do destino. ² Os fármacos insolúveis podem causar absorção errática ou incompleta, muitas vezes desencadeiam uma exposição insatisfatória junto com os efeitos adversos e tóxicos devido à precipitação e agregação de fármacos. ³

A baixa solubilidade de uma molécula depende de várias variáveis, como coeficiente de partição (LogP > 3), estrutura química (mais de 5 doadores de ligações de hidrogênio) e soma de grupos –N e –O na estrutura química (> 10), peso molecular (> 500). ^{1,4} Diversas estratégias de nanotecnologia foram sugeridas para aumentar as taxas de dissolução e a biodisponibilidade de fármacos que são pouco solúveis em água, entre estas destacam-se a produção de partículas pequenas com maior área de superfície de contato, a alteração das formas cristalinas e a projeção de novos nanocarreadores. ⁵⁻⁷ Os sistemas nanométricos em geral podem atuar como veículo de entrega dos fármacos para proteger fármaco da degradação prematura e melhorar os perfís de farmacocinética e biodistribuição dos agentes terapêuticos encapsulados. ⁸

Nos tratamentos do câncer, a entrega intracelular dos agentes terapêuticos como a maioria dos quimioterápicos e compostos como fotossensibilizadores utilizados na terapia fotodinâmica (*Photodynamic therapy*, PDT) deve ser alcançada para exercer suas eficácias, porém, geralmente apenas uma pequena fração desses agentes atinge o local do tumor. ⁹ Com o uso dos nanocarreadores tem demonstrado grande potencial de direcionamento do fármaco aos tecidos tumorais por meio do acúmulo seletivo no local aumentando sua atividade antineoplásica reduzindo a dose das administrações e os efeitos adversos sistêmicos. ^{10, 11}

Este capítulo apresenta o desenvolvimento de nanocarreadores como a microemulsão e a nanoemulsão para encapsular o fotossensibilizador, Hipericina (Hy), empregado na PDT para o tratamento do câncer.

1.1. Hipericina e Terapia fotodinâmica

Hy é um pigmento natural originalmente extraído da *Hypericum perforatum*, conhecida como erva de São João, amplamente empregada para o tratamento de depressão. ¹² Devido às

suas propriedades fotofísicas, tais como absorção da luz visível em 560-595 nm e alto rendimento quântico de oxigênio singleto, Hy é usada como um potente fotossensibilizador na PDT para os tratamentos de infecções fúngicas, bacterianas e virais, e diversos tipos de câncer. ¹³⁻¹⁵ Figura 1 apresenta a estrutura molecular de Hy e seu espectro de absorção.

Figura 1. Espectro de absorção UV-Vis e a estrutura molecular de Hy 30 μ mol L⁻¹ em DMSO.



Fonte: Autoria própria

O procedimento clínico da PDT é aplicado em dois estágios, primeiramente, a administração intravenosa, intraperitoneal ou tópica de fotossensibilizador, seguido por uma exposição à luz. ¹⁶ Figura 2 mostra os principais mecanismos da Hy-PDT através do diagrama de Jablonski. No início, Hy absorve a luz do seu comprimento de absorção e é excitada para seu estado singlete, em seguida, o composto sofre o processo de cruzamento inter-sistema e decai para o estado triplete, neste estado a molécula transfere elétrons ou energia para o oxigênio resultando em dois tipos de mecanismos, o tipo I forma as espécies reativas de oxigênio (ROS) como os ânions de superóxidos, peróxidos de hidrogênio e radical hidroxila, os quais são capazes de oxidar uma variedade de biomoléculas provocando morte celular. O tipo II ocorre pela excitação do oxigênio tripleto (³O₂) que produz o oxigênio singleto (¹O₂), este mecanismo é geralmente favorecido nas reações de fotoxidação. ¹³ O oxigênio singleto, quando gerado, pode reagir rapidamente com os componentes celulares, como a membrana celular, ácido nucleico, peptídeos e moléculas envolvidas na manutenção estrutural da membrana, tais como fosfolipídios esteróis e peptídeos, as reações fotoxidativas ocasionam alterações da permeabilidade celular, provocando a morte do tecido tumoral via necrose ou

apoptose. ¹⁷ Em um estudo comparativo, Hy demonstrou maior fototoxicidade do que os fotossensibilizadores comerciais, como o derivado de hematoporfirina (Photogem[®]) e um derivado de clorina e6 (Photodithazine[®]) em condições semelhantes contra células tumorais da laringe (HEp-2). ¹⁸

Figura 2 Diagrama de Jablonski e os principais mecanismos da PDT.



Fonte: Adaptado 19

A Hy-PDT demonstrou grandes vantagens sobre quimioterapias convencionais, apresentando mínimos efeitos adversos e alta seletividade, juntamente com o baixo potencial de resistência cruzada com agentes quimioterápicos. ²⁰ Além disso, o efeito citotóxico pode ser controlado pelo posicionamento cuidadoso da fonte de iluminação e, a luz visível empregada para ativar Hy é inofensiva e se diferencia dos comprimentos de onda de absorção por outros cromóforos teciduais, como hemoglobina, melanina, aminoácidos, água e gordura, garantindo a entrega eficiente da luz no tecido tumoral. ²¹ A Hy-PDT é reconhecida como um tratamento eficaz para vários tipos de câncer, incluindo bexiga, ovário, pâncreas, mama, nasofaringe e pele. ²²⁻²⁷ Diversos estudos também mostram os excelentes resultados terapêuticos usando o tratamento sinérgico da PDT junto com outras terapias como quimioterapia, cirurgia, radioterapia, hipertermia e imunoterapia. ²⁸⁻³²

Hy é considerada um fotossensibilizador eficiente a ser utilizado na PDT, Entretanto, devido à alta hidrofobicidade de Hy, formam-se facilmente agregados em meio aquoso dificultando a administração clínica e a eficiência terapêutica ³³. Embora haja várias tentativas visando a transformar Hy em composto mais hidrofílico através da adição de radicais polares como acetato e glucamina, ^{34, 35} outras fizeram encapsulação com nanopartículas, lipossoma e ciclodextrina, ³⁶⁻³⁸ porém ainda requer um sistema mais eficiente e estável que biodisponibilize a molécula durante o tratamento clínico.

1.2. Emulsões

As emulsões são sistemas coloidais constituídos pelas duas fases imiscíveis (fase aquosa e fase oleosa). O processo de emulsificação ocorre através do emprego de energia e a adição dos tensoativos para fracionar a fase dispersa em pequenas gotículas que ficam suspensas em fase dispersante. ³⁹ Podem existir dois tipos principais: óleo-em-água (O/A) e água-em-óleo (A/O) (Figura 3-A), de acordo com o tipo de fase dispersante constituinte. ³⁹ A estabilidade de emulsões depende do uso de tensoativos, que são compostos que possuem uma cauda hidrofóbica e cabeça hidrofílica; os tipos de tensoativos são geralmente classificados pela parte hidrofílica do composto como não iônicos, aniônico, catiônico e anfótero (Figura 3-B). ⁴⁰ Estes atuam na interface entre a água e o óleo, equilibrando o sistema pela redução da tensão superficial e evitar coalescência das gotículas. Os tensoativos catiônicos como os sais quaternários de amônio produzem cargas positivas em meio aquoso. Enquanto, os tensoativos aniônicos produzem cargas negativas, como os exemplos de sabões e os compostos sulfonados e sulfatados. Já os não-iônicos como os ésteres de carboidratos, as amidas de álcoois graxos e os óxidos de amidas graxas, não formam íons. Os anfóteros geram cargas positivas e negativas, dependendo do pH do meio aquoso, em meio ácido atuam como catiônicos, e em meio alcalino atuam como tensoativos aniônicos, o dodecil sulfato de sódio (SDS) é o exemplo.⁴¹



Figura 3. A) tipos de emulsões: óleo em água (O/A) e água em óleo (A/O), B) tipos de tensoativos: não-iônico, aniônico, catiônico e anfótero.

Fonte: Adaptado 40

A fase oleosa desempenha um papel vital nos sistemas de emulsão, pois solubiliza os fármacos lipofílicos destinados a serem entregues nos tratamentos de doenças. ⁴² Os principais parâmetros utilizados na seleção de fase oleosa estão relacionados, principalmente, à toxicidade, capacidade de obtenção de um sistema coloidal estável e características de solubilidade do fármaco a ser veiculado. ⁴³ Os solventes orgânicos como ácidos graxos e os lipídios são compostos extremamente lipofílicos e exercem atividades importantes no organismo animal, pois são componentes de membranas celulares, fonte e armazenamento de energia, precursores de moléculas biologicamente importantes como hormônios e vitaminas, responsáveis pela proteção contra perda de calor e diversas outras funções nutricionais. ⁴⁴ O grau de insaturação de ácidos graxos administrados também influencia a extensão do transporte de lipídios e fármaco pelo sistema linfático, geralmente, os mono e poli-insaturados ácidos graxos promovem o transporte de lipídios e estimulam a suas absorções pelos linfáticos mais prontamente e efetivamente quando comparados com os ácidos graxos saturados equivalentes. ⁴⁵

O principal método utilizado para selecionar o tensoativo (ou pares de tensoativos) ideal a um sistema de emulsão é através do sistema Equilíbrio Hidrofílico - Lipofílico (EHL) que foi desenvolvido por Griffin, em 1949. ⁴⁶ O sistema EHL classifica os tensoativos em uma escala adimensional que varia de 1 a 20, de acordo com a sua natureza lipofílica (valores mais baixos) ou hidrofílica (valores mais altos) indicando a preferência de migração do tensoativo na interface óleo/água (Figura 4). Tensoativos com valores de EHL mais baixos tendem a produzir emulsões A/O, enquanto tensoativos de EHL mais alto produzem emulsões O/A. Figura 4. Escala de Griffin do EHL com classificação e função dos tensoativos.



Fonte: Adaptado 46.

Para cada composto da fase oleosa é possível determinar seu valor de EHL requerido e, por conseguinte, o tensoativo ou a mistura de tensoativos adicionados é necessário atender a este valor. Uma mistura de tensoativo cujo valor de EHL é obtido pela adição dos valores de EHL dos tensoativos individuais, multiplicada pela proporção de cada tensoativo utilizado (Equação 1). ⁴⁶

$$EHLm = \frac{(EHLl \cdot X + EHLh \cdot Y)}{100}$$
(1)

- EHL m = EHL da mistura dos tensoativo e co-tensoativo
- EHL l = EHL do tensoativo lipofílico
- EHL h = EHL do tensoativo hidrofílico
- X Porcentagem do tensoativo lipofílico utilizada
- Y Porcentagem do tensoativo hidrofílico utilizada

As emulsões estáveis, sem sinais de instabilidade como floculação e coalescência, podem ser formuladas a partir da adição de um tensoativo ou uma mistura deste com o valor de EHL

próximo do requerido pela fase oleosa. ⁴⁷ É possível encontrar na literatura os valores de EHL requeridos para alguns dos óleos mais utilizados, o que facilita a escolha do tensoativo a ser utilizado no preparo de emulsões A/O ou O/A, e otimizar o preparo de emulsões reduzindo o número de experimentos que seria necessário para a escolha empírica da fase de tensoativo. ⁴⁸

As emulsões lipídicas são usadas como carreadores dos compostos lipofilicos que podem aumentar a biodisponibilidade e biodistribuição dos agentes terapêuticos no organismo humano e minimizar a toxicidade por meio do acúmulo seletivo no local alvo. ⁴⁹ Nas formulações lipídicas, o fármaco é mantido num estado solubilizado antes da aplicação, isso oferece grande vantagem como a exploração dos mecanismos inatos de absorção de lipídios pela membrana plasmática, além disso, a diversidade de excipientes lipídicos permite a flexibilidade de formulação e menores riscos de precipitação de fármaco no organismo. ⁵⁰

Destacam-se as microemulsão (ME) e nanoemulsão (NE) pela facilidade do processo de produção, baixa toxicidade e alta eficiência como promissor veículo para administração de fármacos. ⁵¹ A principal característica das ME e NE é formar a fase interna oleosa por homogeneização com a fase contínua aquosa, cujas dimensões das gotículas da fase interna são da ordem nanométrica. As ME e NE são superiores às soluções micelares em termos de potencial para solubilizar os compostos, por isso, são usadas para aumentar a solubilização e a absorção de fármacos lipofílicos. ^{52, 53}

Os termos, ME e NE, são frequentemente confundidos, pois a principal diferença entre os dois não se refere ao tamanho da fase interna como os nomes sugerem, mas na composição, método de obtenção e estabilidade. ⁵⁴ Figura 5 apresenta as especificações das macroemulsões, NEs e MEs. As MEs são formadas espontaneamente, termodinamicamente estáveis e menos sensíveis às mudanças de temperatura e composição, embora muitas vezes requerem maiores quantidades de tensoativos e co-tensoativos. 55 Macroemulsões e NEs são ambas termodinamicamente instáveis, ou seja, pode ocorre a separação de fase após um tempo determinado, entretanto, como as NEs requerem uma entrada significativa de energia para a formação, por isso as quais podem ser obtidas com menos tensoativos e, devido ao tamanho reduzido da fase interna, as NEs são cineticamente estáveis em um tempo mais longo. 54 A estabilidade termodinâmica em dispersões coloidais é determinada pela diferença de energia livre da dispersão com a energia livre de cada fase, óleo e água. Em uma NE, a energia livre da dispersão coloidal é mais alta do que a energia livre das fases separadas, o que significa que a NE é instável do ponto de vista termodinâmico. Já em uma ME, a energia livre da dispersão coloidal é mais baixa do que a energia livre quando as fases estão separadas. Dessa forma, a estabilidade termodinâmica das MEs oferece vantagens sobre as dispersões instáveis, tais como as suspensões e emulsões, possuindo tempo de vida útil muito mais amplo.⁵⁶

Figura 5. Comparação de macroemulsões, NEs e MEs com relação ao tamanho, formato, estabilidade, método de preparação e PDI.

	Macroemulsões	Nanoemulsões	Microemulsões
	SOJAT		o/w
Tamanho	1-100 µm	20-500 nm	10-100 nm
Formato	Esférico	Esférico	Esférico ou lamelar
Estabilidade	Termodinamicamente instável e pouco cineticamente estável	Termodinamicamente instável e cineticamente estável	Termodinamicamente estável
Método de preparação	Métodos de alta e baixa energia	Métodos de alta e baixa energia	Métodos de baixa energia
PDI	Alta	Baixa	Baixa

Fonte: Adaptado 54

1.3. Microemulsão (ME)

As MEs são dispersões formadas espontaneamente de dois líquidos imiscíveis que geralmente são água e óleo, estabilizados por tensoativo e co-tensoativo. São definidas como sistemas termodinamicamente estáveis, isotrópicos, transparentes, com tamanhos de gotículas da fase dispersa que varia entre 10 a 100 nm. ⁵⁷ Os agentes tensoativos desempenham papel fundamental na estabilização de MEs por possuírem a propriedade de diminuir a tensão interfacial entre o óleo e a água.

Inicialmente, quando as duas fases imiscíveis se misturam, o sistema desestabiliza devido ao aumento da tensão interfacial (γ i) e a área interfacial (Δ A) ocasionando o aumento da variação da energia de Gibbs. Entretanto, para que ocorra a formação espontânea de ME, é necessário que o sistema esteja com $\Delta G < 0$, dessa forma, adição de tensoativo e co-tensoativo torna-se essencial para o sistema gerar uma ME termodinamicamente estável com a tensão interfacial diminuída e a entropia incrementada pelo aumento do número de gotículas dispersas (Equação 2).⁵⁸

$$\Delta G = \gamma i \ \Delta A - T \ \Delta S \tag{2}$$

 ΔG = variação da energia livre de Gibbs

 $\gamma i =$ tensão interfacial entre fase aquosa e oleosa

 $\Delta A = variação da área interfacial$

T = temperatura

 $\Delta S = variação da entropia$

A formação das MEs depende principalmente do EHL do sistema, portanto, a determinação das porcentagens dos três componentes: fase aquosa, fase oleosa e fase da mistura de tensoativo e co-tensoativo na formulação é o passo primordial para obter uma ME. ⁵⁹ Os co-tensoativos são responsáveis pela redução adicional da tensão interfacial que desempenham como os fatores necessários para formar e estabilizar termodinamicamente as MEs, promovendo uma melhor fluidez do filme interfacial formado pelo tensoativo. ⁶⁰ Os principais co-tensoativos utilizados no preparo de MEs são álcoois e glicóis de baixa massa molecular e que apresentam uma cadeia de carbono entre dois e dez carbonos.

Para este fim, utiliza-se os diagrama de fases ternarias ou pseudoternárias, estes representas os três componentes em que cada vértice do triângulo equilátero como 100% de um componente em particular, por conseguinte, as propriedades desse triângulo são exploradas, ou seja, a soma dos lados perpendiculares de determinado ponto no diagrama é igual a sua altura. ⁵⁸

As MEs são basicamente compostas por quatro componentes (água, óleo, tensoativo e co-tensoativo), como existe mais de um composto no eixo da fase de tensoativo, o diagrama passa a ter nome de diagramas de fases pseudoternárias. ⁶¹ Figura 6 apresenta um diagrama de fases pseudoternárias, onde em cada vértice do triângulo representa 100% de um componente ou uma mistura de componentes. O diagrama ilustra os efeitos das diferentes concentrações e permite verificar qual é a concentração ideal de tensoativo para determinado sistema, pois os sistemas microemulsionados podem ser diferenciados visualmente dos outros sistemas. A partir

desses dados, pode-se selecionar a região dos sistemas microemulsionados através dos aspectos visuais como emulsões opticamente transparentes, líquidas opacas, géis (cristais líquidos) e separação de fases. ⁶¹ Essa interpretação possibilita a seleção da região cujo aspecto e constituição sejam mais favoráveis à incorporação de um fármaco.

Figura 6. Regiões hipotéticas de sistemas de ME são estimadas pelo diagrama de fases pseudoternárias de óleo, água, tensoativo e co-tensoativos.



Fonte: Adaptado 51

As MEs possuem alta capacidade de solubilização para compostos hidrofílicos e hidrofóbicos, devido aos seus tamanhos reduzidos das gotículas, e oferecem vantagens como transportes de fármacos pouco solúveis em água. ⁵⁵ Além disso, por apresentar quantidades apreciáveis de água e óleo, essas constituem um excelente meio de solubilização de compostos polares e apolares, suportando altas concentrações de fármacos nas fases aquosa e oleosa ⁶¹. Incrementam-se a solubilização, dissolução, biodisponibilidade e a potência clínica de fármacos permitindo liberação prolongada e transporte de fármacos pela via oral, parenteral, tópica, pulmonar, ocular e vaginal no campo farmacêutico. ⁶²⁻⁶⁵ Principalmente para veicular fármacos lipofílicos como quimioterápicos, antibióticos, esteróides e hormônios. ⁶⁶

As MEs são excelentes nanocarreadores para os fármacos hidrofóbicos e apresentam vantagens sobre outros sistemas coloidais como emulsões, suspensões e soluções micelares, devidos a suas altas capacidades de solubilização com sistemas de liberação de fármacos que

são capazes de melhorar a especificidade, atividade terapêutica e reduzir a toxicidade de fármacos permitindo a liberação sustentada ou controlada em diversas vias de administração, tais como a tópica local, transdérmica, oral, nasal, ocular e parenteral. ⁶⁷⁻⁷⁰

As aplicações de MEs abrangem diversas as áreas como alimentícia, cosmética e farmacêutica e exercem como meios de solubilização para os compostos hidrofílicos, hidrofóbicos, anfifílicos e materiais funcionais. ⁷¹ A potencial atração técnica das MEs está principalmente ligada às suas propriedades como a estabilidade termodinâmica, alta capacidade de solubilização e aspecto visual límpido. ⁷¹

1.4. Nanoemulsão (NE)

As NEs apresentam as gotículas com diâmetros na ordem de 100 nm. ⁵⁴ São termodinamicamente instáveis e cineticamente estáveis, devido à adição de tensoativo, que é uma molécula anfifilica, capaz de diminuir a tensão interfacial e se adsorver na interface entre a fase dispersa e a dispersante para promover a estabilidade do sistema e evitar uma possível separação de fases. ⁵⁶ Devido à presença das nanogotículas da fase dispersa, as NEs tendem a ser transparentes ou translúcida, e têm excelente estabilidade em relação à separação gravitacional, sedimentação e precipitação ao comparar com as emulsões convencionais, embora não sejam termodinamicamente estáveis como as MEs. ⁵⁴

As NEs são menos suscetíveis a processos de cremação ou sedimentação mesmo sendo termodinamicamente instáveis. ⁵⁴ Essa estabilidade se deve a diversos fatores, tais como: a presença de uma barreira formada por tensoativos que encapsula a fase oleosa separando-a da fase aquosa, as forças de repulsão eletrostáticas entre as gotículas que ajudam a mantê-las afastadas uma das outras evitando assim a probabilidade de agregação e a quebra da NE, e o reduzido tamanho de gotículas que garante propriedades físicas especiais as nanoemulsões, pois em escala atômica as forças como a gravidade se tornam menos efetivas sobre elas, dificultando assim a sedimentação. ⁵⁴ Outros fatores que tornam as NEs interessantes para aplicação farmacêutica são as possibilidades de liberação controlada em sítio específico, viabilizando a administração de fármacos que apresentem baixa biodisponibilidade e elevado número de efeitos colaterais, além de possibilitar que ativos insolúveis em água sejam administrados em formulações hidrofílicas. ⁷² As nanogotículas fornecem uma área de contato estendida para as células, facilitando sua permeação através da membrana plasmática e aumentando a biodisponibilidade.

As NEs podem ser aplicadas em diversas vias de administração de fármacos tais como

ocular, oral, pulmonar, tópica e parenteral. ⁷³⁻⁷⁷ Além disso, muitos problemas enfrentados na cristalização e precipitação dos fármacos durante a administração podem ser evitados com NEs. ⁴⁴ A indústria de alimentos emprega as NEs com a finalidade melhorar a digestão e absorção da curcumina e β-caroteno. ^{78, 79}

Os métodos convencionais para produção de NEs são classificados como processos de alta e de baixa energia. Utiliza-se uma fonte de energia externa para auxiliar na superação da força interfacial entre dois líquidos imiscíveis e promover a formação de grande quantidade de gotículas de fase dispersa em escala nanométrica, isto é a característica principal que as difere das MEs. ⁵¹ O processo de alta energia utiliza equipamentos mecânicos, tais como homogeneizadores de alta pressão, ⁸⁰ microfluidizadores ⁸¹ e geradores de ultrassom ⁸², que são capazes de gerar forças de cisalhamento intensas para quebrar estruturas da ordem de micrômetros em nanômetros (Figura 7A). Os processos de baixa energia começam com macroemulsões A/O e quebram as gotículas maiores em gotículas menores à medida que passam por um estado de baixa tensão interfacial para inverter as fases contínua e dispersa. Este processo pode ser feito por induzir uma inversão de fase (inglês, *Phase Inversion Temperature -* PIT), ⁸³ ou por induzir uma inversão de fase por diluição de água com o método conhecido por ponto de inversão da emulsão (inglês, *Emulsion Inversion Point –* EIP) (Figura 7B). ⁸⁴

Em geral, o emprego da alta energia externa na produção de NE é considerada mais eficiente por ajudar a superar a tensão interfacial entre dois líquidos imiscíveis, resultando num grande número das nanogotículas da fase dispersa. ⁵¹ A ultrasonicação utiliza a cavitação ultrassônica para quebrar as gotículas em tamanho nanométrico, através dos diferentes parâmetros como a potência e amplitude da sonicação e temperatura. ⁸⁵ Em comparação com outros métodos, como homogeneizador e microfluidizador de alta pressão, os tamanhos das gotículas produzidas por ultrasonicação são relativamente menores, com boa estabilidade. Além disso, a ultrasonicação traz vantagens convenientes, como facilidade de limpeza e operação da máquina e baixo custo de manutenção. ⁸⁶

Figura 7. Visão geral dos métodos de alta e baixa energia para a preparação de NEs O/A. A) de alta energia: homogeneizadores de alta pressão e ultrasonicação de ponteira, B) de baixa energia: ponto de inversão da emulsão e temperatura de inversão de fase.



Fonte: Adaptado 54.

2. Objetivos

O objetivo do presente capítulo foi desenvolver e caracterizar as MEs e NEs de Hy. Os objetivos específicos são:

- Selecionar as fases oleosa e os tensoativos adequados e investigar a solubilidade de Hy nestes meios;
- Desenvolver a ME a partir de diagrama de fases pseudoternárias para obtenção e identificação das regiões possíveis de formação de sistemas opticamente transparentes;
- Desenvolver a NE selecionando as concentrações adequadas das fases oleosa, aquosa e do

tensoativo, bem como os parâmetros de ultrasonicação, o tempo e potência;

- Avaliar a liberação in vitro de Hy a partir sistemas selecionados
- Avaliar a eficiência de encapsulação de Hy;
- Caracterização físico-química e estabilidade dos sistemas selecionados.
- Avaliar a citotoxicidade, fototoxicidade, acumulação intracelular e geração intracelular de ROS aplicando NEs de Hy e PDT nas células de câncer de mama (MCF-7).

3. Materiais e métodos

3.1. Reagentes

Hy foi sintetizada a partir da emodina antraquinona pelo Prof. Dr. Anderson O. Ribeiro da Universidade Federal do ABC, Santo André-SP, Brasil, de acordo com o protocolo ⁸⁷. Triglicerídeo de cadeia média (MCT, com > 90% de ácidos cáprico e caprílico foi adquirido da Atlhetica Clinical, ácido oleico foi obtido da Vetec. Phosal[®] 50 PG (50% fosfatidilcolina em propilenoglicol) foi doado pela Lipoid. Kolliphor EL (Polyoxyl 35 Castor Oil, EHL = 12-14) foi doado pela BASF. Tween 80[®] (Monolaurato de Sorbitan Etoxilado 20, EHL = 15,0), dimetilsulfóxido (DMSO), tampão de fosfato salino (PBS), solução de Giemsa, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), Sensor de oxigênio singleto verde (*Singlet Oxygen Sensor Green*, SOSG), diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA) e os meios de cultura, *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) e *Roswell Park Memorial Institute* 1640 (RPMI), foram obtidos da Sigma-Aldrich.

3.2. Curva analítica de hipericina

As soluções de hipericina em 0,005 a 1 μ g mL⁻¹ em PBS com 0,2% Tween 20 (Sigma-Aldrich) foram preparadas e obtidos espectros de emissão de fluorescência para construção da curva analítica no espectrofotômetro de fluorescência (HITACHI F-4500, Japão) com o comprimento de onda de excitação em 553 nm e emissão em 560-800 nm. O experimento foi realizado em triplicata.

3.3. Solubilidade

A solubilidade de Hy em óleos e tensoativos foi investigada com o objetivo de selecionar os componentes mais adequados para o desenvolvimento de MEs. Adicionou-se 100 μ g mL⁻¹ de Hy aos seguintes compostos: óleos (MCT, MCT + Phosal® 50 PG, ácido oleico) e tensoativos e co-tensoativo (Tween 20, Tween 80, Kolliphor EL e propilenoglicol). As misturas foram agitadas em vórtex por 3 min e centrifugadas a 3000 rpm por 10 min. 10 μ L do sobrenadante foram diluídos com 1 mL de PBS + 0,2% Tween 20 para determinar a quantidade de Hy pelo espectrofotômetro de fluorescência (HITACHI F-4500, Japão) com o comprimento de onda de excitação em 553 nm e emissão em 560-800 nm. As concentrações foram calculadas interpolando a curva analítica com soluções padrão de Hy de 0,005 a 1 μ g mL⁻¹ Hy em PBS com 0,2% Tween 20.

3.4. Preparação de ME e Construção dos diagramas de fases pseudoternárias

As MEs foram obtidas através do procedimento descrito na Figura 8, sendo que uma mistura homogênea da fase oleosa, tensoativo e co-tensoativo foi preparada e titulada com a fase aquosa até formar um sistema isotrópico e opticamente transparente. A construção do diagrama de fases pseudoternárias foi empregada como um recurso para estimar a combinação crítica entre os componentes (fase oleosa, fase aquosa e mistura dos tensoativos) até a solubilização máxima da fase dispersa.





Fonte: Autoria própria
Uma mistura dos tensoativo e co-tensoativo (Smix) na proporção de 3:1 (m/m) foi adicionada à fase oleosa nas proporções de 1:9, 2:8, 3:7, 4:6, 5:5, 6:4, 7:3, 8:2 e 9:1. Em seguida, titulou-se com a fase aquosa adicionando volumes de 500 µL de água deionizada com 10% de etanol cada vez à temperatura ambiente. Durante a titulação, a mistura foi homogeneizada sob a agitação em vórtex, por 1 min, e as mudanças do aspecto visual foram observadas. Após as titulações, as proporções dos componentes dos sistemas foram registradas para a construção do diagrama de fases pseudoternárias selecionando os sistemas de acordo com a observação visual ⁸⁸. Apenas as dispersões transparente ou translúcida com boa fluidez foram consideradas como região hipotético de ME no diagrama, essa área sombreada em cada diagrama de fase foi plotada indicando melhor eficiência de microemulsificação. Nenhum aquecimento foi conduzido durante a preparação. Após a otimização dos parâmetros, Hy foi incorporada na fase oleosa, e prosseguiram-se todas etapas de produção de ME.

3.5. Preparação de NE

As NEs óleo-em-água (O/A) foram preparadas pelo método de ultrasonicação. Em um experimento típico, 2,5% da fase oleosa (ácido oleico ou MCT + 3% Phosal[®] 50 PG), e tensoativo (Tween 80 ou Kolliphor EL) em diferentes proporções (1: 1, 1: 3 e 1: 5) (m/m) foram misturados sob agitação magnética durante 10 min. Em seguida, foi adicionada água para completar a massa final de 20 g. A emulsificação da mistura foi processada em um sonicador (Sonics Vibra-Cell VCX 500) com uma amplitude de 60% e potência máxima de 750 W, em vários intervalos de sonicação para obter NE. Uma sonda de ultrassom com 13 mm de diâmetro foi utilizada para a geração das ondas ultrassônicas. Durante o processo de sonicação, a amostra foi mantida em um banho de gelo. Após a otimização dos parâmetros, Hy foi incorporada na fase oleosa, e prosseguiram-se todas as etapas de produção de NE. A formação de NE foi finalizada com injeção de água e o valor de pH ajustado para 7,0 com 0,1 mol L⁻¹ HCl ou 0,1 mol L⁻¹ NaOH. Por fim, as NEs foram filtradas usando um filtro estéril com diâmetro de poro de 0,22 μ m. O processo esquemático de preparação da NE é mostrado na Figura 9.



Figura 9. Esquema de preparação de NE utilizando a ultrasonicação de ponteira.

Fonte: Autoria própria

3.6. Caracterização físico-química das nano e micro emulsões

3.6.1. Determinação de pH, condutividade elétrica, zeta potencial e tamanho de partícula

As MEs e NEs em branco e carregadas de Hy foram avaliadas primeiramente por centrifugação (Eppendorf, 5430 R, Alemanha) 1 mL de NEs (3000 rpm) por 25 min em temperatura ambiente. Após a observação da ausência de separação de fases da amostra, Zetasizer NanoS90 (Malvern Instruments Ltd.) foi empregado para determinar os tamanhos médios de gotículas e índices de polidispersidade (PDI) por espalhamento de luz dinâmico (*Dynamic Light Scattering*, DLS) usando um ângulo de espalhamento de 90°, e o potencial zeta (ζ) foi determinado pela técnica de microeletroforese aplicando um campo elétrico na amostra. As amostras foram diluídas em água destilada na proporção 1:10 para evitar o efeito de espalhamento múltiplo.

A morfologia das gotículas das NEs foi verificada por microscopia eletrônica de transmissão (*Transmission electron microscopy*, TEM). Após a diluição da amostra com água (1:10), uma gota de amostra diluída foi depositada em uma grade de cobre de malha 300 revestida com carbono e Formvar (Ted Pella Inc.,), o excesso foi retirado com um papel de filtro, subsequentemente corado com ácido fosfotúngstico 1% (Vetec) por 30 s. Após 24 h de secagem, a amostra foi analisada em microscópio eletrônico de transmissão (JEM-2100, JEOL) operado a 200 kV. As NEs e MEs de Hy foram caracterizadas por espectrômetro de fluorescência (HITACHI F-4500) com comprimento de onda de excitação em 553 nm e emissão em 560-800 nm em uma cubeta de quartzo com percurso óptico de 1 cm. As condutividades elétricas foram medidas por meio do condutivímetro DIGIMED®, modelo CD-40. O pH das

formulações foi medido em triplicata a 25 °C usando um medidor de pH calibrado (Mettler Toledo MP 220).

1.4.1. Determinação de viscosidade

A caracterização reológica das MEs e NEs de Hy foi realizada pelo Discovery Hybrid Rheometer (DHR-2, TA-Instruments, Estados Unidos) usando cilindros concêntricos DIN (Bob 28 mm de diâmetro e 42 mm de comprimento). O experimento foi realizado com 10 mL de amostra fresca e a taxa de cisalhamento foi aumentada gradualmente de 7,5 até 292,6 s⁻¹. A temperatura foi mantida a 25 °C para todos os experimentos e medições reológicas. Cada experiência foi repetida em triplicado.

1.4.1. Eficiência de encapsulação

A eficiência de encapsulação de Hy nas MEs e NEs foi determinada pelo método de ultrafiltração usando dispositivos de filtro centrífugo Amicon[®] 100 kDa MWCO de celulose regenerada (Millipore, Estados Unidos). A formulação carregada de Hy 100 µg mL⁻¹ (1 mL) foi colocada na câmara do doador superior e a unidade foi centrifugada a 8.000 rpm por 40 min. Hy encapsulada permaneceu na câmara doadora, e a fase aquosa moveu-se para a câmara receptora através do filtro. A concentração de Hy na câmara doadora foi quantificada em espectrofotômetro de fluorescência (a excitação em 553 nm e emissão em 560-800 nm) através da curva analítica pré-determinada. A eficiência de encapsulamento (%) foi calculada usando a equação: [(T - C)/T] x 100%, onde *T* é a quantidade total de Hy, e *C* é a quantidade de Hy detectada apenas na câmara doadora.

1.6.2. Estabilidade

A estabilidade de 100 µg mL⁻¹ das MEs e NEs carregadas com Hy foi monitorada durante 180 dias. Todas as formulações foram armazenadas em um frasco de vidro sob proteção contra a luz e colocadas em diferentes temperaturas de armazenamento 5 °C, 25 °C e 37 °C. As formulações foram avaliadas após 24 h de produção e a cada 30 dias quanto ao tamanho das partículas, PDI, potencial zeta, conteúdo de Hy e alteração visual.

3.7. Cinética de liberação in vitro de Hy

A liberação de Hy de DMSO, PBS e NEs foi avaliada. A formulação contendo Hy a 10 μ g mL⁻¹ foi inserida e selada no tubo de diálise de 14 kDa da membrana de acetato de celulose (D9277, Sigma-Aldrich) e imersa no meio receptor de 10 mL de 0,2% Tween 20 em PBS a 37 °C sob agitação magnética de 500 rpm (IKA®-Werke RT15-P). Em intervalos apropriados, 1mL do meio receptor foi retirado e imediatamente reabastecido com um volume igual de meio fresco. A Hy liberada foi quantificada usando um espectrofotômetro de fluorescência (HITACHI F-4500) com o comprimento de onda de excitação em 553 nm e emissão em 560-800 nm. As concentrações foram calculadas interpolando a curva analítica com soluções padrão de Hy de 0,005 a 1 μ g mL⁻¹ Hy em PBS com 0,2% Tween 20.

3.8. Geração de oxigênio singleto

A geração de oxigênio singlete foi analisada usando SOSG. Cada amostra (Hy livre em PBS, DMSO e as MEs carregadas com Hy) foi adicionada ao SOSG a 5 µmol L⁻¹ para uma concentração final de 20 µmol L⁻¹ Hy. As amostras foram então irradiadas com LED amarelo (590 ± 10 nm) em uma irradiância de 8,4 mW cm⁻² por 20 min. A fluorescência de SOSG ($\lambda ex/\lambda em = 488/525$ nm) foi monitorada com um Synergy H1 Hybrid Multi-Mode Reader (BioTek Instruments, Inc.).

3.9. Cultura celular

As linhagens de células de fibroblastos de camundongo (*Mus musculus*) BALBc /3T3 clone A31 (3T3) (ATCC® CCL-163TM), de células de melanoma murino (B16F10) (ATCC® CCL-6475TM) e de adenocarcinoma mamário humano (MCF-7) (ATCC® HTB-22TM) foram cultivadas em substrato plano e sólido da garrafa de poliestireno. Utilizou-se o meio de cultura DMEM para células 3T3 e B16F10, o meio de cultura RPMI para as células MCF-7, ambos suplementados com 10% de soro fetal bovino (Cultilab) e antibióticos penicilina 10 000 U.I. mL⁻¹ e estreptomicina 10 mg mL⁻¹ (Cultilab). As células foram mantidas em estufa a 37 °C e 5% CO₂.

3.10. Ensaios de citotoxicidade e fototoxicidade

Para investigar as citotoxicidade e fototoxicidade das MEs, empregaram-se as células de 3T3 e B16F10, Já para as NEs, as células de 3T3 e MCF-7 foram utilizadas. Em cada ensaio, 2

 \times 10⁴ células por poço foram semeadas em placas de 96 poços. Após 24 h, o meio de cultura foi removido, as células foram incubadas com concentrações crescentes de cada formulação ou de Hy por 24 h; depois desse período, os poços foram lavados com PBS por três vezes e preenchidos novamente com meio de cultura. As placas destinadas para determinação de citotoxicidade (sem irradiação, -irr) foram mantidas no escuro e, as placas para avaliação de fototoxicidade (+irr) foram submetidas à irradiação de LED amarelo com emissão em 590 ± 10 nm a uma irradiância de 8,4 mW cm⁻² por 20 min. Para ambos tipos de testes, as placas foram incubadas por outro 24 h para a determinação da viabilidade celular.

A viabilidade celular foi determinada pelo método colorimétrico do MTT. Após 24 h de incubação, o meio de cultura foi substituído por 50 μ L de 1 mg mL⁻¹ de MTT solubilizado em meio de cultura. Depois de 3 h de incubação, a solução de MTT foi removida, adicionou-se 50 μ L de etanol para solubilizar os cristais de formazan e 150 μ L de uma mistura de PBS e álcool isopropílico 50% (v/v). A seguir, determinou-se a absorbância em 570 nm no leitor de placa (Multiskan GO, Thermo Scientific). O valor da concentração inibitória média (IC₅₀) representa a concentração necessária de fotossensibilizador para inibir a metade da população celular, foi obtido através da curva dose-resposta processada pelo programa GraphPad Prism, a partir de três experimentos independentes.

3.11. Análise de morfologia celular

As alterações morfológicas induzidas pelo tratamento da PDT com as NEs contendo Hy e Hy livre em suspensão foram analisadas por coloração com Giemsa. As células MCF-7 foram semeadas em uma placa de 24 poços a uma densidade de 2×10^4 células por poço. Após 24 h, as células foram tratadas com NEs contendo Hy e Hy livre nas duas vezes das concentrações de IC₅₀ e incubadas por 24 h. Os poços foram lavados três vezes com PBS para retirar o excesso de Hy, após a reposição do meio de cultura, os poços foram irradiados por um conjunto de LEDs amarelos ($\lambda = 590 \pm 10$ nm) e uma dose de luz 10 J cm⁻². Posteriormente, as células foram fixadas com metanol por 1 min, coradas com coloração Giemsa por 5 min, o excesso do corante foi removido e cada poço foi lavado três vezes com água deionizada. As características morfológicas foram examinadas no microscópio de luz invertida (Olympus CKX41, Japão). As amostras não tratadas: i) sem Hy e mantidas no escuro, ii) com Hy e mantidas no escuro, iii) sem Hy e submetidas à irradiação, foram consideradas como o controle negativo do experimento.

3.12. Acumulação intracelular de Hy e de ROS

As células MCF-7 (2 × 10⁴ células por poço) foram semeadas numa lâmina com 8 poços (Nunc[™] Lab-Tek[™] II, Thermo Fisher Scientific) e incubadas a 37 °C e 5% CO₂. Após 24 h, o meio de cultura foi retirado, a Hy livre ou encapsulada em NEs foi incubada por 24 h. Após a incubação, os poços foram lavados com PBS três vezes para remover o resíduo de Hy. A lâmina foi observada sob microscopia confocal de varredura a laser (CLSM, LSM 780, Carl Zeiss) usando o comprimento de onda de excitação de 543 nm gerado por um feixe de laser He-Ne. A emissão de fluorescência foi detectada em um comprimento de onda de 590 nm. Além disso, foi feito o controle para cada lâmina, no qual as células não foram incubadas com Hy para mostrar que nessa condição, as células MCF-7 não possuem autofluorescência.

A geração de ROS intracelular foi analisada pelo ensaio de DCFH-DA. As células MCF-7 (5 × 10⁴ células por poço) foram expostas a Hy 200 nmol L⁻¹ livre (em> 0,1% DMSO) e encapsulada em NEs por 24 h. Em seguida, as células foram incubadas com meio de cultura RPMI e 2 mM H₂O₂ por 2 h, consideradas como os controles negativo e positivo, respectivamente. Posteriormente, as células foram incubadas com DCFH-DA (20 μ M) a 37 °C por 30 min. Após a lavagem com PBS três vezes, as células foram expostas LED amarelo (590 ± 10 nm) a uma irradiância de 8,4 mW cm⁻² por 20 min. ROS intracelulares convertem DCFH-DA não fluorescente em diclorodihidrofluoresceína (DCF) emitindo fluorescência verde, as imagens fluorescentes foram capturadas pelo microscópio de fluorescência invertido (Zeiss Axiovert 200M).

3.13. Análise estatística

Os resultados quantitativos foram apresentados em médias \pm desvio padrão (DP) de pelo menos três valores obtidos pelos três experimentos independentes. A significância estatística entre os grupos experimentais foi analisada pelo teste de análise de variância (ANOVA) e pósteste de Tukey. O nível de significância estatística foi definido em p < 0.05.

4. Resultados e discussões

5.1. Curva analítica de hipericina

Estabeleceu-se a curva analítica cuja faixa de trabalho de 0,005 a 1,00 µg L⁻¹. Os

coeficientes angular e linear obtidos foram 2334,93 e 36,22, respectivamente. O coeficiente de correlação (R²) foi 0,99.



Figura 10. Curva analítica de Hy com faixa de trabalho de 0,005 a 1,00 μ g L⁻¹ (R² = 0,99).

Fonte: Autoria própria

5.2. Solubilidade de Hy em tensoativos, co-tensoativos e óleos

Ao iniciar o desenvolvimento de um nanosistema para a encapsulação do fármaco, o passo primordial é a seleção dos componentes da formulação. Há alguns critérios relevantes que devem ser atendidos, como ausência de toxicidade e irritabilidade, capacidade de solubilização do fármaco a ser incorporado no sistema e de formar o sistema desejado. Hy é um composto lipofílico, insolúvel em água e solúvel em solventes orgânicos como DMSO e etanol.

O teste de solubilidade de Hy 100 μ g mL⁻¹ foi feito em diferentes meios: ácido oleico, óleo de soja, óleo de linhaça, óleo de oliva, Phosal[®] 50 PG, propilenoglicol, MCT, Tween 80[®], Tween 20[®] e Kolliphor EL. A quantificação de Hy no sobrenadante foi determinada pela curva analítica previamente estabelecida utilizando a espectroscopia de emissão de fluorescência, a amostra foi diluída 100 vezes em PBS com 0,2% de Tween 20.

Figura 10 mostra a solubilidade de Hy em diferentes meios. Hy foi solúvel em Tween 80, Tween 20, Kolliphor EL, propilenoglicol e ácido oleico; entretanto, não foi solúvel nos óleos contidos a mistura de triglicerídeos de cadeia longa e média, tais como os óleos de soja, linhaça, oliva e parcialmente solúvel em MCT. Assim, foi necessária a adição de 3% Phosal[®] 50 PG para auxiliar a solubilização de Hy em MCT. Phosal[®] 50 PG contém 50% de fosfatidilcolina, esta é o fosfolipídio principal da lecitina que possui a função como emulsificante. ⁸⁹ O ácido oleico é um composto biocompatível hidrofóbico que atua como um intensificador de permeação devido à sua partição no estrato córneo, desestabilizando os lipídios da pele. ⁹⁰





Fonte: Autoria própria

De acordo com os dados obtidos de solubilidade de Hy, foram selecionados o ácido oleico e MCT com 3% Phosal[®] 50 PG para atuar na fase oleosa, Tween 80, Tween 20, Kolliphor EL e propilenoglicol para fase de tensoativo e co-tensoativo.

5.3. Microemulsão

Para o desenvolvimento de ME, dois sistemas foram selecionados: I) ácido oleico combinado com Tween 20 e propilenoglicol, II) MCT+ 3% Phosal[®] 50 PG combinado com Tween 80 e propilenoglicol, para construir o diagrama de fases pseudoternárias. Posteriormente, as combinações ideais de proporções de tensoativo e co-tensoativo (propilenoglicol) foram determinadas como 3:1 (m/m) para se adequar aos valores de EHL necessários dessas fases de óleo. Os valores finais de EHL foram de até 10 para gerar O/A ME, a alta solubilidade leva a associação do fármaco à fase oleosa e a mistura correta de tensoativos EHL contribui para a formação de uma ME estável após diluição com água. ⁴⁷ O uso de co-tensoativo como o

propilenoglicol auxilia na diminuição da tensão interfacial e da viscosidade. Além disso, os tensoativos não iônicos, como Tween 80 e Tween 20, são menos tóxicos que os tensoativos iônicos e possuem a concentração micelar crítica mais baixa, oferecendo estabilidade em um ambiente biológico. ⁴⁸

5.2.1. Construção de diagrama de fases pseudoternárias

O conjunto da fase oleosa (O) e a mistura de tensoativo e co-tensoativo (Smix) foram tituladas com a fase aquosa (A). Com base nos resultados das triagens preliminares, foi delimitado o domínio dos pontos, nos quais ocorre a máxima solubilização da fase dispersa formando um sistema homogêneo, transparente, translúcido e isotrópico, característica típica da ME. A Figura 11 mostra os diagramas de fase pseudoternárias, nos quais as formulações M1C e M2A foram selecionadas para incorporação da Hy devido ao seu teor máximo de água e menor teor de tensoativo possível.

O diagrama de fases pseudoternárias é uma ferramenta importante nos estudos de ME, visto que é conveniente obter uma combinação crítica entre os componentes, na qual a solubilização da fase dispersa é máxima.

Figura 12. Diagramas de fases pseudoternárias foram empregados para mostrar a influência da composição da fase oleosa na formação de ME: A = água destilada + 10% etanol, Smix = Mistura de tensoativo e co-tensoativo, O = Fase oleosa. As regiões de cor azul representam a obtenção das MEs isotrópicas. A) M1C (A = água destilada + 10% etanol, Smix = Tween 20: propilenoglicol (3: 1), O = ácido oleico). B) M1C (A = água destilada + 10% etanol, Smix = Tween 80: propilenoglicol (3: 1), O = MCT com 3% Phosal[®] 50PG)



Fonte: Autoria própria

Ao comparar os diagramas obtidos, observou-se o efeito dos tensoativos com diferentes valores de EHL na região da ME. O maior valor de EHL do Tween 20 (EHL = 16,7) foi ótimo para incorporar o maior volume da fase aquosa, porque aumenta a hidrofílica da camada interfacial. ⁴⁷ Considerando que Tween 80 (EHL = 15) é menos hidrofílico, isso reduziu a sua partição com a fase aquosa, consequentemente, reduziu a quantidade de água mostrando uma região de ME mais estreita.

5.2.2. Caracterização das MEs

Tabela 2 detalha as propriedades das MEs obtidas. Estas exibiram uma faixa de diâmetro de fase interna de 8 a 14 nm (com PDI < 0,2) e potencial zeta negativo (~ -10 mV), sugerindo estabilidade da formulação. O potencial zeta representa a carga total de uma vesícula ou partícula lipídica em um meio, os valores de potencial zeta iguais ou superiores ao módulo de 30 mV são considerados sistemas estáveis. ⁵⁹ No entanto, esta regra pode não ser válida para algumas formulações com um potencial zeta inferior. Geralmente, as gotículas dispersas são estáveis quando há repulsão eletrostática entre elas, o que leva à conclusão de que altos valores de potencial zeta impedem a agregação de gotículas das MEs, aumentando a estabilidade do sistema. ⁵⁶ Por outro lado, a estabilidade das MEs contendo tensoativos não iônicos em sua composição, como o exemplo das formulações do presente estudo, não depende apenas do potencial zeta. ⁵⁶ Dessa forma, os estudos posteriores de estabilidade podem esclarecer melhor o perfil de estabilidade dessas MEs desenvolvidas.

Os valores obtidos para a condutividade elétrica das MEs foram da ordem de 100 μ S cm⁻¹, indicando que o tipo de emulsão é O/A. A medição da condutividade é usada para determinar o tipo de ME formado e estimar a fase predominante resultante das mudanças na composição ou temperatura. O valor revela principalmente se esta fase é aquosa ou oleosa, ou ambas as fases são contínuas. Os sistemas microemulsificados do tipo O/A e bicontínuos têm valores de condutividade elétrica relativamente altos em comparação com os sistemas microemulsificados do tipo A/O. As MEs de O/A são preferidas em aplicações biológicas, uma vez que as nanogotículas de óleo dispersas em água podem oferecer excelente capacidade de solubilização de compostos hidrofóbicos e aumentar sua estabilidade e biodisponibilidade. ⁹¹ Para determinar a eficiência da encapsulação de Hy nas MEs, é necessário separar a fração não encapsulada por centrifugação de spin de alta velocidade (~11000 g), as duas MEs selecionadas têm eficiência de encapsulação >80%, o que significa que as formulações desenvolvidas foram eficientes para encapsular Hy 100 μ g mL⁻¹.

A determinação do tamanho das gotículas em sistemas dispersos como as MEs e NEs pode ser realizada pela DLS. Quando as gotículas presentes no sistema são irradiadas por um feixe de laser, ocorre o espalhamento da luz, sendo que essa intensidade de luz espalhada varia numa taxa dependente da velocidade de difusão das gotículas, as quais, por sua vez, são governadas pelo seu tamanho. ⁹²

Tabela 1. Caracterização das MEs obtidas: M1C (2% ácido oleico, 40% Tween 80: propilenoglicol (3:1), 58% água destilada+10% etanol). B) M1C (2% MCT com 3% Phosal[®] 50PG, 30% Tween 20: propilenoglicol (3:1), 68% água destilada+10% etanol).

Formulação	М1-С	M2-A
Tamanho da gotícula de ME (nm)	$8,\!38\pm0,\!13$	$10,\!39\pm0,\!14$
Tamanho da gotícula da ME com Hy (nm)	$9{,}42\pm0{,}23$	$11,\!03\pm0,\!19$
PDI	$0,\!141\pm0,\!047$	$0,021 \pm 0,011$
Potencial zeta (mV)	$-9,62 \pm 1,12$	$-11,7 \pm 1,83$
pН	$5,0\pm0,1$	$6,8 \pm 0,2$
Condutividade (µs cm ⁻¹)	$301,\!2\pm0,\!5$	$203{,}5\pm0{,}2$
Viscosidade (Pa s)	$0{,}003\pm0{,}001$	$0,132 \pm 0,001$
Eficiência de encapsulação (%)	88,4 ± 3,9	87,4 ± 2,7
Eficiência de encapsulação (%)	88,4 ± 3,9	$87,4 \pm 2,7$

Fonte: Autoria própria

Figura 12 mostra a distribuição do tamanho de gotículas das MEs selecionadas. Pode-se ver que todos as MEs têm um tamanho de gotículas em torno de 10 nm. No entanto, M1C formulada com ácido oleico mostrou os tamanhos de gotículas mais dispersos, indicando a presença dos tamanhos variados de gotículas na amostra. Pode ser devido à cadeia de carbono do ácido oleico (18 carbonos) com uma ligação dupla, enquanto o MCT é geralmente composto por cadeias de carbono curtas, de 6 a 12 carbonos. O número de carbonos dos compostos usados para a fase oleosa pode influenciar o processo de emulsificação, uma vez que cadeias longas têm dificuldade em penetrar na interface dos tensoativos e geralmente estão dispersas. ⁹³



Figura 13. As distribuições dos tamanhos de gotícula das MEs carregadas com Hy: M1C e M2A analisadas pelo DLS.

Fonte: Autoria própria

Hy 100 µg mL⁻¹ foi adicionado nos meios: DMSO, PBS, M1C e M2A por meio dos espectros obtidos por emissão de fluorescência (Figura 13). Observou-se que as MEs carregadas com Hy apresentam perfis exatos de emissão de fluorescência em comparação com a solução de Hy em DMSO, por ser este o solvente mais utilizado no preparo da solução estoque de Hy. Por outro lado, Hy por ser insolúvel em PBS não teve a intensidade de absorbância, e a fluorescência emitida foi próxima a zero. Pode-se concluir que as MEs preparadas foram eficientes na solubilização de Hy.

Figura 14. Espectros de fluorescência de Hy 100 μ g mL⁻¹ em diferentes meios: PBS, DMSO, M1C e M2A obtidos com excitação em 552 nm e emissão em 560 em 800 nm.



As imagens obtidas da TEM (Figura 14) revelam que as gotículas lipídicas esféricas corroboraram com a análise do tamanho de gotículas mostrando a presença das nanogotículas que variam aproximadamente de 10 a 20 nm.



Figura 15. Imagens TEM das MEs: M1C e M2A coradas com 1% ácido fosfotúngstico.

Fonte: Autoria própria

5.2.3. Estabilidade

Figura 15 mostra os resultados da caracterização físico-química das MEs, pode-se observar que após seis meses de armazenamento nas temperaturas de 4 e 25 °C, a visualização macroscópica durante este período demonstrou a permanência da fase isotrópica e translúcida. As gotículas mantiveram seus tamanhos iniciais e PDI, sem evidências de precipitação ou floculação quando armazenadas em diferentes temperaturas. Além disso, a concentração inicial de Hy encapsulada nesses sistemas de ME manteve-se constante, mostrando que o composto foi termoestável nas MEs. Entretanto, o aumento nos valores de PDI foi observado na armazenagem a 37 °C, visto que os tensoativos não-iônicos tendem a se desidratar, por conseguinte, a solubilidade O/A e a tensão interfacial alteram. Com o aumento da temperatura também eleva a energia cinética, incrementando o movimento Browniano entre as gotículas, para que essas possam superar a barreira energética e elas tendem a se aproximar uma da outra, assim a possibilidade de floculação e coalescência tornam-se mais prováveis. Através deste estudo de estabilidade, concluiu-se que apesar do aumento de PDI na temperatura a 37 °C, a estabilidade termodinâmica das MEs ainda contribui para a conservação dos tamanhos da nanogotículas das MEs nas temperaturas 4 e 25 °C oferecendo vantagens sobre as dispersões

instáveis, como suspensões e emulsões, tendo uma vida útil muito mais longa.

Figura 16. A análise de estabilidade registrou a variação do diâmetro das gotículas e PDI das MEs carregadas com Hy preparadas: (A) M1C (B) M2A, em diferentes temperaturas de armazenamento: 5, 25 e 37 °C, ao longo de 180 dias.



Fonte: Autoria própria

5.2.4. Geração de oxigênio singleto

A eficiência de geração de oxigênio singleto (¹O₂) pelas MEs carregadas com Hy foi analisada usando o reagente sensor verde de oxigênio singleto (*Singlet Oxygen Sensor Green*, SOSG). Como mostrado na Figura 16, após irradiação de LED amarelo de 590 nm por 20 min, foi observada uma forte intensidade de fluorescência SOSG na solução de Hy livre em DMSO e as MEs carregadas com Hy. Pelo contrário, Hy foi insolúvel em PBS, levando à precipitação e baixa fluorescência de SOSG. Em um meio aquoso, Hy forma agregados que precipitam e reduzem o rendimento quântico de fluorescência, o que torna difícil a transferência de energia do estado tripleto para o oxigênio e prejudica assim o processo de geração de ¹O₂. ⁹⁴ Embora as MEs contenham de 60 a 70% de água, as nanogotículas da fase oleosa estabilizadas pelos tensoativos permitem que Hy seja solúvel em meio aquoso. Este fato aumenta marcadamente a disponibilidade de Hy, uma vez que ¹O₂ gerado após irradiação de luz na presença de oxigênio promove a oxidação das biomoléculas circundantes e desencadeia a morte celular programada por apoptose. ⁹⁵

Figura 17. Geração de oxigênio singleto por Hy (20 μ mol L⁻¹) em diferentes meios: PBS, DMSO, M1C e M2A após a irradiação com luz em 590 nm (dose de luz: 10 J cm⁻²). A fluorescência da sonda SOSG foi detectada por excitação e emissão de comprimentos de onda de 504 nm e 525 nm, respectivamente. Diferença significativa **p* < 0,0001 contra PBS, # não há diferença significativa.



Fonte: Autoria própria

5.2.5. Citotoxicidade e fototoxicidade

As citotoxicidades (-irr) e fototoxicidade (+irr) das MEs foram avaliadas nas células 3T3 que são fibroblastos de camundongo utilizados como controle nos experimentos por não apresentarem nenhuma característica de células cancerígenas, assim, podem ser empregadas nos testes de citotoxicidade da formulação às células normais. Além disso, as células de fibroblasto de camundongo possuem morfologias semelhantes às células de fibroblasto humanas e conseguem produzir dados de citotoxicidade mais relevantes para os testes *in vivo* feitos em camundongos. ⁹⁶

A citotoxicidade por ensaio de MTT das MEs vazias é mostrada na Figura 17-A e B. As células 3T3 foram incubadas com as formulações de M1C e M2A em concentrações crescentes (10 a 500 mg mL⁻¹) por 24 h, a viabilidade foi determinada pelo método MTT. Os resultados demonstraram que as MEs vazias não exibiram efeito significativo na taxa de sobrevivência de células 3T3 e B16F10 a 10 mg mL⁻¹ em meio de cultura, e a taxa de sobrevivência celular foi acima de 90%.



Figura 18. A citotoxicidade das MEs vazias foi determinada 24 h após a incubação usando o ensaio MTT: M1C e M2A. A) células 3T3, B) células B16F10.

Fonte: Autoria própria

As MEs sem Hy, M1C e M2A (diluídas 200 vezes) não apresentaram efeito citotóxico e fototóxico para as células B16F10. Em seguida, foram preparadas as MEs com concentrações crescentes de Hy para serem diluídas e aplicadas no tratamento da PDT nas células B16F10.

Os valores da IC₅₀ para a Hy livre (não encapsulada) e as MEs de Hy foram obtidos a partir da curva de concentração versus resposta para 24 h de incubação e irradiação a LED amarelo (I = 8,4 mW cm⁻² e λ = 590 nm) por 20 min. Observou-se uma significativa redução nos valores da IC₅₀ para a Hy encapsulada tanto em M1C e M2A, conforme demonstrado na Figura 19. Os valores da IC₅₀ para Hy livre e Hy encapsulada em M1C e M2A foram de 87,55 ± 5,32, 32,68 ± 1,87 e 17,45 ± 1,16 nmol L⁻¹, respectivamente. Pode-se concluir que a Hy encapsulada nas MEs potencializou sua fototoxicidade nas células B16F10 cerca de 3 a 4 vezes.

As MEs têm sido amplamente utilizadas para veiculação de fármacos da antineoplásica (paclitaxel, carmustina, metotrexato e doxorrubicina) por ser um sistema nanoestruturado com boas propriedades de solubilização de composto hidrofóbico e capacidade de permear as membranas biológicas, e demonstraram resultados promissores em aumentar a eficiência terapêutica dos quimioterápicos aplicando doses reduzidas, por conseguinte, efeitos adversos também são minimizados. ⁹⁷⁻¹⁰⁰

Figura 19. Curva de viabilidade celular pelo método de MTT nas células B16F10 após 24 h de exposição com Hy Livre ou Hy encapsulada em MEs, M1C e M2A e irradiação de LED amarelo com emissão em 590 \pm 10 nm (irradiância = 8,4 mW cm⁻²) por 20 min. A viabilidade foi determinada após 24 h da irradiação.



Fonte: Autoria própria

5.4. Nanoemulsão

5.3.1. Efeito da concentração de tensoativo no tamanho das gotículas de NEs

A escolha dos componentes pode influenciar a estabilidade da NE e as características físico-químicas. Combinamos o EHL necessário da fase oleosa com um tensoativo que apresenta valor de EHL compatível para produzir NE de O/A estável. ¹⁰¹ Tabela 3 mostra os componentes selecionados para as NEs, o ácido oleico tendo EHL necessário igual a 17 foi combinado com o Tween 80, enquanto o MCT com EHL necessário igual a 11, então Kolliphor EL foi usado. As proporções das fases de óleo (O) e tensoativo (S) de 1:1, 1:3 e 1:5 (O:S) foram examinadas; as misturas passaram pelo processo de ultrasonicação de intervalos de 5, 15 e 30 min, e a formulação final foi analisada por tamanho de partícula e PDI.

Composição (%)	NE-1A	NE-3A	NE-5A	NE-1B	NE-3B	NE-5B
Ácido oleico	2,5	2,5	2,5	-	-	-
MCT+3% Phosal® 50 PG	-	-	-	2,5	2,5	2,5
Tween 80 (EHL = 15.0)	2,5	7,5	12,5	-	-	-
Kolliphor EL (EHL= 12-14)	-	-	-	2,5	7,5	12,5
Água deionizada	95	90	85	95	90	85

Tabela 2. Composição das NEs testadas nesta tese.

Fonte: Autoria própria

Figura 19-A mostra que as formulações com longo tempo de ultrasonicação e maior proporção de tensoativo resultam em tamanhos de gotícula menores. Existem diferenças estatísticas significativas (p < 0,01) entre 1:5, 1:3, 1:1 e diferentes tempos de ultrasonicação. Figura 19-B ilustra as mudanças visuais nas formulações. Ressalta-se que em uma emulsão turva e leitosa composta por gotículas de grande tamanho, juntamente com a redução do tamanho de gotículas, as formulações tornaram-se mais translúcidas. Essa mudança na turbidez é extremamente dependente da combinação da concentração do tensoativo e do tempo de ultrassom. As NEs opticamente transparentes com diâmetro de gotícula relativamente pequeno e dispersão de luz fraca foram produzidas em concentrações mais altas de tensoativo e uma exposição de ultrassom mais longa. A ultrasonicação é uma ferramenta de cavitação de alta energia para promover o colapso rápido e eficiente da fase dispersa. Quando combinado com tensoativos, também contribui para diminuir a tensão superfícial e estabelecer nanogotículas estáveis. ¹⁰² Portanto, para atingir o menor tamanho de gotícula, foram escolhidos a proporção de 1: 5 (O: S) e o tempo de ultrasonicação de 30 min. **Figura 20.** A) A influência do tempo de ultrasonicação e as proporções de óleo (O) e tensoativo (S) no tamanho de gotícula, diferença estatística (*p < 0.01), e B) Aparência visual das NEs preparadas usando diferentes proporções de óleo e tensoativo: 1:1, 1:2 e 1:3.



Fonte: Autoria própria

5.3.2. Caracterização das NEs formuladas

Tabela 4 resume as características físico-químicas das NEs selecionadas. A NE em branco (sem Hy) mostrou um tamanho médio de gotículas de $31,66 \pm 0,24$ e $18,37 \pm 0,04$ nm para os sistemas das NE-5A e NE-5B, respectivamente. A incorporação de Hy em NEs não alterou significativamente os seus tamanhos. O índice de polidispersidade (PDI) foi < 0,2 para todas as formulações. A ausência de separação de fases ou precipitação após centrifugação vigorosa (3000 rpm) das NEs evidenciou a excelente estabilidade das formulações. Os valores do potencial zeta na faixa de -6 e -10 mV indicam que a moderada presença de cargas negativas na superfície das nanogotículas. Embora a camada de tensoativo na superfície dessas gotículas tenha sido formada pelo tensoativo não iônico (Tween 80 e Kolliphor EL), essas cargas foram liberadas provavelmente devido ao grupo ácido carboxílico da fase oleosa e os grupos de hidroxila dos tensoativos. $^{103, 104}$

O valor de pH para NE-5A foi ligeiramente baixo devido à acidez do ácido oleico, enquanto a NE-5B formulada com MCT tinha pH próximo a 7. Além disso, as medições de condutividade (133-249 µS cm⁻¹) indicaram a natureza das NEs para ser do tipo óleo-em-água (O/A), frequentemente utilizado para a administração de drogas lipofílicas. ⁵⁴ As amostras NE-5A e NE-5B apresentam viscosidades baixas devido à composição das emulsões, como a concentração e a natureza dos óleos e tensoativos, e o diâmetro das gotículas. Muitos estudos têm demonstrado que a viscosidade das NE é geralmente muito baixa, pois as emulsões viscosas costumam causar dor ao paciente durante a administração parenteral. Assim, a NE pode fornecer fácil manuseio, embalagem e administração segura de formulações. ^{101, 105} As NEs mostraram um nível de encapsulação de até 90% para o carregamento de Hy, indicando que moléculas de Hy altamente lipofílicas podem ser prontamente incorporadas nas NEs.

Formulação	NE-5A	NE-5B
Tamanho de gotículas da NE branca (nm)	$31,\!66\pm0,\!24$	$18,\!37\pm0,\!04$
Tamanho de gotículas da NE de Hy (nm)	$32,\!05\pm0,\!07$	$18{,}92\pm0{,}03$
PDI	$0,\!135\pm0,\!008$	$0,113 \pm 0,002$
Potencial zeta (mV)	$6,3\pm0,8$	$10,5 \pm 0,6$
рН	$4,56 \pm 0,23$	$6{,}50\pm0{,}12$
Condutividade (µs cm ⁻¹)	$132,9\pm0,5$	$124,\!2\pm0,\!6$
Viscosidade (Pa s)	$\textbf{0,005} \pm \textbf{0,001}$	$0,004 \pm 0,001$
Eficiência de encapsulação (%)	$92,54 \pm 1,27$	$94,\!54 \pm 1,\!66$

Tabela 3. A caracterização físico-química das NEs de Hy por tamanho de gotículas, potencial zeta, pH, condutividade e eficiência de encapsulação.

Fonte: Autoria própria

Figura 20 mostra que a distribuição de tamanho de gotículas obtida por DLS para ambos as NEs selecionadas exibiram uma distribuição de tamanho monodispersa com alta intensidade. Ele indica as nanogotículas se aproximando de um sistema monodisperso que poderia efetivamente ampliar a superfície de contato, melhorando a permeabilidade do fármaco na vasculatura tumoral. ⁷² Além disso, para a administração parenteral, a determinação do diâmetro das gotículas e sua distribuição é um parâmetro importante relacionado ao uso seguro de NEs, pois a presença de gotículas de até 5 µm aumenta o risco de embolia pela oclusão de pequenos capilares sanguíneos. ¹⁰⁶



Figura 21. A distribuição dos tamanhos de gotícula das NEs de Hy: NE-5A e NE-5B por DLS.

Fonte: Autoria própria

Ao comparar os espectros de emissão de fluorescência de Hy ($100 \ \mu g \ mL^{-1}$) em diferentes meios (Figura 21), as NEs demonstram perfis semelhantes à solução de Hy em DMSO. Ao contrário da suspensão de Hy em PBS, que se mostrou insolúvel em meio aquoso, portanto, a intensidade de fluorescência emitida foi próxima de zero. A alta emissão em torno de 610 nm, junto com a aparência homogênea, indicou o encapsulamento bem-sucedido de Hy nas gotículas de NE.

Figura 22. Espectros de fluorescência de Hy 100 μ g mL⁻¹ em diferentes meios: PBS, DMSO, NE-5A e NE-5B, obtido com excitação a 552 nm e emissão a 560 a 800 nm



Fonte: Autoria própria

A TEM foi usada para analisar a morfologia das gotículas e a determinação dos seus tamanhos. As amostras foram coradas negativamente com ácido fosfotúngstico 1%, e as imagens da TEM de alta resolução foram obtidas. Figura 22 confirmam que as gotículas da fase oleosa foram esféricas e uniformemente distribuídas após a diluição. Conforme demonstrado, NE-5A e NE-5B apresentam tamanhos próximos a 30 nm e 20 nm, respectivamente. Este resultado corroborou com o resultado das análises do tamanho de gotículas usando DLS.

Figura 23. Imagens da TEM das NE-5A e NE-5B coradas com 1% ácido fosfotúngstico.



Fonte: Autoria própria

A membrana de 100 kDa possui um diâmetro de poro de cerca de 10 nm. ¹⁰⁷ Por meio da centrifugação a alta velocidade (~ 8000 rpm) por 30 min, a quantidade de Hy encapsulada com o diâmetro das gotículas da fase oleosa em torno de 10 a 20 nm foi retida no compartimento superior. A Figura 23 mostra os tubos de ultracentrífuga contendo a solução de Hy em MCT + 3% Phosal[®] 50 PG e Hy encapsulada na NE-5B. Após a centrifugação, a solução de Hy moveuse inteiramente para o fundo do tubo, ao contrário do tubo contendo NE-5B carregada com Hy, no qual a retenção das gotículas de Hy pela membrana foi observada visualmente. O mesmo resultado foi obtido da NE-5A carregada com Hy. As eficiências de encapsulação de Hy mostraram-se superiores a 90% para ambas as NEs selecionadas, confirmando que tais formulações são capazes de incorporar o composto.

Figura 24. O tubo centrífugo de ultrafiltração com a membrana 100 kDa MWCO, antes e depois da centrifugação a 8000 rpm por 40 min. A) Hy solubilizada em fase oleosa (MCT + 3% Phosal[®] 50 PG); B) Hy encapsulada na NE-5B.



Fonte: Autoria própria

5.3.3. Estabilidade

Os efeitos do tempo e da temperatura na estabilidade das NEs carregadas com Hy a 100 μ g mL⁻¹ foram investigados ao longo de 180 dias. A concentração de Hy de todas as formulações não apresentou alteração significativa durante este período. Figura 23 relata o tamanho de gotícula e PDI das NEs carregadas com Hy em diferentes temperaturas de armazenamento (5, 25 e 37 °C). NE-5A e NE-5B mostraram boa estabilidade a uma temperatura de armazenamento de 5 °C com um PDI abaixo de 0,2. Vale ressaltar que a NE-5B foi estável em todas as condições de armazenamento, permanecendo transparente e isotrópico durante todos os períodos nas temperaturas avaliadas (5 °C a 37 °C). A excelente estabilidade da NE-5B pode ser atribuída ao tensoativo Kolliphor EL, este é constituído por moléculas anfifílicas sintéticas que são amplamente usadas para estabilizar sistemas de emulsão contribuindo incrementando a biodisponibilidade dos fármacos e vitaminas lipossolúveis A, D, E, K. ¹⁰⁴

Por outro lado, a NE-5A não demonstrou estabilidade térmica quando armazenado a 25 e 37 °C, isso é provavelmente atribuído à cadeia de carbono longa (18 carbonos) do ácido oleico, uma vez que um grande número de carbonos na fase oleosa pode dificultar o limiar de penetração na interface do tensoativo, tornando o sistema vulnerável à mudança térmica. ⁹³

Além disso, muitos estudos relataram que, ao serem aquecidos, os tensoativos não iônicos tendem a desidratar e alterar a tensão interfacial das gotículas de óleo. ¹⁰⁸ O aumento da temperatura também aumenta a energia cinética e o movimento browniano do sistema, às vezes superando a barreira de energia das partículas para se aproximarem umas das outras. Neste ponto, fenômenos como floculação e coalescência tornam-se mais prováveis, levando a um aumento no tamanho da partícula ou separação de fases. ¹⁰⁹

Figura 25. A análise de estabilidade registrou a variação do diâmetro da gotícula e PDI das NEs carregadas com Hy preparadas: (A) NE-5A (B) NE-5B, em diferentes temperaturas de armazenamento: 5, 25 e 37 °C, ao longo de 180 dias.



Fonte: Autoria própria

5.3.4. Perfil de liberação in vitro

Figura 25 apresenta o perfil comparativo de liberação de Hy realizado pelo método da bolsa de diálise. A liberação de Hy das NEs, NE-5A e NE-5B, foi comparada com a solução de Hy-DMSO e a suspensão de Hy em PBS. A solução Hy-DMSO foi liberada rapidamente, com mais de 60% de Hy liberada cumulativamente em 8 h devido à boa solubilidade de Hy neste meio. Ao contrário, Hy foi liberada menos de 20% do PBS em 30 h devido à baixa solubilidade em água e à formação de agregados dentro da bolsa de diálise. A liberação de Hy pelas ambas NEs e pela solução de DMSO mostraram 60% de Hy liberada em 12 h, seguido por uma liberação de Hy de maneira prolongada até atingir o período de latência.

Figura 26. Perfis de liberação *in vitro* de Hy a partir das: NE-5A e NE-5B, em comparação com Hy livre em DMSO e PBS, do saco de diálise com a membrana 14 kDa de acetato de celulose em tampão fosfato pH 7,4 a 37 °C.



Fonte: Autoria própria

Posteriormente, realizou-se o estudo dos mecanismos envolvidos no processo de liberação aplicando diferentes modelos cinéticos, incluindo ordem zero (quantidade cumulativa de liberação da droga versus tempo), primeira ordem (logaritmo da quantidade cumulativa de droga restante versus tempo), Higuchi (cumulativa porcentagem de liberação do fármaco em relação à raiz quadrada do tempo), o estudo cinético de liberação completo é apresentado na Tabela 5. A melhor relação linear ($r^2 = 0.98$), indicou que a liberação de Hy de veículos desenvolvidos seguiu a cinética de Higuchi. Isso sugere que Hy solubilizado na fase oleosa (núcleo interno) teve difusão da molécula das gotículas de óleo para a camada de tensoativo e depois para a fase aquosa. Considerando que Hy possui coeficiente de partição octanol-água (Log P) igual a 3,43, ¹¹⁰ esta hidrofobicidade intermediária poderia fazer com que Hy se localizasse parcialmente na superfície da gotícula de óleo e facilitasse sua liberação bastante rápida ⁷⁷. Além disso, as constantes de liberação (K) presentes na Figura 5-B também demonstraram diferenças estatisticamente significativas entre Hy em PBS e as Hy-NEs. No entanto, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os perfis de liberação de Hy em DMSO e NEs carregadas com Hy. Esses resultados mostraram que o tipo de formulação pode desempenhar um papel fundamental nos comportamentos de liberação de Hy e favorecer o aumento da penetração de Hy na membrana celular e melhorar a

biodisponibilidade.

Tabela 4. Valores dos coeficientes de correlação (r²) e constante da taxa de liberação de droga (K) obtidos pelo ajuste de dados de liberação de Hy por meio de NE-5A, NE-5B, DMSO e PBS usando modelos de ordem-zero, primeira ordem e Higuchi.

	Ordem-zero		Primeira ordem		Higuchi	
_	r ²	K (µg h ⁻¹)	r^2	K (h ⁻¹)	r^2	K ($\mu g h^{-1/2}$)
DMSO	0,9117	0,5461	0,8189	0,1089	0,9819	1,8453
PBS	0,9434	0,1175	0,8932	0,0818	0,9853	0,3911
NE-5A	0,9152	0,4115	0,8201	0,1116	0,9805	1,3871
NE-5B	0,9036	0,4772	0,8262	0,1262	0,9815	1,6197

Fonte: Autoria própria

5.3.5. Citotoxicidade

A citotoxicidade das NEs foram avaliadas nas células Balb/c 3T3 como um parâmetro para determinar a biossegurança das formulações farmacêuticas, considerando que suas morfologias são muito semelhantes às células de fibroblastos humanos e podem gerar dados de citotoxicidade relevantes para estudos *in vivo*. ⁹⁶ Os resultados mostram que as NE-5A e NE-5B não apresentam a citotoxicidade na faixa de concentração de 0,5 a 25 mg mL⁻¹ (Figura 6-A). As NEs vazias não apresentaram citotoxicidade aparente nas células 3T3 e apresentou a viabilidade celular relativa em torno de 100% em todas as concentrações sob investigação, o que indicou que os excipientes usados para fabricar essas NEs apresentam citotoxicidade mínima. Além disso, foi relatado que Kolliphor EL (óleo de rícino polioxil 35) e Tween 80 possuem efeito bioativo semelhante, amplamente utilizado como excipiente farmacêutico com alta biodisponibilidade e segurança em administração parenteral, oral e transdérmica. ^{104, 111}

Para investigar o potencial anticâncer das NEs carregadas com Hy quando combinadas com o tratamento PDT, as células do câncer de mama, MCF-7, foram empregadas. A NE carregada com Hy mostra maior toxicidade do que Hy livre no meio de cultura de células sob a mesma condição experimental, incubação de 24 h e irradiação de LED amarelo (I = 8,4 mW cm⁻² e λ = 590 nm) por 20 min. Além disso, a citotoxicidade das NEs carregadas com Hy no escuro (sem irradiação) foi empregada como controle e não mostrou citotoxicidade significativa. Conforme mostrado na Figura 26-B, o valor IC₅₀ de Hy livre foi 88,45 ± 4,56 nmol L⁻¹ em comparação com os valores das NE-5A e NE-5B carregadas com Hy 49,93 ± 2,23 nmol L⁻¹ e 14,54 \pm 1,44 nmol L⁻¹, respectivamente. Não foram observadas diferenças estatísticas pelo valor de IC₅₀ entre as duas NEs carregadas com Hy (p > 0,05), mas quando comparados com a Hy livre, foram estatisticamente significantes (p < 0,05). Pode-se concluir que as NEs carregadas com Hy demonstraram ser mais potentes contra células MCF-7 do que Hy livre no RPMI, e especialmente quando encapsulado em NE-5B foi cerca de seis vezes mais potente. Este fato pode ser devido à maior eficiência de absorção celular de NEs carregadas com Hy, conforme discutido mais adiante na seção de absorção celular.

As diminuições na viabilidade celular pelo composto ativo encapsulado em NEs foram descritas na literatura. Um estudo *in vivo* usando a NE carregada com meta-tetrahidroxi fenilclorina (mTHPC) para tratar tumores orais sólidos pela PDT mostrou que o mTHPC encapsulado em NE foi mais eficaz do que o mTHPC livre na erradicação do tumor. ¹¹² Ganta et al. avaliaram a citotoxicidade das NEs contendo o fármaco quimioterápico, clorambucila, e encontraram um aumento na toxicidade em comparação com o não encapsulado ⁸¹. Alkhatib et al. também relataram um efeito dose-dependente na viabilidade celular ao testar as NEs de doxorrubicina. ¹¹³ Em geral, um aumento na toxicidade é esperado quando os compostos ativos são incorporados em NEs, sendo que o tamanho reduzido da fase dispersa das NEs pode aumentar a penetração das substâncias nas membranas celulares, potencializando seus efeitos terapêuticos. Além disso, sua eficácia também é favorecida, pois é possível aplicar menor quantidade de medicamento e evitar seus efeitos adversos. ¹¹⁴

Figura 27. A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio MTT (n = 4 em cada grupo) A) Citotoxicidade da NE vazia: NE-5A e NE-5B nas linhas celulares 3T3 e MCF-7. B) Viabilidade das células MCF-7 após 24 h de tratamento PDT (irradiação de LED amarelo a 590 ± 10 nm, 8,4 mW cm⁻² por 20 min) com Hy livre no RPMI, NE-5A e NE-5B carregadas com Hy.



Fonte: Autoria própria

5.3.6. Morfologia das células MCF-7 após a Hy-PDT com as NEs carregadas com Hy

O impacto da absorção de NE-5A e NE-5B carregados com Hy após o tratamento PDT na morfologia das células MCF-7 foi investigado por coloração com Giemsa. De acordo com os resultados da microscopia óptica, as células MCF-7 não tratadas (controle) apresentaram forma definida com cromatinas e citoplasma organizados, conforme apresentado na Figura 27-A. Após o tratamento PDT com Hy livre (Figura 27-B) ou NEs carregadas com Hy (Figura 27-C e 27-D) para NE-5A e NE-5B carregadas com HY, respectivamente), as células MCF-7 sofrem a alteração morfológica, como condensação da cromatina, nuclear fragmentação e encolhimento celular. Estes tipicamente indicam morte celular programada por apoptose, como mostrado em Bheeram et al., eles demonstraram que os nanotubos fotoluminescentes RE³⁺ dopados com Ca₃(PO₄)₂ podem induzir apoptose em células MCF-7 em cultura usando a coloração de Giemsa. ¹¹⁵

Figura 28. Morfologia celular das células MCF-7 coradas por Giemsa após o tratamento PDT (com incubação de Hy por 24 h e a irradiação de LED amarelo 10 J cm⁻²), observou-se que induziu alterações morfológicas nas células MCF7. A) controle, B) Hy 200 nmol L⁻¹ livre no RPMI, C) 150 nmol L⁻¹ Hy carregada na NE-5A, D) 150 nmol L⁻¹ Hy na NE-5B. Barra de escala = 20 μ m.



Fonte: Autoria própria

5.3.7. Acumulação intracelular de Hy

O estudo da acumulação intracelular de Hy nas células MCF-7 foi realizado no CLSM para avaliar e quantificar a internalização do Hy. Figura 28-A mostra as intensidades de fluorescência emitidas pelo Hy a 200 nmol L^{-1} livre (sem encapsulação) no RPMI e encapsulada nas NEs. Observou-se que as intensidades de NE-5A e NE-5B carregadas de Hy foram cerca de quatro vezes maiores que Hy livre, e não há diferenças significativas entre as duas NEs (Figura 28-B). Assim, as NEs formuladas foram comprovadamente mais eficientes em facilitar a internalização de Hy nas células.

Figura 29. A) imagens de microscopia Confocal de varredura a laser mostram o acúmulo intracelular de Hy a 200 nmol L⁻¹ livre no RPMI e nas NE-5A e NE-5B nas células MCF-7, após 24 h de incubação. Escala = 100 μ m. B) Quantificação da fluorescência emitida por Hy livre no RPMI e nas NE-5A e NE-5B nas células MCF-7 (* *p* < 0,05 em comparação com Hy Livre). Entre Hy nas NE-5A e NE-5B, não houve a diferença significativa (# *p* > 0,05). Barra de escala = 100 μ m



Fonte: Autoria própria

Uma vez que as nanogotículas de Hy têm uma permeabilidade facilitada pela membrana celular, elas cruzam rapidamente a membrana plasmática carregando o composto encapsulado para se acumular intracelularmente devido às suas características anfifílicas. ^{105, 114} Além disso, as células neoplásicas possuem muitos receptores para a lipoproteína de baixa densidade (LDL) na membrana celular. As células também favorecem o acúmulo preferencial do composto

encapsulado na NE, pois sua fase interna é composta por um componente lipofilico, como triglicerídeos e ácidos graxos. ¹¹⁶ Em resumo, Hy encapsulada em NE proporciona melhor acúmulo intracelular e maior biodisponibilidade para ser aplicado em um sistema biológico.

O ensaio de DCFH-DA foi realizado para detectar a geração de ROS intracelular de Hy fotoativada sob luz. Conforme mostrado na Figura 29, as Hy-NEs formuladas exibiram uma melhora no nível de ROS conforme observado para o controle positivo (H₂O₂). Por outro lado, Hy livre apresentou baixa emissão de fluorescência devido à quantidade reduzida de Hy intracelular disponível para geração de ROS. Nenhuma fluorescência foi observada no controle negativo. Esses resultados demonstram que nanogotículas de Hy presentes nas NEs podem facilitar de forma eficiente sua internalização na membrana e promover a geração de ROS. Uma vez que a Hy-PDT induz a morte celular mediada por ROS, implicar sua formação pode afetar significativamente a eficácia da PDT. ^{117, 118}

Figura 30. A geração de ROS foi detectada por método de DCFH-DA e o emprego do microscópio de fluorescência. As células de MCF-7 foram incubadas com as seguintes condições: controle negativo = meio de cultura RPMI, controle positivo = H_2O_2 (20 µmol L⁻¹) e as amostras de Hy (200 nmol L⁻¹) livre no RPMI e nas NE-5A e NE-5B por 24 h e depois irradiadas por LED (λ = 590 nm, 10 J cm⁻²). Barra de escala = 10 µm.



Fonte: Autoria própria

5. Conclusão

O emprego dos diagramas de fases pseudoternárias se mostrou um método simples e sucedido possibilitando a obtenção e escolha das MEs para caracterização físico-química e incorporação de Hy. A caracterização físico-química das MEs selecionadas por medidas de tamanho de partícula, índice de polidispersidade, pH, condutividade, estudo de estabilidade e caracterização morfológica por microscopia de transmissão, mostraram que estes sistemas são estáveis, isotrópicos e translúcidos. Além disso, foi observada a maior fototoxicidade de Hy, quando encapsulada na ME do que na sua forma livre.

As NEs obtidas pela técnica de ultrassom apresentaram boas propriedades físico-químicas e boa estabilidade. Hy foi encapsulada com sucesso na fase oleosa resultando uma nanoestrutura esférica, esta melhorou a solubilização de Hy em um meio aquoso e a sua liberação *in vitro*. Além disso, as NEs contendo Hy apresentaram excelente perfil de permeabilidade celular e promovem fototoxicidade seis vezes maior do que Hy livre para as células de câncer de mama (MCF-7).

Diante dos resultados encontrados para as MEs e NEs carregadas com Hy, pode-se concluir que esses sistemas nano-estruturados são fortes candidatos a ser utilizados como carreador de Hy na PDT com abordagens terapêuticas contra o câncer.

6. Publicação relacionada

Parte dos resultados apresentados neste capitulo foi publicada Ma, Hui Ling; Varanda, Laudemir Carlos; Perussi, Janice Rodrigues; Carrilho, Emanuel. Hypericin-loaded oil-in-water nanoemulsion synthesized by ultrasonication process enhances photodynamic therapy efficiency. Journal Of Photochemistry And Photobiology B-Biology, v. 223, p. 112303, 2021.

Capítulo II.

Cultura celular tridimensional (3D)

1. Introdução

Os tecidos do corpo humano são formados pelos diversos tipos de células, estas podem ser rodeadas pela matriz extracelular ou estão em contato direto com outras células das mesmas ou diferentes linhagens. ¹¹⁹ Entretanto, há séculos que a maioria dos estudos de biologia celular utiliza os substratos bidimensionais (2D), nos quais as células são cultivadas e aderidas formando monocamadas de células. ¹²⁰ Esta técnica é considerada versátil e reprodutível, uma vez que as células cultivadas proliferam homogeneamente sob condições controladas de temperatura e nutrientes. Entretanto, é inegável que a cultura 2D apresenta falhas em mimetizar uma morfologia *in vivo* por não levar em consideração as propriedades estruturais e mecânicas que definem o microambiente natural do crescimento celular. ¹²⁰ Dessa forma, o desenvolvimento dos sistemas tridimensionais (3D) *in vitro* busca resolver esse problema incorporando células na matriz extracelular, onde as células se proliferam numa estrutura mais compatível às condições *in vivo*.

A matriz extracelular (MEC) é uma componente chave e dinâmica, formada pelas composições complexas e heterogêneas de proteínas solúveis e insolúveis, fatores de crescimento e polissacarídeos que fornecem uma estrutura mecânica para facilitar a ancoragem celular, as interações célula-célula e a formação de tecido. ¹²¹ As proteínas insolúveis secretadas por células, como colágenos e elastinas, são organizadas em uma arquitetura fibrosa anisotrópica que fornece estruturas topográficas. ¹²¹ A MEC é dinamicamente degradada, sintetizada e remodelada por células em tecidos saudáveis e doentes através dos mecanismos que controlam as funções celulares, como migração, proliferação, diferenciação e morfogênese. ¹²² Por tanto, a organização celular em 3D é crucial para recapitular a microarquitetura do tecido por incluir o espaçamento e densidade das células, o acesso a sinais difusíveis e componentes solúveis para o estudo da função biológica. ¹²³

A cultura de monocamada celular tem sido um padrão ouro para a proliferação de células e amplamente utilizadas em vários ensaios *in vitro* (por exemplo, ensaios de migração e toxicidade) para caracterizar a propriedade metastática e a resposta das células aos fármacos. Entretanto, os modelos 2D são incapazes de recapitular a complexidade do tecido 3D, as propriedades bioquímica e biofísica da matriz extracelular e as interações célula-célula.¹²⁴

Um tumor sólido consiste em dois componentes principais que são as células tumorais e a estroma composta essencialmente pelas células não tumorais, MEC, células-tronco cancerosas, vasos sanguíneos e linfáticos e nervos. ¹²⁵ Esse microambiente tumoral desempenha um papel importante na progressão tumoral e resistência aos tratamentos. Figura 30 mostra a

comparação dos modelos tumorais 2D e 3D. No modelo 2D, há pouca interação entre as células e uma exposição uniforme dos nutrientes e oxigênio, o estímulo externo como a administração de fármaco também é exposto de forma homogênea. Em contraste, o modelo 3D apresenta uma estrutura heterogênea que permite às células tumorais interagem com as células adjacentes e a matriz extracelular promovendo diferentes gradientes de acessos aos nutrientes, oxigênio e à exposição a fármacos. ¹²⁶ Devido à multiplicação descontrolada das células tumorais e o aumento da massa tumoral, na sua região central ocorre a hipóxia caracterizada pelo baixo teor de oxigênio, o que pode induzir o angiogênese germinativa e promover a sobrevivência das células tumorais no ambiente hostil e a progressão do tumor por meio da mobilidade celular, invasão e metástase.¹²² Essa resposta da hipóxia está principalmente relacionada ao incremento da expressão de fator induzível por hipóxia (HIF) que está fortemente associados à resistência ao tratamento de câncer em geral. 127, 128 Frequentemente, essas diferenças são a causa da ineficácia de uma terapia antitumoral, que mostrou resultados promissores em estudos préclínicos em condições de crescimento celular 2D in vitro. 129 Dessa forma, a utilização dos modelos de cultura celular 3D no desenvolvimento de fármacos pode gerar resultados relevantes em termo de diferenciação celular, expressões gênicas e protéicas, citotoxicidade, apoptose e susceptibilidade aos fármacos.

Nas últimas décadas, a grande maioria das pesquisas têm descoberto que os resultados experimentais de cultura celular convencionais 2D apresentam o baixo poder preditivo nos ensaios pré-clínicos, sendo que muitos podem ser diferentes ou mesmo totalmente opostos às situações *in vivo*. Embora várias condições fisiológicas relevantes podem ser encontradas em animais, como os ensaios de membrana corioalantóica embrionária de ovos de galinhas (CAM) ex vivo, camundongos transgênicos ou xenoenxerto derivado de paciente (PDX). ¹³⁰⁻¹³² No entanto, os fármacos que funcionam bem em um modelo animal frequentemente falham quando transferidos em humanos, devido à relação filogenética entre diferentes espécies. Além disso, os estudos em animais têm sido criticados por seu custo alto, trabalho intensivo, baixa reprodutibilidade, pobre controle sobre os parâmetros fisiológicos e os problemas éticos relacionados ao uso dos animais. ¹³³ Todos esses fatores destacam o papel importante da cultura celular 3D que visa criar uma plataforma de cultura mais controlável e precisa para os estudos pré-clínicos.

Figura 31. As principais diferenças entre os modelos de cultura celular 2D e 3D. O modelo 2D apresenta uma monocamada de células com pouca interação entre as células e exposição uniforme a oxigênio, nutrientes e fármacos. Enquanto, o modelo 3D desempenha o papel importante nos estudos de novos fármacos produzindo resultados relevantes em termos de diferenciação celular, expressões gênicas e protéicas, citotoxicidade, apoptose e susceptibilidade aos fármacos.



Fonte: Adaptado 134 e 135.

Figura 31 apresenta as três principais técnicas utilizadas para cultura celular 3D: cultura em suspensão, cultura em um biomaterial de suporte 3D e cultura em hidrogel. ¹³⁶ Na cultura em suspensão, as células são geralmente cultivadas em um substrato de baixa adesão ou numa gota de meio de cultura, de modo que as células tendem a se aglomerar formando agrupamentos 3D denominadas como esferóides, essa técnica tem mostrada a rapidez na produção, entretanto, requer maior quantidade de células inicial e enfrenta desafios de construir estruturas com geometrias complicadas e relativamente grandes sem suporte adequado. ¹³⁷

Os arcabouços porosos são utilizados como suportes para crescimento das células, os exemplos são as esponjas de colágeno ou de polímeros sintéticos ou a matriz extracelular descelularizada obtida pelo processo da descelularização de órgãos ou tecidos de origem humana ou animal. ¹³⁸⁻¹⁴⁰ Na cultura celular utilizando hidrogel, as células são misturadas com hidrogel e através do processo de polimerização, forma-se uma estrutura 3D específica e esta fornece um microambiente adequado ao crescimento das células encapsuladas. ¹⁴¹ A construção de modelos *in vitro* baseada em arcabouço e hidrogel normalmente utiliza um número menor de células, resultando em um método mais lento, uma vez que elas precisam se expandir. ¹⁴² Começar com um grande número de células é favorável para criar ambientes comparáveis aos

da natureza, mas as células são caras para adquirir e manter. ¹⁴³ Ao comparar os dois métodos anteriores, o uso de hidrogel apresenta uma gama de vantagens e aplicações, uma vez que este pode ser combinado com diversos métodos de bioimpressão 3D para gerar estruturas complexas de diferentes tamanhos e com alto potencial para ser estendido em grande escala. ¹⁴⁴

Figura 32. As técnicas de cultura celular 3D podem ser divididas em três categorias: a cultura em suspensão, o uso de um arcabouço e a encapsulação de células em polímeros fluidos como hidrogel.



Fonte: Autoria própria

Estudos mostram que as células tumorais em cultura 3D demonstram maior resistência a tratamentos com fármacos que as células em cultura 2D, devido à alteração do microambiente. Estudos da ação do tamoxifeno em células de câncer de mama da linhagem MCF-7, apresentaram valor de IC₅₀ mais elevado para as células em cultura de esferóides quando comparadas à monocamada celular, o que significa maiores concentrações do fármaco para ter efeito citotóxico em cultura 3D que em cultura 2D. ¹⁴⁵ Outro estudo mostrou que há diferença nas respostas obtidas da cultura 3D em relação à cultura 2D na predição da eficácia do fármaco que induz à toxicidade hepática, uma vez que os hepatócitos humanos e do rato em cultura 3D foram menos suscetíveis ao metotrexato do que em cultura 2D devido às diferentes interações célula-célula e célula-matriz extracelular entre os dois modelos, comprovando-se a compatibilidade diminuída da 2D com *in vivo* sistemas pela sensibilidade aumentada do fármaco dessa forma, a 3D mostrou a melhor confiabilidade para os testes pré-clínicos. ^{146, 147} Nesse microambiente 3D, as células não são igualmente expostas ao meio, isso faz com que haja a formação de microambientes no interior dos esferóides com gradientes não homogêneos
de oxigênio e nutrientes biomimetizando os tumores sólidos. ¹⁴⁸ Há grandes vantagens do uso dos modelos *in vitro* para os estudos pré-clínicos, por conseguir o melhor controle das condições experimentais, diminuindo-se a possibilidade de erros durante o experimento, além de serem, geralmente, menos dispendiosos. Outras vantagens apontam pela rapidez na busca de resultados, comparativamente aos modelos animais, além de permitirem o estudo de um número maior de combinações, com diferentes parâmetros.

Embora a cultura 3D tenha sido bastante pesquisada nas últimas décadas, diversos modelos e métodos de cultivo foram desenvolvidos e experimentados, porém, ainda é vista como um ensaio de alto custo, inconveniente e desnecessário nos processos de desenvolvimento de fármacos ¹⁴⁹. Há grande necessidade de desenvolver e difundir uma operação da cultura 3D simples como a cultura 2D, o que pode ser amplamente usado pela maioria dos pesquisadores.

Este capítulo apresenta a cultura celular 3D usando o hidrogel fotocurável, GelMA, para desenvolver um modelo *in vitro* 3D de melanoma nas investigações de eficiência das MEs de Hy no tratamento da PDT.

1.1. Hidrogel

Hidrogel é um polímero hidrofílico reticulável e altamente intumescido em meio aquoso, mas não se dissolve em água. Devido a essas peculiaridades, o hidrogel é utilizado em diversas áreas biomédicas. Em cultura celular 3D, os hidrogéis podem fornecer suportes 3D para encapsular células numa estrutura 3D semi-sólida e estável, onde as células incrementam as interações célula-matriz e célula-célula, e realizam os processos de adesão, diferenciação e proliferação celular. ¹⁵⁰ Para essa funcionalidade, os hidrogéis devem ser não-citotóxicos e biocompatíveis, além disso, devem possuir outras propriedades específicas como rigidez e elasticidade, adesão celular, porosidade, degradabilidade e bioatividade específica. ¹⁵¹ Três tipos de polímeros podem ser destacados como materiais base de hidrogéis: I) Polímeros naturais ou biopolímeros como colágeno, gelatina, ácido hialurônico e alginato; II) Polímeros semi-sintéticos ou híbridos que possuem estruturas de um polímero hidrofílico sintético conjugado com polissacarídeos ou proteínas (Figura 32). ¹⁵²

Dependendo da natureza da estrutura polimérica e de seus grupos funcionais, os hidrogéis podem ser reticulados usando diferentes métodos químicos e físicos. A reticulação química ocorre por ligação covalente não reversível entre cadeias poliméricas resultando em hidrogéis estáveis e com rigidez adequada. A reticulação física ocorre através da formação de ligações não covalentes, como ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas, atração eletrostática e reticulação iônica, produzindo hidrogéis com propriedade mecânica fraca, mas podem fornecer um ambiente mais amigável às células do que o hidrogel reticulado quimicamente. ¹⁵²

Os hidrogéis são polímeros hidrofílicos reticuláveis que podem intumescer em meio aquoso aumentando assim a sua massa original. ¹⁵³ Além disso, as propriedades físicas e bioquímicas dos hidrogéis podem ser modificadas pelas suas composições e os métodos e parâmetros utilizados no seu processo de reticulação, permitindo assim projetar andaimes com funcionalidades desejadas. ¹⁵³ Atualmente, os hidrogéis têm sido amplamente empregados para diversas aplicações, incluindo cultura celular 3D, encapsulação de fármacos e engenharia de tecidos. ¹⁵⁴

Figura 33. As propriedades fundamentais dos hidrogéis para cultura celular 3D são não-citotóxicos e biocompatíveis, além disso, devem possuir outras propriedades específicas como rigidez e elasticidade, adesão celular, porosidade, degradabilidade e bioatividade específica. Os hidrogéis podem ser classificados de acordo com suas origens: natural, sintética e semi-sintética ou híbrida. Os hidrogéis de origem biológica são proteínas ou polissacarídeos de rivados de fontes naturais e biológicas. Os hidrogéis sintéticos são formados por estruturas altamente repetitivas e sintéticas. Os hidrogéis semi-sintéticos ou híbridos possuem estruturas de um polímero hidrofílico sintético que é conjugado com polissacarídeos ou proteínas. A reticulação dos hidrogéis pode ser feita por diferentes métodos químicos e físicos.



Fonte: Adaptado 152.

1.2. Metacrilato de gelatina (GelMA)

GelMA é um hidrogel fotocurável derivado do colágeno hidrolisado que contém as sequências tripeptídicas de arginina-glicina-ácido aspártico (RGD), as quais se ligam às integrinas (proteína de adesão) da membrana celular, fornecendo assim os sítios de fixação celular que promovem interação intercelular e auxiliam na difusão de oxigênio e transferência de nutrientes. ¹⁵⁵ A adição dos grupos metacrilato aos grupos laterais de amina da gelatina é usada para torná-la fotocurável (Figura 33), neste processo ocorre a encapsulação de células resultando em uma estrutura de cultura celular 3D estável a 37 °C com excelente viabilidade celular e capacidade de mimetizar várias características de tecido biológico que permitem uma simulação mais próxima do microambiente *in vivo*. ¹⁴⁴

Figura 34. Síntese do GelMA a partir de gelatina e anidrido metacrílico em PBS a 50 °C e a reticulação de GelMA pelo fotoiniciador e irradiação luminosa.



Fonte: Autoria própria.

A modificação química de gelatina por anidrido metacrílico (MA) geralmente envolve apenas menos de 5% de aminoácidos na razão molar da gelatina, sendo que a maioria dos aminoácidos funcionais (como as sequências tripeptídicas, RGD) não são significativamente influenciados e garantirão às boas propriedades para adesão celular no GelMA.¹⁵⁶

O processo da reticulação do GelMA ocorre através da excitação do fotoiniciador por luz apropriada para gerar os radicais livres que promovem o crescimento da cadeia de monômeros ou oligômeros com um grupo funcional metacrilato. ¹⁵⁷ A seleção de fontes de luz adequadas assim como o tipo de fotoiniciador é fundamental para garantir a encapsulação efetiva das células na formação de um tecido *in vitro*. A fonte de luz é um elemento indispensável que possibilita a reticulação, portanto, os parâmetros de irradiação incluindo comprimento de onda de luz, tempo de exposição, intensidade e posição, devem ser controlados de forma eficiente. Os dois tipos de luz UV (200-400 nm) e luz visível (400-800 nm) são frequentemente empregados dependendo do tipo de fotoiniciador adicionado. ¹⁵⁸

A luz UV é uma fonte de irradiação amplamente disponível para ativar fotoiniciadores como sal acilfosfinato de lítio (LAP), 2-hidroxi-1- [4- (2-hidroxietoxi) fenil] -2-metil-1- propanona (Irgacure 2959) e propionamide (VA-086) com alta absorção na região UV. No

entanto, a luz UV confere uma energia relativamente alta que pode causar danos ao DNA das células e interrupção dos processos celulares ¹⁵⁹. Embora a atividade celular não seja afetada pela exposição à luz de curto período, a irradiação de luz UV prolongada pode reduzir estritamente a viabilidade celular. ¹⁶⁰ Para compensar isso, as luzes violeta e azul (400–490 nm) são usadas para substituir a luz UV, entretanto, dependendo do tipo de fotoiniciador, a fotoativação pode ser eficiente ou não. ¹⁶¹

GelMA tem sido amplamente utilizado para várias aplicações biomédicas, devido a suas propriedades biológicas adequadas e características físicas ajustáveis. Além disso, GelMA é uma biotinta que pode ser manipulada por diferentes metodologias, incluindo micromoldagem, automoldagem, fotolitografia suave, bioimpressão e técnicas microfluídicas para gerar formatos com alta definição visando às aplicações nas pesquisas de biologia fundamental, sinalização celular, entrega de fármaco e biossensor. ¹⁶² Os sistemas de hidrogel híbrido também podem ser formados pela mistura do GelMA com nanopartículas, tais como nanotubos de carbono e óxido de grafeno, e outros polímeros para formar materiais com propriedades e características combinadas desejadas nas aplicações biológicas específicas. ¹⁶³ Pesquisas na área de engenharia dos tecidos demonstraram o desempenho excepcional dos hidrogéis baseados no GelMA para produzir os tecidos ósseos, cartilaginosos, cardíacos e vasculares, entre outros. ¹⁶⁴⁻¹⁶⁷

1.2.1. Propriedades do GelMA e proliferação celular

A caracterização das propriedades físicas (porosidade, módulo de elasticidade, degradação e intumescimento na presença de água) e os parâmetros de resposta celular (viabilidade celular, adesão, proliferação e diferenciação) no hidrogel GelMA foram detalhadamente reportados na literatura. GelMA oferece grande versatilidade através do ajuste dos parâmetros de síntese e das condições de reticulação. ¹⁶⁸ Grau de metacrilação, concentração do GelMA, concentração de fotoiniciador e tempo de exposição a luz UV são os principais parâmetros que permitem o ajuste das propriedades mecânicas do GelMA. ¹⁶⁸ Nichol et al. produziram o GelMA de diferentes graus de metacrilação: "alto" (81,4 \pm 0,4%), "médio" (53,8 \pm 0,5%) e "baixo" (19,7 \pm 0,7%), os quais correspondem a 20%, 1,25% e 0,25% do volume MA adicionado à reação da síntese, respectivamente (Figura 34-A). ¹⁶⁹ Além disso, verificaram que ao manter um grau constante de metacrilação e aumentar a concentração do GelMA, o módulo de compressão aumentou significativamente em todas as condições testadas (Figura 34-B). ¹⁶⁹ Pepelanova et al. mostrou que nas mesmas condições e concentrações do GelMA e de fotoiniciador de UV mais alta pode resultar a um material mais rígido,

este efeito foi especialmente pronunciado para o GelMA de grau alto de metacrilação (Figura 34-C) ¹⁷⁰. Lee et al. investigaram o efeito das diversas concentrações do GelMA sobre a porosidade, mostrando que o tamanho dos poros foi inversamente proporcional às concentrações do GelMA, as imagens de SEM indicaram que a porosidade do GelMA 25% (m/v) possuem tamanhos e formas uniformes em comparação com o GelMA 5% (m/v), o tamanho de poro do GelMA 5% foi de 34 µm, enquanto o de 15% foi de 12 µm e o de 25% foi de 5µm (Figura 34-D e E). ¹⁷¹ Nichol et al. investigaram a viabilidade das células de fibroblastos após 8 h do encapsulamento no GelMA 10% (m/v) ($82 \pm 2\%$) ou 15% ($75 \pm 4\%$). Em geral, a viabilidade celular melhora com a diminuição da concentração do GelMA e, as perdas de viabilidade podem ocorrer devido ao estresse de encapsulamento, limitações de nutrientes e porosidade inadequada ao intumescimento transitório após a colocação em meio de cultura, tudo isso pode acarretar a dificuldade para as células esticarem e desenvolver sua morfologia diferenciada (Figura 34-F e G). ¹⁶⁹

Figura 35. As propriedades do GelMA podem ser ajustadas através dos parâmetros de síntese, concentração e condições de reticulação. A) A adição de MA gera o aumento do grau de metacrilação. B) e C) O aumento da concentração do GelMA incrementa a rigidez do material e diminui a diferenciação celular. D) A alta concentração do GelMA reduz significativamente os tamanhos dos poros. E) A intensidade de luz no processo de reticulação aumenta a rigidez do GelMA. F) e G) A influência da concentração do GelMA pode alterar a morfologia e a proliferação celular.



Fonte: Adaptado ¹⁶⁹, ¹⁷⁰ e ¹⁷¹.

Os hidrogéis GelMA funcionam como um material de matriz para a cultura celular nos experimentos 2D e 3D, devido à biocompatibilidade combinada de propriedades mecânicas e presença de compostos bioativos, a qual promovem a adesão e proliferação celular. Além disso, as células podem ser suspendidas em soluções de pré-polímero do GelMA, após a reticulação pela luz, forma-se uma estrutura 3D carregada com células. ¹⁶⁹

Figura 35 sumariza as propriedades finais do GelMA incluindo rigidez, tamanho de poros e proliferação celular que podem ser ajustadas através dos parâmetros como concentração e grau de funcionalização de hidrogel e a intensidade de luz UV no caso do uso de fotoiniciador UV. ¹⁷⁰

Figura 36. As propriedades finais do GelMA incluindo rigidez do hidrogel, tamanho de poros e a proliferação celular podem ser ajustadas através dos parâmetros como concentração e grau de funcionalização do GelMA e a intensidade da luz UV usando o fotoiniciador UV.



Fonte: Adaptado 170.

1.3. Câncer de pele e Melanoma

O câncer de pele é uma neoplasia maligna de alta incidência em todo o mundo e corresponde a 27% de todos os tipos de câncer diagnosticados recentemente no Brasil, de acordo com o Instituto Nacional de Câncer (INCA), representando uma preocupação significativa para a saúde pública. O câncer de pele é provocado pelos danos não reparados no ácido desoxirribonucleico (DNA) que desencadeiam mutações genéticas levando ao crescimento desordenado das células com potencial de migrar-se e causar metástase. ¹⁷²

Em humanos, dois tipos principais de câncer de pele são observados, o melanoma e o não melanoma. Não melanoma é subdividido em carcinoma basocelular e carcinoma espinocelular, ambos surgem da epiderme, é o tipo mais comum e frequente e tem baixa letalidade e capacidade metastática em comparação com o câncer de pele melanoma. ¹⁷³

O melanoma é o tipo de câncer de pele mais agressivo que leva à alta mortalidade com a marca notória de alta multirresistência, recorrência e potencial de metástase. ¹⁷⁴ Os melanócitos resididos principalmente na camada basal da epiderme produzem o pigmento de melanina destinado à cor da pele, entretanto, a transformação anormal dos melanócitos pode dar origem

ao surgimento do melanoma. ¹⁷² O melanoma pode aparecer em diversas regiões do corpo. O melanoma tratado em estágio inicial apresenta uma alta taxa de recuperação. Entretanto, o atraso no diagnóstico e tratamento do câncer de pele e o tipo de melanoma metastático reduzem drasticamente o índice de sobrevivência do paciente.

A profundidade do melanoma é um indicador importante do prodiagnóstico do índice de sobrevivência para melanoma cutâneo. A espessura de Breslow e o nível de Clark são dois sistemas mais utilizados que descrevem a profundidade da penetração do melanoma na pele (Figura 36). Clark é um sistema que emprega a morfologia da pele para estimar o avanço do melanoma na pele e é classificado em cinco níveis: I: o câncer está confinado à epiderme (a camada externa da pele); II: o câncer invadiu a derme papilar (a camada mais externa da derme, a próxima camada da pele); III: o câncer invadiu toda a derme papilar e está tocando a próxima camada mais profunda da derme; IV: o câncer invadiu a próxima camada mais profunda, a derme reticular. V: o câncer se espalhou para o tecido subcutâneo. ¹⁷⁵

O índice de Breslow é baseado na profundidade de melanoma e é medida em milímetro (mm) da superfície da pele até o local do melanoma. Breslow é uma escala preditiva para analisar o avanço de um melanoma com precisão e avaliar o risco de metástases em linfonodos propondo um tratamento adequado. Em geral, Breslow mais superficial indica uma chance menor de que o tumor se espalhe e uma melhor perspectiva de sucesso do tratamento. Quanto mais espesso for o melanoma, maior será sua chance de metástase. ¹⁷⁶

Figura 37. A profundidade do melanoma é avaliada pelo nível de Clark e o índice de Breslow. Os níveis de Clark, I a V (um a cinco), se baseia na anatomia da pele (epiderme, derme papilar, derme reticular, tecido subcutâneo). Já o índice de Breslow é baseado numa medida em milímetros da profundidade do melanoma.



Fonte: Adaptado 175.

A exposição à luz UV é um fator de risco para não melanoma e melanoma causando danos ao DNA, mutações, respostas inflamatórias e estresse oxidativo. ¹⁷⁷ No entanto, o melanoma também pode ocorrer em áreas específicas da pele que não são expostas à luz UV, como a palmoplantar, pois essas superfícies estão sujeitas a enormes esforços mecânicos. ¹⁷⁸ Outros fatores de risco são a obesidade, infecção de vírus como o papilomavírus humano (HPV), a exposição aos produtos químicos, histórico familiar de câncer de pele, pele clara e imunossupressão. ¹⁷⁹

A excisão cirúrgica é o tratamento mais aplicado ao melanoma, porém, apesar da eficácia dessa terapia convencional em reduzir a progressão e eliminar o melanoma, os pacientes comumente sofrem de lesões profundas e desfiguração estética. ¹⁷⁸ Portanto, outras opções terapêuticas, como quimioterapia, radioterapia, terapia fotodinâmica (PDT), imunoterapia e terapia direcionada também são adotadas, dependendo da localização do tumor, estágio e perfil genético. ¹⁸⁰

PDT é um tratamento assistido por luz que usa a combinação de fotossensibilizador, luz visível e oxigênio para gerar as espécies reativas de oxigênio (ROS), que desencadeia danos irreversíveis às células tumorais e vascularização associada ao tumor. ¹⁸¹ Essa modalidade de tratamento tem sido amplamente utilizada para cânceres superficiais, incluindo câncer de pele, cabeça e pescoço, mama e carcinoma basocelular, devido à citotoxicidade minimamente invasiva e extremamente seletiva. ¹⁸²⁻¹⁸⁵ O estudo relatou que a PDT é uma terapia adjuvante promissora e talvez uma opção de tratamento paliativo adequada para pacientes com melanomas metastáticos cutâneos em estágio III / IV. ¹⁸⁰

A abordagem clínica da PDT depende da entrega de luz apropriada e concentração de fotossensibilizador suficiente na presença de oxigênio para o tecido tumoral alvo. PDT pode ser realizada com vários tipos de fontes de luz, incluindo lasers, luz incandescente, diodo emissor de luz (LED), fibra óptica e luz do dia. ¹⁸⁶ A luz de diferentes comprimentos de onda está relacionada não somente ao espectro de absorção do fotossensibilizador, mas também à profundidade de penetração no tecido. Figura 37 mostra a relação entre a profundidade de penetração na pele e os comprimentos de onda usando sua cor associada que incluem ultravioleta (300-350 nm), violeta (400-405 nm), azul (400-470 nm), verde (470-550 nm), amarelo (560-600 nm), vermelho (630-700 nm) e infravermelho (700-1200 nm). Em geral, quanto maior o comprimento de onda, mais profunda será a penetração nos tecidos. Dependendo do tipo de tecido, a profundidade da penetração é inferior a 1 mm a 400 nm, 0,5 a 2 mm a 514 nm, 1 a 6 mm a 630 nm e máximo de 700 a 900 nm. ¹⁸⁷ Os vários tipos de células e tecidos do corpo têm suas características únicas de absorção de luz, cada uma absorvendo luz

em comprimentos de onda específicos. ¹⁸⁸ Para melhores efeitos, o comprimento de onda usado deve permitir a penetração ideal da luz nas células ou tecidos-alvo. A luz vermelha pode ser usada com sucesso para alvo localizado mais profundo e luz azul pode ser útil para o tratamento de doenças de pele localizadas dentro da epiderme na PDT. ^{189, 190} Para alcançar a camada mais profunda, por exemplo, derme, que muitas vezes é o objetivo da PDT para câncer de pele, o uso de uma luz penetrante com maior comprimento de onda é desejável.



Figura 38. Profundidade de penetração de diferente comprimento de onda de luz na pele humana.

Fonte: Adaptado 187

Diversos estudos demonstraram que a cultura de células de melanoma 3D promove aumento da expressão do fator de crescimento correlacionado com a progressão da doença para prever melhor resistência aos medicamentos quimioterápicos e metástase do melanoma. 191, 192 Por tanto, modelos de melanoma aprimorados são necessários para investigar os mecanismos biológicos subjacentes que medeiam a progressão do tumor e a resistência à terapia, bem como para facilitar o desenvolvimento de terapias direcionadas mais eficazes, refinando assim os resultados clínicos.

Hipoderme

As co-culturas são altamente relevantes para os estudos de fármacos pois fornecem um modelo de tecido humano in vivo mais representativo do que os modelos animais e permitem testes de alto rendimento e monitoramento aprofundado dos efeitos das fármacos nas interações célula-célula. 193 Além disso, os modelos de co-cultura celular 3D são reconhecidos como modelos confiáveis para mimetizar o microambiente tumoral, o uso de pelo menos duas linhagens celulares diferentes têm mostrado que permite estabelecer as interações das células normais e as células tumorais reproduzindo a arquitetura e a heterogeneidade celular dos tecidos tumorais. ¹⁹⁴ Um estudo desenvolveu um modelo 3D de co-cultura das células hepáticas, estreladas, Kupffer e endoteliais, e demonstrou que este modelo detectou melhor a lesão hepática induzida por drogas, incluindo efeitos espécie-específicos dos fármacos, quando comparado a culturas de hepatócitos em monocamada. ¹⁹⁵ Outro estudo estabeleceu um modelo de co-cultura com até três tipos de células, carcinoma de cólon humano (Caco-2), produtora de muco (HT29) e leucêmicas Raji B, para projetar um modelo que mimetize com mais precisão a camada epitelial do intestino delgado, concluiu que a permeação de insulina e nanopartículas contendo insulina foi maior no modelo de co-cultura dos três tipos de células do que a co-cultura da Caco-2 e HT29, isso sugere que o modelo celular de co-cultura tripla Caco-2/HT29/Raji B pode ser confiável para obter um modelo in vitro mais fisiológico, funcional e reprodutível da barreira intestinal. ¹⁹⁶

2. Objetivos

O presente estudo visa ao desenvolvimento de um modelo de melanoma 3D *in vitro* usando GelMA fotocurável para encapsular as células de melanoma (B16F10) e fibroblasto (3T3) produzindo uma estrutura 3D de co-cultura para avaliar a eficiência das MEs carregadas com Hy na PDT. As nanoformulações foram produzidas pelo método de emulsificação espontânea, caracterizadas pelo tamanho, forma e propriedades físico-químicas das partículas. Para o modelo *in vitro* 3D, a viabilidade celular, proliferação e citoesqueleto, como F-actina e núcleos e fator humano induzível por hipóxia-1 alfa (HIF-1 α), foram analisadas para comprovar a formação de tecido tumoral, além disso, a penetração de Hy e o acúmulo intracelular de Hy foi investigado na microscopia confocal de varredura a laser (*confocal laser scanning microscopy*, CLSM).

3. Materiais e métodos

3.1. Materiais

Brometo de 3- (4,5-dimetil-2-tiazolil) -2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT), gelatina de pele porcina, anidrido metacrílico (MA), lítio fenil (2,4,6-trimetil benzoil) fosfinato (LAP), meio de

Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), kit de ensaio CCK-8 e kit de ensaio imunoenzimático (ELISA) de HIF-1 α adquiridos da Sigma Aldrich. Kit colorimétrico de viabilidade celular LIVE/DEAD, coloração de 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) e Phalloidina FITC (coloração de F-actina) foram adquiridos da Thermo Fisher Scientific. Phosal® 50 PG (50% de fosfatidilcolina em propilenoglicol) foi doado pela Lipoid. Hy foi obtida por meio da síntese química realizada pelo Prof. Dr. Anderson Orzari Ribeiro (Universidade Federal do ABC- Santo André-SP) de acordo com o protocolo.

3.2. Cultura celular

As linhagens de células 3T3 de BALBc /3T3 clone A31 (ATCC® CCL-163TM) de fibroblasto de camundongo (*Mus musculus*) e de B16F10 (ATCC® CCL-6475TM) derivadas de melanoma murino foram cultivadas em substrato plano e sólido da garrafa de poliestireno com meio de cultura DMEM suplementado com 10% soro fetal bovino (SFB, Cultilab, Brasil) e antibióticos penicilina 10 000 U.I. mL⁻¹ e estreptomicina 10 mg mL⁻¹ (Cultilab, Brasil). As células foram mantidas em estufa a 37 °C e 5% CO₂.

A subcultura das células foi feita a cada três dias, retirou-se o meio de cultura e adicionouse 1 mL da solução salina tamponada com fosfato (PBS) pH 7,4 para a lavagem. Posteriormente, adicionou-se 1 mL de 1 mg mL⁻¹ enzima proteolítica tripsina com 0,03% de etilenodiaminotetracético (EDTA) para digerir a proteína extracelular induzindo a remoção das células do substrato de cultura. Após isso, meio de cultura foi adicionado para neutralizar a tripsina, esta solução foi transferida para um tubo cônico e centrifugada a 1000 rpm por 1 min. O sobrenadante foi descartado, as células depositadas no fundo do tubo foram ressuspendidas com meio de cultura até a homogeneização.

3.3. Síntese do GelMA

GelMA foi sintetizado de acordo com os protocolos descritos na literatura ^{168, 197}. A gelatina de pele porcina foi misturada a 10% (m/v) em tampão fosfato-salino (PBS) sob agitação a 60 °C até totalmente dissolvida. MA foi adicionado à solução a uma taxa de 0,5 mL min ⁻¹ até que uma concentração de 8% (v/v) fosse obtida na solução de gelatina. A solução foi então agitada por 1 h a 50 °C, seguida por diluição de duas vezes com PBS a 50 °C e dialisada contra água destilada usando a membrana de diálise de 12 kDa por uma semana a 40 °C para remover os resíduos da reação. A solução GelMA foi congelada uma noite a –80 °C e liofilizada a –50 °C

por uma semana. GelMA liofilizado foi armazenado a -20 °C até uso posterior.

Figura 38 ilustra o procedimento da fabricação do modelo *in vitro* 3D de melanoma seguido pela aplicação de MEs contendo Hy e o tratamento da PDT. Para construções de melanoma 3D. As células B16F10 e 3T3 foram suspendidas na solução de 6% de GelMA em PBS contendo 0,3% de LAP (m/v) na densidade de 1×10^7 células mL⁻¹ e transferidas para um molde de polidimetilsiloxano (PDMS) (8 × 8 × 3 mm) e, em seguida, fotorreticuladas por exposição à luz violeta de 403 nm a uma intensidade de 40 mW cm⁻² por 15 s. As construções de GelMA reticuladas foram cultivadas em DMEM com 10% de SFB a 37 °C, 5% de CO₂ por 14 dias. O modelo de melanoma 3D é tratado com a ME carregada com Hy por 24 h e seguido pela PDT usando um conjunto de lâmpadas LED amarelas (λ = 590 nm e 10 J cm⁻²).

Figura 39. A solução GelMA contendo fibroblastos e células de melanoma e 0,3% LAP é moldada em um molde PDMS e reticulada pela irradiação de luz violeta ($\lambda = 403$ nm, 40 mW cm⁻²) por 15 s. Após 14 dias de cultura em DMEM, o modelo de melanoma 3D foi tratado com a ME contendo Hy por 24 h e seguido pela PDT usando luz amarela ($\lambda = 590$ nm).



Fonte: Autoria própria

3.4. Propriedade mecânica

Os hidrogéis GelMA foram avaliados quanto ao módulo de Young usando máquinas de teste universal (6800 Series, Instron, Estados Unidos) com uma rampa de 2,0 N min⁻¹ até um máximo de 100,0 N. Os dados foram plotados como uma curva tensão-deformação e o módulo de Young foi calculado como a inclinação da região linear desta curva entre 0 e 20% de deformação.

3.5. Ensaio de imunofluorescência

Para observar a morfologia das células ao longo do tempo de cultura, a coloração por imunofluorescência da F-actina e núcleos foi analisada. As amostras foram fixadas em 4% (m/v) paraformaldeído por 15 min e, em seguida, 0,1% (v/v) Triton X-100 em PBS por 15 min para permeabilizar a membrana celular, seguido de bloqueio com 1% (m/v) BSA em PBS por 15 min em temperatura ambiente. Para a coloração do citoesqueleto com F-actina, as amostras foram então embebidas em diluição 1:1000 de Phalloidina FITC em 0,1% (m/v) BSA durante 1 h a 37 °C. Finalmente, os núcleos foram corados com DAPI por 10 min a 37 °C. As imagens foram adquiridas com um microscópio invertido de fluorescência Zeiss Axiovert 200M (Zeiss, Alemanha).

Dois marcadores celulares, CellTracker Red CMTPX e CellTracker Green CMFDA (Invitrogen, Estados Unidos), foram usados para marcar fibroblastos (3T3) e malignas melanomas (B16F10), respectivamente. As células foram incubadas com as soluções diluídas com a concentração de trabalho final de 10 µmol L⁻¹ em PBS por 30 min. Após esse tempo, as soluções de CellTracker foram removidas e lavadas com PBS por três vezes. As células marcadas foram introduzidas nas soluções GelMA para produzir os modelos de melanoma 3D.

3.6. Determinação de HIF-1a em modelos de melanoma 3D

Os sobrenadantes de meio de cultura foram coletados da cultura de modelo de melanoma 3D e centrifugados a 3 500 × g por 5 min, a 4 °C para remover qualquer impureza. A proteína HIF-1 α secretada foi quantificada usando o kit HIF-1 α ELISA de acordo com os protocolos do fabricante. O controle foi preparado a partir da co-cultura das células B16F10 e 3T3 em monocamada.

3.7. Ensaio de citotoxicidade

Para o modelo de melanoma 3D, o kit colorimétrico Live/Dead Cell Viability Assay (Invitrogen) foi usado para observar as mudanças de viabilidade das células na cultura, de acordo com as instruções do fabricante. As células foram incubadas com reagentes de Calceína AM (2 μ g mL⁻¹, em PBS) e homodímero de etídio (4 μ g mL⁻¹ em PBS) por 30 min a 37 °C, protegidos da luz. As imagens de fluorescência verde e vermelha de células viáveis e não viáveis, respectivamente, foram capturadas usando um microscópio invertido de fluorescência (Axiovert 200M, Zeiss). O ensaio CCK8 foi também utilizado para avaliar a viabilidade celular nos modelos 2D e 3D. Após tratamento da PDT, as células foram incubadas com 10% CCK-8

em DMEM por 4 h a 37 °C. A absorbância das amostras e os correspondentes controles foi determinada a 450 nm usando um leitor de placa (Multiskan GO, Thermo Scientific).

3.8. A penetração e acumulação intracelular de Hy no modelo de melanoma 3D

Para analisar a internalização celular de Hy no modelo 3D de melanoma, as células foram fixadas com 4% paraformaldeído por 20 min, e os núcleos foram corados por DAPI por 10 min. Posteriormente, a internalização celular de Hy livre no DMEM e Hy encapsulada em MEs foi analisada por microscopia de varredura a laser confocal (CLSM, LSM 780, Carl Zeiss, Alemanha) usando o comprimento de onda de excitação de 543 nm gerado por um feixe de laser He-Ne. A emissão de fluorescência foi detectada em um comprimento de onda de 590 nm.

3.9. Análise estatística

Os resultados quantitativos foram apresentados em médias ± desvio padrão (DP) de pelo menos três valores obtidos pelos três experimentos independentes. A significância estatística entre os grupos experimentais foi analisada pelo teste de análise de variância (ANOVA) e pósteste de Tukey. O nível de significância estatística foi definido.

4. Resultados e discussões

4.1. Construção de modelo in vitro 3D de melanoma

Primeiramente, foi investigada a melhor condição para a encapsulação celular no GelMA utilizando diferentes concentrações de pré-polímero do GelMA, 10, 8 ou 6% e a reticulação pela luz violeta. Este processo gerou uma estrutura 3D estável a 37 °C. Na Figura 39-A, as imagens ópticas mostram que após 3 dias de cultura, apenas no GelMA 6% as células se alongaram e desenvolveram sua morfologia diferencial. Já em concentrações mais altas de GelMA (10 e 8%), as células permaneceram esféricas. Durante o processo de encapsulação, as células podem sofrer estresse, especialmente, em alta concentração do GelMA, o andaime se torna um sólido rígido e compacto com porosidade diminuída e inadequada para perfundir o meio de cultura, o que compromete gravemente a proliferação celular devido ao suprimento insuficiente de nutrientes e oxigênio na cultura celular 3D. ¹⁶⁹ Uma vez que as respostas celulares incluindo viabilidade celular, adesão, proliferação e diferenciação dependem muito da

as propriedades físicas do biomaterial, como porosidade e intumescimento líquido, as quais são vitais para alcançar uma condição ideal do cultivo de diferentes tipos de células e aplicação fisiológica. Assim, GelMA demonstrou grande versatilidade através das suas propriedades ajustáveis como concentração, parâmetros de síntese e condições de reticulação. ^{170, 171}

As propriedades mecânicas do GelMA foram estimadas através das curvas de tensãodeformação (Figura 39-B). Os módulos de Young de 6, 8 e 10% (m/v) GelMA foram 4,84 \pm 0,51, 7,73 \pm 0,39 e 11,94 \pm 0,78 kPa, respectivamente (Figura 39-C). Observou-se que à medida que a concentração de GelMA diminui, a rigidez também reduz. O resultado demonstrou que o uso do GelMA a 6% (m/v) para co-cultura de células de melanoma e fibroblastos poderia fornecer um ambiente mais rígido semelhante comparável aos módulos de Young da pele humana relatados anteriormente entre 4,5 kPa e 8 kPa. ¹⁹⁸ Além disso, um estudo *in vivo* usando camundongos nude também mostrou que o módulo de Young do tecido melanoma é maior do que o não melanoma (4,93 \pm 2,38 vs. 0,98 \pm 0,41 kPa). ¹⁹⁸

Figura 40. A) Imagens de microscopia óptica da co-cultura das células B16F10 e 3T3 em 6, 8 e 10% (m/v) GelMA seguido por 15 s de irradiação de luz violeta (barra de escala = 100 μ m). B) Curvas de tensão-deformação do GelMA de 6, 8 e 10% (m/v). C) Módulos de Young calculados. Os dados são expressos como médias ± DPs (*n* = 3) e diferença estática significativa: * *p* < 0,05, ** *p* < 0,01, *** *p* < 0,001).



Fonte: Autoria própria

A viabilidade celular da co-cultura celular 3D (células B16F10 e 3T3) em 6% (m/v) do GelMA foi verificada por coloração Live/Dead (Figura 40-A). A maioria das células foi viável ao longo de 14 dias de cultura, as células mostraram boa proliferação e desenvolveram morfologia alongada dentro do GelMA reticulado. Visto que GelMA é um hidrogel fotocurável e amplamente utilizado como matriz extracelular devido a suas propriedades mecânicas ajustáveis que permitem a criação de microtecidos complexos. ¹⁹⁹ Além disso, como mostrado na Figura 40-B e 40-C, o aumento das redes filamentosas de F-actina ao redor das células evidenciou que a co-cultura de células B16F10 e 3T3 promoveu a organização do citoesqueleto suportada pelas interações entre os dois tipos de células e entre células e GelMA. Diversos estudos *in vitro* indicaram que as redes F-actina são uma assinatura molecular única na criação de uma estrutura dinâmica para a cultura de células 3D e pode gerar comportamentos mecânicos modulando a adesão, migração e divisão celular. ^{200, 201}

A avaliação da co-cultura das células B16F10 e 3T3 foi examinada usando dois marcadores celulares de longo prazo diferentes. As células foram previamente marcadas e depois incorporadas em GelMA 6%. Figura 40-D mostra o monitoramento de ambas as linhas celulares ao longo de 7 dias. Observou-se que o arcabouço do GelMA permitiu a manutenção da interação celular para garantir seu crescimento adequado. Os fibroblastos como principais componentes celulares dentro do estroma tumoral foram relatados para promover interações dinâmicas de células tumorais com componentes acelulares que contribuem para a formação da matriz extracelular e estimulam a interação célula-célula, crescimento celular e invasão. ²⁰² Além disso, os fibroblastos podem proteger as células tumorais da defesa imunológica ²⁰³. Essas características afetam tremendamente a morfologia do tumor e a expressão gênica, juntamente com o aumento da resistência à quimioterapia e radioterapia. ^{204, 205} Assim, muitos estudos também enfocam o direcionamento de fibroblastos associados a tumores para o desenvolvimento de novas terapias contra câncer. ²⁰⁶ Todos esses dados sugeriram que o modelo de co-cultura de melanoma reflete melhor a estrutura real do estroma tumor *in vivo* e fornece uma abordagem promissora para prever a eficácia antitumoral dos candidatos a fármacos.

A viabilidade celular baseada na atividade metabólica foi verificada pelo ensaio CCK-8 (Figura 40-E). Como resultado, a atividade metabólica aumentou ao longo do tempo na cocultura de células 3D, fornecendo evidências de que a construção de GelMA leva à criação de uma natureza proliferativa celular com os domínios de adesão celular, como RGD e é suficiente para suportar o crescimento da co-cultura das células de melanoma e fibroblasto por período prolongado. Esse resultado corroborou com a análise de Live/Dead, sendo que nenhuma morte significativa foi observada em 14 dias de cultura. Por tanto, a foto-reticulação do GelMA por irradiação violeta durante 15 s $(0,6 \text{ J cm}^{-2})$ não afetou significativamente a viabilidade celular.

A hipóxia no interior da co-cultura celular 2D e 3D foi detectada pelo ensaio ELISA de HIF-1 α liberado no meio de cultura (Figura 40-F). Em 24 h, a concentração de HIF-1 α foi igualmente baixa nos dois sistemas. Para incubações mais longas, o nível de HIF-1 α foi significativamente maior no 3D do que no 2D, e o último continha HIF-1 α detectável muito baixo para quantificação. Como esperado, as condições de hipóxia dificilmente são reproduzidas na cultura celular 2D convencional. Por outro lado, no microambiente 3D complexo, o núcleo de hipóxia ocorre em resposta a gradientes heterogêneos de oxigênio e promove a liberação de sinais solúveis como HIF-1 α , que desempenha como um aspecto patológico tumoral chave para induzir a migração e invasão celular, e permite uma interação celular eficiente para avaliar as respostas da terapia aos inibidores dessa sinalização. ²⁰⁷

Figura 41. O ensaio de imunofluorescência foi conduzido para observar a viabilidade celular e a proliferação celular da co-cultura de células 3T3 e B16F10 em 6% GelMA + 0,3% LAP. A) Coloração de células Live/Dead. Barra de escala = 500 µm. B) Coloração de F-actina / núcleos por Phalloidin FITC / DAPI em 3, 7 e 14 dias. Barra de escala = 500 µm. C) Intensidade de fluorescência de F-actina/núcleos durante 14 dias. D) células B16F10 (cor verde) e células 3T3 (cor magenta) foram marcadas com CellTrackers CMTPX e CMFDA, respectivamente. Barra de escala = 500 µm. E) Ensaio de CCK-8 mostra a proliferação celular favorável no GelMA foto-reticulado. F) as expressões de HIF-1α nos modelos 2D e 3D foram medidas após 1, 3 e 7 dias para ambos os sistemas e 1, 3, 7, 10 e 14 dias para o modelo 3D. Os dados são expressos como média ± DP (n = 3) e diferença estática significativa: ns = não há diferença significativa, * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001.



Fonte: Autoria própria

4.2. Avaliação de citotoxicidade nos modelos 2D e 3D após a Hy-PDT

No tratamento PDT com 24 h de incubação de Hy livre e Hy nas MEs em 0, 1, 50, 100 e 200 nmol mL⁻¹, seguido por irradiação de LEDs amarelos ($\lambda = 590$ nm e 10 J cm⁻²), as MEs contendo Hy exibiram citotoxicidade mais pronunciado e foi significativamente menor (~2,5 vezes) (p < 0,05) do que a Hy livre nas culturas de células em 2D e 3D (Figura 41).

Figura 42. Citotoxicidade dos modelos de melanoma 3D após o tratamento com Hy-PDT usando a coloração de células vivas / mortas. As células foram previamente tratadas com Hy livre em DMEM e Hy encapsulada nas M1C e M2A seguido pela PDT (irradiação de LEDs amarelos, $\lambda = 590$ nm e 10 J cm⁻²), a cor vermelha indica célula morta (Dead) e a cor verde indica célula viva (Live). Barra de escala = 300 µm.



Fonte: Autoria própria

Para melhor comparar as culturas de células em 2D e 3D, a atividade metabólica e a morte celular foram verificadas pelo ensaio colorimétrico de CCK-8 (Figura 42). As células cultivadas no sistema 3D exibiram menos suscetibilidade (~ 3 vezes) do que aquelas no 2D ao tratamento PDT. No entanto, os resultados obtidos das M2A e M1C contendo Hy permaneceram mais fototóxicos do que o Hy livre em ambos os modelos de melanoma co-cultivado de células.

Os fibroblastos e as células de melanoma co-incorporados no GelMA permitem que eles se infiltrem na organização da estrutura 3D, criando estados de crescimento heterogêneos para ambas as linhas celulares. Além disso, o núcleo hipóxico apresentado na cultura de células 3D pode induzir a maioria das células nesta região a se dividir ou sofrer apoptose; portanto, as células malignas encontradas na periferia mostram a maior proliferação celular e se tornam mais invasivas quando suportadas pela construção do GelMA e outras células do estroma, como fibroblastos. ^{134, 208} A regulação positiva da expressão metabólica relacionada ao HIF em células de melanoma cultivadas em 3D foi relatada como uma das principais desvantagens para agentes terapêuticos, uma vez que as culturas de células 3D são expostas de forma heterogênea a oxigênio, nutrientes e drogas, portanto, esses microtumores hipóxicos são em sua maioria negativamente suscetível a medicamentos e contribui para o desenvolvimento de resistência aos medicamentos. ²⁰⁹ Portanto, o uso de GelMA para recriar modelos de melanoma 3D funcional permite recapitular uma condição celular relevante para refletir a morfologia do tecido nativo e contribuir para a previsibilidade melhorada da eficácia do medicamento em relação às culturas 2D tradicionais.

Figura 43. As células foram previamente tratadas com controle = DMEM, Hy livre no DMEM e Hy encapsulada nas M1C e M2A seguido pela PDT (irradiação de LEDs amarelos, $\lambda = 590$ nm e 10 J cm⁻²). A atividade metabólica e a morte celular das culturas de células 2D e 3D após a Hy-PDT foram determinadas pelo ensaio CCK-8. Os dados são expressos como média ± DP (n = 3). Diferença estática significativa: *p < 0.05, **p < 0.01, ***p <0.001.



Fonte: Autoria própria

4.3. Intracelular acumulação das MEs carregadas com Hy no modelo de melanoma 3D

O modelo 3D de melanoma foi usado para avaliar a penetração de Hy a partir das MEs, CLSM analisou sua espessura total para detectar a fluorescência de Hy na distância Z. As Figura 43 A, B e C exibem a varredura multicamadas do modelo de melanoma 3D. As reconstituições das camadas mostrando a emissão de fluorescência de Hy são apresentados na Figura 43-D.

Figura 44. Imagens da CLSM para avaliar a penetração de Hy 200 nmol mL⁻¹ por 24 h. A) Controle, as células foram marcadas com DAPI. B) Hy livre, C) Hy-M1C, D) Hy- M2A. A coloração vermelha representa a Hy penetrada e o controle foi analisado pela coloração DAPI-núcleo (azul).



Fonte: Autoria própria

Observou-se que as MEs contendo Hy demonstraram maior penetração do que Hy livre no DMEM (p < 0.05) (Figura 44). Estudos têm mostrado que a ME potencializa penetração na

pele e tecido tumoral, uma vez que o fármaco hidrofóbico é encapsulado em um núcleo de óleo estabilizado por um filme interfacial de moléculas anfifilicas de tensoativos aumentando a partição do fármaco na membrana ²¹⁰. Embora a diferença dos tamanhos de partículas entre M1C e M2A não mostre uma influência significativa na penetração de Hy, no entanto, o maior teor de água do M1C (68%) em relação ao M2A (58%) pode auxiliar na diminuição da viscosidade, consequentemente aumentando a difusão, liberação e transporte do fármaco através da membrana. ²¹¹

As nanogotículas de Hy possuem uma permeabilidade facilitada pela membrana celular, devido às suas características anfifilicas premiam rapidamente a membrana plasmática carregando o composto encapsulado a acumular intracelularmente. ^{105, 114} Além do mais, a internalização celular de Hy pode ser atribuída ao fato de que as células tumorais expressam um grande número de receptores de lipoproteína de baixa densidade (LDL) em comparação com as células normais. ²¹² Portanto, o núcleo interno de ME composto por triglicerídeos e ésteres de colesterol têm uma alta afinidade para os receptores de LDL em células B16F10 cultivadas. ²¹³ Consequentemente, o acúmulo intracelular de Hy por meio dos receptores de LDL poderia ser alcançado mais alto nas células de melanoma. Embora esse recurso direcionado pelas MEs de Hy pudesse diminuir o acúmulo de Hy em células 3T3 saudáveis, nosso estudo anterior ainda demonstrou uma diferença significativa na fototoxicidade em comparação com a Hy livre para modelos de melanoma 2D e 3D. Os presentes resultados destacam a vantagem das MEs contendo Hy sobre sua forma livre para a penetração no tecido biológico.

Figura 45. Quantificação da intensidade da fluorescência (I.F.) de Hy na distância Z (µm). Os valores apresentados são a média da intensidade de fluorescência (I. F.) de 3 amostras independentes para uma profundidade de tecido *in vitro* de 47,01 µm.



Fonte: Autoria própria

5. Conclusão

A co-cultura das células de melanoma e fibroblastos no hidrogel GelMA foto-reticulado resultou um modelo de melanoma 3D *in vitro* apropriado devido às suas semelhanças notáveis, incluindo F-actina, expressão de HIF-1 α e espessura do tecido. As MEs contendo Hy foram desenvolvidos e testados diretamente nesses modelos 3D, estes mostraram maior resistência a Hy-PDT do que a cultura celular 2D convencional. Por meio de microscopia confocal, a penetração de Hy pode ser facilmente analisada por varredura ao longo do eixo Z, medindo a intensidade de fluorescência de Hy de cada camada. A fototoxicidade e a penetração das MEs contendo Hy foram mais potentes do que Hy livre, indicando que as nanogotículas de Hy podiam penetrar no tecido tumoral de forma mais eficiente e, por conseguinte, promover o efeito citotóxico. Este estudo sugere que esta plataforma *in vitro* construída pelo GelMA e células tumorais e epiteliais pode ser uma abordagem ideal para interrogar a triagem de fármacos e fornece a base para avaliar a eficiência dos nanocarreadores para câncer de pele e outras doenças relacionadas à pele.

Capítulo III. Órgão-em-chip (*Organ-on-chip*)

1. Introdução

A microfluídica é uma técnica relacionada à manipulação de fluidos de pequeno volume (geralmente de nano a micro litros) dentro de um canal de escala sub-milimétrica, ²¹⁴ devido a essa dimensão reduzida, vários fenômenos se tornam prevalentes em fluidos, tais como fluxo laminar, difusão molecular e transferência de massa e de calor, o que permitem melhorar a simulação e agilizar os estudos científicos nas áreas de biologia, medicina, química, engenharia de processos, transportes, ciências ambientais, microeletrônica, entre outras. ²¹⁵ Além disso, as vantagens como pequeno consumo de reagentes e de amostras, grande variedade do design de microcanais e o uso de materiais de menor custo e de fácil acesso incluindo polímeros elastoméricos (polidimetilsiloxano, PDMS, por exemplo) e materiais descartáveis como vidro, papel e filmes de transparência, fazem com que a microfluídica seja atrativa do ponto de vista econômico e tecnológico.

A microfluídica foi introduzida na comunidade biomédica por causa de seu grande potencial de criar os microdispositivos de modelos *in vitro*, conhecidos como órgão-em-chip (*organ-on-chip*, em inglês). ²¹⁶ Figura 45 mostra o esquema da evolução entre os modelos para o teste pré-clínico de fármacos e as vantagens dos modelos microfluídicos sobre os modelos tradicionais. ²¹⁷ Com o propósito de preencher a lacuna translacional entre os modelos *in vitro* e *in vivo* e melhorar a predição dos resultados clínicos, novas plataformas *in vitro* foram criadas para melhorar a mimetização da fisiologia do tecido humano integrando microfluídica, técnicas de microfabricação, biomateriais e engenharia de tecidos para criar os dispositivos, órgão-em-chips, que possibilitem a mimetização das funções específicas de órgão humano como o fluído fisiológico, o gradiente químico e a interação de célula-célula e célula-matriz extracelular, oferecendo o controle preciso do microambiente para as células proliferar e estruturar sob às condições similares ao sistema *in vivo*. ²¹⁸

A presença de microcanais nos sistemas microfluídicos permite o controle preciso do fluxo, permitindo o estudo de muitos processos biomecânicos importantes, como tensão de cisalhamento. ²¹⁹ Esses canais também podem ser usados para estabelecer com precisão gradientes complexos físicos (por exemplo, pressão intersticial) ou químicos (por exemplo, citocinas) no ensaio microfluídico de uma maneira mais precisa e sustentada do que em sistemas *in vitro* em macroescala. ²²⁰ Dispositivos microfluídicos podem conter células cultivadas em 2D ou 3D incorporadas em hidrogéis. ²²¹ Como essas plataformas são pequenas, elas requerem apenas pequenas quantidades de células e reagentes que geralmente são caros, raros ou difíceis de obter. As amostras biológicas no dispositivo são facilmente monitoradas por microscópios

ópticos. Além disso, os modelos de órgão-em-chip podem ser construídos usando exclusivamente as linhagens de células humanas fornecendo uma abordagem específica para abranger a compreensão da biologia das doenças, permitindo a descoberta de medicamentos de forma acelerada e econômica. ²²²

Figura 46. A comparação dos modelos microfluídicos com os modelos tradicionais *in vivo* e *in vitro*. O esquema mostra os diferentes modelos *in vitro* e *in vivo* disponíveis para o estudo e teste de fármacos antes do teste clínico em humanos. As vantagens dos modelos microfluídicos comparando com esses modelos são listadas.



Fonte: Adaptado 223

O combate humano contra doenças letais, como câncer e degeneração relacionada à idade, tem sido muito prejudicado pela falta de terapias eficazes, acessíveis e seguras. Isso pode ser parcialmente atribuído à ineficiência da prática atual no desenvolvimento de medicamentos, especialmente o baixo poder preditivo dos modelos pré-clínicos. ²²⁴ Nos últimos anos, por conta das implicações do uso de animais nos testes pré-clínicos como a imprecisão dos resultados, alto custo e questão ética, há uma busca intensa pelos novos modelos *in vitro* para teste de fármacos. ²²⁵ Em vista disso, os órgão-em-chips têm sido utilizados também para a análise de compostos com potencial terapêutico. Além disso, diversos órgãos como pulmão, fígado, intestino, rim, vaso sanguíneo e medula óssea foram reproduzidos com sucesso para avaliar as

respostas bioquímicas, metabólicas e genéticas, após os estímulos físicos e bioquímicos. ²²⁶ A grande perspectiva no futuro é a recriação do corpo humano inteiro com os órgão-em-chips integrados em um sistema que contenha fluido e células imunológicas. ²²²

Os critérios básicos para a construção de um órgão-em-chip abarcam a complexidade adequada, funcionalidade comprovada através do controle rigoroso dos parâmetros para reproduzir alguns dos principais atributos do microambiente *in vivo*. Esses elementos conforme resumidos na Figura 46 incluem estímulos biomecânicos, forças extrínsecas, gradientes químicos, interações célula-célula e sinalização celular como hipóxia. Essa complexidade influencia o fenótipo das células por meio de fatores mecânicos e bioquímicos e contribuem para o crescimento do tumor. Os parâmetros biomecânicos como forma, rigidez (ou elasticidade) e fluxo sanguíneo direcionam a manutenção e diferenciação das células. Os receptores da matriz extracelular e as moléculas de adesão, fibronectina, colágeno, integrina e caderina, exercem como regulador dinâmico nas interações entre as célula-célula e células-matriz extracelular, suas funções podem ser moduladas com produtos biológicos, incluindo anticorpos, ou fármacos de pequenas moléculas. ²²⁷ Entretanto, é importante mencionar que a escolha do sistema e a complexidade depende sempre do objetivo da pesquisa a ser abordada.

Um órgão-em-chip necessita demonstrar sua relevância fisiológica, mostrando sua potencialidade de recapitular características-chave de cenários *in vivo* e funcionalidades-chave de tecidos ou órgãos. ²²⁸ Além disso, o sistema de cultura deve ser robusto e altamente controlável para facilitar a padronização, alto rendimento e comercialização. Recentemente, há um crescimento enorme no desenvolvimento de órgão-em-chip com o objetivo final de facilitar modelos *in vitro* preditivos para os testes de fármacos. ²²⁸

Figura 47. Os componentes dinâmicos, físicos e bioquímicos de um microambiente *in vivo* para serem mimetizados em sistemas de órgão-em-chip: biomecânicos, forças extrínsecas, interação célula-célula, receptores e moléculas de adesão, hipóxia e metabolismo e os componentes solúveis.



Fonte: Adaptado 227

Nos tumores sólidos, a angiogênese ocorre devido à secreção dos fatores próangiogênicos pelas células do microambiente tumoral hipóxico, resultando em uma neovascularização. Essa nova vasculatura desempenha um papel crucial no crescimento e metástase do tumor, uma vez que transportam nutrientes, oxigênio, metabólitos, resíduos e células tumorais circulantes. Está bem estabelecido que a angiogênese é um fator fundamental para o crescimento tumoral superior a 1-2 mm de diâmetro do seu tamanho original. ^{229, 230} Hy-PDT mostrou o potencial de erradicar a angiogênese tumoral causada pela formação vascular excessiva. Chen et al. observaram nos modelos de camundongos que Hy em baixa concentração e dose de luz pode inibir o crescimento do tumor e interromper a formação excessiva de vasos sanguíneos ao redor do tumor. ²³¹ O potencial do direcionamento vascular da PDT pode destruir a vasculatura desordenada em tumores e beneficiar diversas doenças relacionadas a anomalias vasculares, como manchas de vinho do porto, degeneração macular e vasculatura tumoral. ²³²⁻ ²³⁴

As células endoteliais vasculares em organismos vivos são expostas constantemente ao estresse da tensão de cisalhamento, este exerce igualmente sobre as células endoteliais e tumorais para regular diversas respostas celulares. ²³⁵ Durante a medicação no processo terapêutico, o microambiente dinâmico com tensão de cisalhamento é geralmente negligenciado nos principais estudos *in vitro*. Isso demonstra a importância de desenvolver uma abordagem para impor estresse de cisalhamento nas células endoteliais e gerar vias de sinalização celular estimuladoras confiáveis.

Este capítulo apresenta o desenvolvimento de órgão-em-chip que mimetiza o efeito de tensão de cisalhamento do vaso sanguíneo para avaliar a eficiência fotodinâmica da Hy-PDT nas células endoteliais humanas.

1.1. Vaso sanguíneo e tensão de cisalhamento

Os vasos sanguíneos e capilares são os blocos básicos de construção de quase todos os órgãos e de muitas estruturas de tecido importantes, como a barreira hematoencefálica, os alvéolos de pulmão e o glomérulo renal. ²³⁶⁻²³⁸ A vasculatura permite a troca gasosa no corpo, bem como o transporte de nutrientes, resíduos, patógenos, células sanguíneas e células tumorais circulantes. ^{239, 240} A ausência de vascularização adequada num tecido pode induzir a formação de núcleos necróticos, esta falha tem sido problema comum em muitos modelos *in vitro* desenvolvidos. Além disso, as células endoteliais vasculares são ativas em muitos eventos de sinalização, como angiogênese causada por hipóxia, diferenciação de células-tronco, e a via de sinalização da insulina. ²⁴⁰ O sistema de vaso sanguíneo é indispensável na construção de qualquer processo conduzido pela circulação, como respostas inflamatórias, doenças cardiovasculares e cânceres.

A tensão de cisalhamento (*shear stress*, inglês) é uma força de arraste do fluxo sanguíneo que exerce constantemente sobre as células endoteliais regulando os componentes do sangue. Em humanos, a tensão de cisalhamento no vaso sanguíneo normalmente varia de 10 a 50 dina cm⁻². ²⁴¹ Esse fluxo de fluido gerado a partir do fluxo sanguíneo e fluido intersticial tem sido conhecido por desempenhar um papel importante como os reguladores químicos e biológicos tanto nas células endoteliais quanto nas células tumorais, vários receptores celulares podem

assumir o sentido do fluxo de fluido e executam diversos comportamentos dependentes do fluxo, como alterações morfológicas, migração celular e expressão de proteínas.²⁴² As células sob diferentes condições de tensão cisalhamento podem sofrer alterações fenotípicas, como alterações na expressão da proteína de adesão incluindo molécula de adesão celular endotelial plaquetária (PECAM-1), caderina endotelial vascular (VE-caderina) e receptor de fator de crescimento endotelial (VEGF) e outras proteínas que compõe a sua estrutura como proteína de junção célula-célula, actinas e integrinas. 243 A tensão de cisalhamento ajuda promover a sobrevivência e quiescência das células endoteliais através do VEGF, o qual é uma glicoproteína que age como um fator potente angiogênicos com a capacidade de induzir a permeabilidade dos vasos sanguíneos e proliferação de células endoteliais promovendo suas migrações e sobrevivências, bem como a formação e manutenção de novo de vasos sanguíneos a partir de precursores endoteliais. ²³⁵ Nos adultos, o VEGF desempenha um papel importante no controle de várias funções endoteliais, como proliferação, angiogênese, migração, vasodilatação e inflamação, 244, 245 e uma variedade de patologias, incluindo câncer e retinopatias, bem como em processos fisiológicos normais, como cicatrização de feridas e no ciclo reprodutivo feminino.²⁴⁶

As plataformas microfluídica *in vitro* com fluxo de fluido controlável se diferem da cultura celular estática por oferecer um microambiente dinâmico para a proliferação celular que permite uma investigação mais aprofundada de diversas respostas celulares e seus comportamentos dependentes de fluxo, incluindo mudanças morfológicas, migração celular, citotóxica e alterações bioquímicas (Figura 47).²⁴⁷ Alguns estudos relataram que compostos químicos ou nanopartículas exibiram alta dependência de tensão de cisalhamento na citotoxicidade quando testados em condições dinâmicas.^{248, 249} Este fenômeno demonstra a importância do desenvolvimento de um microchip que pode impor tensão de cisalhamento nas células endoteliais e afetar significativamente as vias de sinalização celular, além disso, tal ambiente permite estimulação de teste de fármacos mais previsível.²⁵⁰ O uso de microchip é visto como um método ideal para avaliar o transporte de fármacos *in vitro* e otimizar os projetos das nanopartículas, selecionando sistemas adequados com maiores taxas de sucesso na entrega do composto.²⁵¹ Dessa forma, testar a eficácia e a resposta a novas terapias usando as plataformas microfluídicas pode fornecer um microambiente mais próximo ao modelo *in vivo* e resultados clínicos relevantes.

 Fluxo

 Cultura estática
 Cultura dinâmica

 • Mudança de morfologia
 • Proliferação

 • Alteração genética e protéica

Figura 48. As principais diferenças entre as culturas estática e dinâmica (sob fluxo)

Fonte: Autoria própria

1.2. Microfabricação e Materiais de microchip

A principal estratégia para fabricar microdispositivo de escalas entre micro $(10^{-3} - 10^{-6} \text{ m})$ ou nano $(10^{-6} - 10^{-9} \text{ m})$ se baseia nas técnicas de microfabricação que incluem nanotecnologia, produção de biomateriais, impressão 3D, fotolitografia e litografia suave. ²⁵²⁻²⁵⁵

A litografia suave tem sido usada principalmente como uma técnica de microfabricação primária para gerar microchips PDMS com microcanais para simular o efeito de tensão de cisalhamento. ^{256, 257} Esta técnica emprega polímero líquido para moldar em um molde padronizado. Após a reticulação do polímero, o substrato apresenta características de micro a nanoescala. ²⁵⁸ No entanto, as etapas de replicação e transferência requerem alinhamento preciso das peças para produzir moldes complexos com boa qualidade durante o processo de fabricação. ²⁵⁹ Além disso, cada novo projeto de um dispositivo PDMS exige a fabricação de novos moldes físicos, tornando esses microdispositivos caros e trabalhosos. ²⁵⁷ É bastante desafiador usar litografia suave para fabricar microchips com uma grande variedade de designs.

As abordagens alternativas de microfabricação com excelente flexibilidade, escalabilidade e versatilidade ainda são de grande interesse para o campo da microfluídica. Estudos anteriores desenvolveram dispositivos microfluídicos baseados nas ferramentas convencionais de laboratório, incluindo impressão, corte e laminação (*Print, Cut, Laminate*,

PCL), cortadora a laser, materiais como fita adesiva, vidro e plástico que simplificou imensamente o processo de fabricação. Essas ferramentas de bancada são capazes de produzir microcanais com resolução suficiente para o uso imediato nos estudos de química analítica e de biologia. ²⁶⁰⁻²⁶²

2. Objetivos

O objetivo do presente estudo foi desenvolver um método rápido e preciso para avaliação da eficiência fotodinâmica de Hy nas células endoteliais humanas sob diferentes tensões de cisalhamento. Para isso, um órgão-em-chip denominado microchip foi construído usando os materiais como filme de poliéster, adesivo biocompatível e placa de poliestireno, após a conexão a uma bomba de seringa, a qual gerou um fluxo de meio de cultura que exerceu a tensão de cisalhamento nas células. O conjunto de corantes fluorescentes laranja de acridina e brometo de etídio foi utilizado para determinar a viabilidade celular. A liberação de VEGF foi quantificada pelo kit de ELISA VEGF-A humano. O tipo de morte celular foi avaliado pela citometria de fluxo através das atividades de caspases 3 e 7.

3. Materiais e métodos

3.1. Fabricação de microchip de adesivo biocompatível

Os microchips de adesivo biocompatível consistem principalmente em três camadas: superior, intermediária e inferior. A camada superior foi de filme de poliéster (20×50 mm, Data Jet) que permite a visualização do crescimento celular dentro do microcanal em microscopia óptica. A camada inferior foi a lâmina de poliestireno (75×25 mm, obtida do corte de frasco de cultura de células de 75 cm², Corning) que serve como substrato para o crescimento das células HUVEC. A camada do meio serviu para selar as camadas superior e inferior e delimitar o microcanal. Dessa forma, um microcanal desenvolvido no software CorelDRAW®15 (Corel Corp.) com dimensões 2×25 mm e dois círculos com 3 mm de diâmetro para entrada e saída foi a microestrutura central. Este layout foi cortado no adesivo biocompatível de dupla face (ARcare® - 90106, Adhesives Research) usando um cortador a laser de CO₂ (Combat Laser 600). ²⁶² Finalmente, luers fêmeas foram coladas com resina epóxi na camada superior para acessar a entrada e saída do microcanal (Figura 48). A dimensão final do microcanal do microchip de adesivo biocompatível tem comprimento e largura, 20 e 2 mm, respectivamente. A altura é de 0,14 mm, correspondendo à espessura do adesivo biocompatível.

Figura 49. Esquemas dos componentes do microchip, a) lâmina de poliestireno, b) fita adesiva biocompatível de dupla face cortada no cortador a laser, c) filme de poliéster d) conectores, e) dimensões laterais e transversais do microcanal, f) Dispositivo de microchip final.



Fonte: Autoria própria

3.2. Cálculo de tensão de cisalhamento

A tensão de cisalhamento (τ) no microcanal do microchip durante a perfusão de meio de cultura RPMI foi calculada de acordo com a Equação 2: ²⁶¹

$$\tau = \frac{2\mu Q}{wh^2} \left(\frac{m+1}{m}\right) (n+1)$$
 (Equação 3)

onde μ é a viscosidade do meio de cultura, Q é a taxa de fluxo de volume, h é a altura do microcanal, w é a largura do microcanal, m e n são constantes empíricas, com $m = 1,7 + 0,5(h/w)^{-1,4}$ e n = 2, para razões h/w < 1/3.

3.3. Cultura celular

As células endoteliais da veia umbilical humana (HUVEC) (CRL-2873 [™]; ATCC®, EUA) foram cultivadas em frascos de cultura celular de poliestireno (Corning, Estados Unidos) com RPMI-1640 contendo HEPES 25 mM (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) suplementado com 10% soro fetal bovino (Cultilab, Brasil) e 1% de antibióticos/antifúngicos (Sigma-Aldrich, Estados Unidos). As células foram mantidas em uma incubadora a 37 °C com 5% de CO₂ e removidas do frasco com uma solução de tripsina-EDTA (Sigma-Aldrich, Estados Unidos).

3.4. Cultura celular no microchip

Todos os microchips foram esterilizados pela perfusão de etanol 70% (Labsynth, Brasil) a 5 μ L mL⁻¹ usando uma bomba de seringa (Harvard Apparatus, Estados Unidos) e expostos a luz UV por 40 min. Depois disso, o microcanal foi lavado três vezes com PBS estéril para remover o etanol e, em seguida, três vezes com o meio de cultura RPMI. As suspensões de HUVEC a 5 × 10⁶ células mL⁻¹ foram injetadas no microcanal estéril. Em seguida, o microchip foi mantido na incubadora de 37 °C com 5% CO₂ por 4 h para promover a adesão celular. Após este período, o microcanal foi submetido a uma taxa de fluxo unidirecional contínua de 2 μ L min⁻¹ do meio de cultura RPMI por uma bomba de seringa. Todo o sistema, incluindo o microchip e a bomba de seringa (Figura 49), foi mantido na estufa de 37 °C durante o experimento. A proliferação celular dentro do microcanal foi monitorada usando um microscópio ótico invertido (CKX41, Olympus, Japão) equipado com uma câmera CCD (Q-Color 5 TM, Olympus, Japão).

Figura 50. Esquema do sistema de microchip. Após a adesão celular no microcanal por 4 h sob condição estática na incubadora de CO_2 a 37 °C, o microchip foi conectado a uma bomba de seringa para perfundir o meio de cultura RPMI a uma taxa de fluxo unidirecional contínuo de 1 a 5 μ L min⁻¹. Dois escalpes (BD AseptoTM, Becton) foram conectados à bomba da seringa, microchip e tubo coletor pelo acesso oposto, no qual o sobrenadante foi coletado num tubo cônico selado com um filme plástico (Parafilm[®] M, Bemis Company). O sistema foi mantido na incubadora a 37 °C durante o experimento.



Fonte: Autoria própria

3.5. Incubação estática e dinâmica de Hy

As células HUVEC foram incubadas com solução estoque de Hy diluída no RPMI (com DMSO < 1%) por 2 h, em seguida, o resíduo de Hy foi removido lavando as células com PBS três vezes, por último o meio de cultura fresco foi substituído. O tratamento PDT foi processado expondo as células à irradiação de um conjunto de lâmpadas de diodo emissor de luz (LEDs) que emite luz amarela (λ = 590 ± 10 nm, 8,4 mW cm⁻²) por 20 min. As amostras não irradiadas foram consideradas como controle. Após a cultura das células HUVEC (confluência celular 80 - 90%) no microchip, este foi conectado a uma bomba de seringa para perfundir o meio de cultura RPMI com Hy na concentração de IC₅₀ por 2 h sob fluxo unidirecional contínuo: 0, 1, 2, 3, 4 e 5 μ L min⁻¹ a 37 °C. A tensão de cisalhamento (τ) foi estimada de acordo com a equação 3. ²⁶³ A viabilidade foi determinada após 4 h da PDT. Durante os experimentos foram feitos o controle: contendo apenas células; controle escuro: células incubadas com Hy e sem irradiação. Figura 50 ilustra o ensaio da PDT realizado no microchip.

Figura 51. O ensaio da Hy-PDT no microchip. Após a incubação de Hy sob fluxo, as células HUVEC foram irradiadas por um conjunto de LEDs amarelos ($\lambda = 590 \pm 10$ nm, 8,4 mW cm⁻²) por 20 min.



3.6. Quantificação da liberação de VEGF-A

A quantificação de VEGF do sobrenadante foi determinada e definida como a liberação usando um kit de ensaio VEGF-A ELISA humano (RAB 0507-1KT, Sigma Aldrich, Estados Unidos). A absorbância em um comprimento de onda de 450 nm foi medida utilizando um leitor de microplaca.

3.7. Viabilidade celular

A concentração inibitória média (IC₅₀) da Hy-PDT e a citotoxicidade dos materiais como filme de poliéster e adesivo biocompatível para as células HUVEC foram determinadas pelo método colorimétrico do MTT. Após o tratamento da Hy-PDT ou a incubação com o extrato de material, o meio de cultura foi substituído por 50 μ L de 1 mg mL⁻¹ de brometo de 3-(4,5dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio (MTT, Sigma Aldrich) solubilizado em meio de cultura. Depois de 3 h de incubação, a solução de MTT foi removida, adicionou-se 50 μ L de etanol para solubilizar os cristais de formazan e 150 μ L de uma mistura de PBS 50% (v/v) e álcool isopropílico 50% (v/v). A seguir, determinou-se a absorbância em 570 nm no leitor de placa (Multiskan GO, Thermo Fisher Scientific). O valor da IC₅₀ que representa a concentração necessária de fotossensibilizador para inibir a metade da população celular, foi obtido através da curva dose-resposta processada pelo programa GraphPad Prism, a partir de três experimentos independentes.

A viabilidade celular no microchip foi determinada usando 30 μ L da mistura de corantes fluorescentes: laranja de acridina (LA, Sigma Aldrich) e brometo de etídio (BE, Sigma Aldrich) na proporção de 1:1 a 100 mg mL⁻¹ em PBS. Após 1 min, as células foram lavadas três vezes com PBS para remover o excesso de corantes. O microchip foi levado imediatamente ao microscópio de fluorescência (Olympus BX 4) em filtro de excitação 460/90 nm. As imagens foram obtidas pela câmera Olympus DP72. O número de células mortas e vivas foi quantificado pela contagem do número de pontos verdes (células vivas), pontos laranja-vermelhos (células mortas).

3.8. Ensaio de citometria de fluxo para avaliar as caspases - 3 e 7 in vitro

A atividade da caspases 3 e 7 foi avaliada usando o kit de ensaio de citometria de fluxo verde CellEvent[®] Caspase - 3/7 (Thermo Fisher Scientific) de acordo com as instruções do fabricante e quantificada por um citômetro de fluxo (FACS Verse, BD Biosciences). Os tubos de citometria de fluxo contendo 1 ml de suspensão de células HUVEC (1×10^6 células mL⁻¹): os controles e células tratadas com Hy-PDT, foram preparados. As amostras foram incubadas com o reagente de detecção específico para caspases 3 e 7 por 30 min a 37 °C. Todas as experiências foram feitas em triplicata. Para o reagente verde Caspase-3/7, as amostras coradas foram excitadas a 488 nm e coletadas por um filtro passa-banda (BP) 530–560 nm. Para a coloração SYTOX AADvanced, as amostras foram negativas para as duas colorações, as células apoptóticas foram positivas para a coloração verde de Caspase-3/7 e negativas para a coloração
SYTOX AADvanced, enquanto as células necróticas foram positivas para ambas as colorações Caspase-3/7 e SYTOX AADvanced.

3.9. Análise estatística

Os resultados quantitativos foram apresentados em médias \pm DP (desvio padrão) de pelo menos três valores obtidos pelos três experimentos independentes. A significância estatística entre os grupos experimentais foi analisada pelo teste de análise de variância (ANOVA) e pósteste de Tukey.

4. Resultados e discussões

4.1. Proliferação das células HUVEC no microchip

A citotoxicidade dos materiais como filme de poliéster e adesivo biocompatível (ARcare® - 90106, Adhesives Research) foi avaliada pelo ensaio de MTT e não mostraram efeitos citotóxicos. O microchip desenvolvido neste estudo utilizou materiais transparentes como filme de poliéster (superior), adesivo biocompatível (meio) e poliestireno (inferior), o que facilitou a visualização das etapas de proliferação celular em microscópio óptico.

O microchip feito com adesivo biocompatível (ARcare[®] - 90106) cortado no cortador a laser é uma alternativa barata e rápida. Na literatura, Patko et al. mostraram que as bactérias de *Salmonella typhimurium*, poderiam aderir com sucesso a um sensor óptico transparente feito com adesivo biocompatível sob condição de fluxo. ²⁶² O adesivo biocompatível cortado no cortador a laser possui um formato de microcanal precisamente definido em materiais sólidos como poliestireno, resultando em um microchip robusto, que é bem vedado, sem vazamento de líquidos e resistente à lavagem com solução aquosa.

A cortadora a laser de CO₂ tem mostrado a flexibilidade que permite a fabricação rápida de microchip, devido à sua capacidade de modificar ou descartar superfícies indesejadas usando parâmetros de laser apropriados e designs de recursos. Além disso, vários tipos de polímeros podem ser derretidos e vaporizados em altas temperaturas focalizando um feixe de laser em um substrato. ²⁶⁴ Embora alguns fatores possam afetar a qualidade do corte, como as condições do polímero e da máquina, incluindo acabamento da superfície e sobre a zona de canto afetada pelo calor, o poliéster é um dos polímeros com maior estabilidade durante o corte a laser; isso permite que a resolução de corte seja mais precisa e adequada para criar um canal com aspecto

uniforme. ^{265, 266} Além disso, as propriedades físico-químicas dos filmes de vinil e poliéster também protegem o microchip contra vazamento e evaporação de líquidos, evitando contaminações externas.

Para verificar as dimensões dos microcanais, a água destilada foi introduzida para determinar o volume e, em seguida, calculou-se a altura por largura e comprimento. Como resultado, o volume obtido do canal foi de ~ 8,4 μ L, sendo que a altura (h) = 140 μ m e w = 2000 μ m. De acordo com a equação 2, Tabela 6 lista os valores de tensão de cisalhamento no microcanal gerados pelo fluxo laminar do meio de cultura RPMI (viscosidade (μ) = 0,008 Pa s).

Tabela 5. Os valores de tensão de cisalhamento no microcanal gerados pelo fluxo laminar do meio de cultura RPMI foram calculados de acorda com a equação 2, considerando a viscosidade (μ) = 0,008 Pa s, altura (h) = 140 μ m e w = 2000 μ m.

Fluxo laminar (µL min ⁻¹)	Tensão de cisalhamento (dina cm ⁻²)
0 (estático)	0
1	1,4
2	2,8
3	4,2
4	5,6
5	7

Fonte: Autoria própria

Figura 51-A mostra as imagens da cultura das HUVECs, no início quando as células foram introduzidas no canal do microchip. Após 4 h da cultura estática, as células começaram a aderir à superfície de poliestireno e adquirir uma morfologia alongada (Figura 51-B). A partir disso, o microchip foi conectado a uma bomba de seringa, e aplicou um fluxo constante de meio de cultura no canal do microchip por um tempo prolongado garantindo o suprimento de nutrientes durante a proliferação celular. Na Figura 51-C, todas as células exibiram boa aderência e crescimento nesta superfície. Como resultado, o microchip apresentou condições positivas para a realização da cultura celular, uma vez que todos os materiais selecionados oferecem um microambiente adequado para o crescimento celular. Especialmente, o adesivo biocompatível da camada intermediária forneceu uma excelente vedação das camadas superior e inferior, evitando o vazamento do meio de cultura e a contaminação tanto na condição de cultura de estática (não conectado à bomba de seringa) quanto na dinâmica (conectado à bomba

de seringa).

A viabilidade celular no microchip foi determinada pelo ensaio colorimétrico LA/BE. Figura 51-D mostra que a maioria das células permaneceu viáveis sob a condição dinâmica com fluxo laminar máximo aplicado neste estudo (7 dina cm⁻²).

Figura 52. As imagens de proliferação das células HUVEC no microcanal nos diferentes intervalos de tempo após a injeção de células. A) 0 h, B) 4 h, C) 24 h de cultura sob um fluxo laminar de 5 μ L min⁻¹ que equivale uma força de cisalhamento de 7 dina cm⁻², e D) Células HUVEC cultivadas após 24 h em microchip foram coradas com a mistura de LA/BE e visualizadas no microscópio de fluorescência, a cor verde corresponde às células vivas. Escala: 200 μ m.



Fonte: Autoria própria

As tecnologias microfluídicas fornecem uma condição para melhorar os ensaios tradicionais in vitro criando uma plataforma controlável para modelar o ambiente dinâmico in vivo. ²⁶⁷ Os ensaios baseados em microfluídica têm sido amplamente aplicados em uma variedade de estudos relacionados ao câncer, sinalização intracelular e resistência tumoral a fármacos. ²⁶⁸ Em comparação com os sistemas estáticos, os ensaios baseados em microfluídicos possuem várias vantagens exclusivas como as propriedades bioquímicas exibidas pelos tecidos vasculares e o fornecimento contínuo e simultâneo de nutrição e a remoção de resíduos. O microchip com microcanal de dimensão reduzida leva a um melhor modelo de microambiente

tecidual e a redução significativa no consumo de meio de cultura e reagentes. Dessa forma, os dispositivos microfluídicos podem ser convenientemente usados para estudar o transporte de fluido e fármacos.

4.2. Tensão de cisalhamento e liberação de VEGF

Os microchips foram empregados como um modelo in vitro para simular a tensão de cisalhamento laminar utilizando o fluxo unidirecional do meio de cultura sobre uma monocamada das células HUVEC. Os valores pré-calculados da tensão de cisalhamento na faixa de 1,4 a 7 dina cm⁻² foram aplicados à monocamada celular por 24 h. As células revelaram uma morfologia alongada sob condição dinâmica. O sobrenadante foi coletado para quantificar a expressão de VEGF pelo método ELISA. A secreção de VEGF pelas células cultivadas nos sistemas dinâmicos foi significativamente alta em comparação com a cultura estática (0 dina cm⁻²) (Figura 52). Este resultado mostra a influência evidente da força de cisalhamento nas células HUVEC, considerando que a mudança de sinalização celular como expressão VEGF é prevalente na cultura celular dinâmica e desempenha um papel indispensável nos ensaios préclínicos.

Figura 53. A quantidade de VEGF liberada pelas células HUVEC durante a perfusão de meio de cultura aplicando a tensão de cisalhamento na faixa de 1,4 a 7 dina cm⁻² por 24 h. A concentração (pg mL⁻¹) determinada pelo ensaio de ELISA foi multiplicada pelo volume de meio de cultura coletada após 24 h. Diferença estatística significativa comparada com a tensão de cisalhamento de 0 dina cm⁻²: Diferença estatística significativa: * p < 0.05, ** p < 0.050,01, *** p < 0,001, **** p < 0,0001



Tensão de cisalhamento (dina cm⁻²)

Estudos investigaram a relação da expressão de VEGF liberada e as células endoteliais para compreender completamente o papel do estresse de cisalhamento gerado pelo fluxo laminar nos mecanismos de sinalização intracelular. ²⁴⁶ A regulação dinâmica de VEGF pelas células endoteliais foi demonstrada pela primeira vez por Gan et al., a tensão de cisalhamento elevada aumentou a expressão de VEGF após exposição por 3 h. ²⁶⁹ Um estudo posterior de Conklin et al. mostrou que 24 h de baixo estresse de cisalhamento (1,5 dina cm⁻²), aumentaram significativamente a expressão do gene VEGF e da proteína em células endoteliais. ²⁷⁰

O VEGF foi inicialmente considerado um mitógeno específico do endotélio, secretado por uma variedade de tipos de células, incluindo células epiteliais, endoteliais e vasculares, além disso, pode ser modulado por vários estímulos como os fatores de crescimento, citocinas, hormônios e hipóxia. ²⁷¹ Estudos *in vitro* demonstram que os estímulos biomecânicos, como tensão de cisalhamento gerada por fluido, causam aumento da expressão de VEGF pelas células vasculares, bem como outros tipos de células endoteliais. Portanto, ao invés da cultura celular tradicional e estática, a cultura celular dinâmica com uma perfusão constante de fluido é capaz de remodelar a organização celular, alterar a expressão gênica e proteica e influenciar a proliferação celular. ²⁷²

4.3. Diferença na eficácia da PDT entre a incubação estática e dinâmica de Hy

A influência da Hy-PDT na viabilidade celular foi primeiramente investigada em cultura estática, na qual as células HUVEC foram incubadas com diversas concentrações de Hy e expostas à luz amarela ($\lambda = 590$ nm) com a dose de luz de 10 J cm⁻² por 20 min, a IC₅₀ obtida foi de 116 nmol L⁻¹. Sob condição escura, as células incubadas com essa faixa de concentração de Hy permaneceram viáveis com viabilidade > 95% (Figura 53). Hy apresenta absorção máxima em 590 nm, a irradiação neste comprimento de onda promove forte fotoativação de Hy para reagir com oxigênio produzindo as ROS que são capazes de inibir a proliferação celular. Por conseguinte, estudos sugerem que a aplicação da PDT pode auxiliar na destruição de distúrbios vasculares contribuindo para os tratamentos das doenças relacionadas às anomalias vasculares como malformação capilar da mancha vinho-do-porto, degeneração macular e vasculatura tumoral. ²³²⁻²³⁴

Figura 54. Ensaio de citotoxicidade da Hy-PDT nas células HUVEC. As células foram incubadas com as concentrações de Hy (5 a 400 nmol L⁻¹) por 2 h e depois irradiadas por um conjunto de LEDs amarelos ($\lambda = 590 \pm 10$ nm, 8.4 mW cm⁻², 10 J cm⁻²), e um período de pós-irradiação de 4 h.



Fonte: Autoria própria

Figura 54 mostra as imagens de microscopia de fluorescência das células HUVEC coradas pela mistura de AO/EB após a Hy-PDT. Nas quais, as células foram incubadas dinamicamente (sob uma tensão de cisalhamento) com diferentes fluxos laminares constantes de Hy na concentração de 116 nmo L^{-1} em meio RPMI dentro do microcanal por 2 h e seguida por uma irradiação de luz amarela (10 J cm⁻²).

Figura 55. As células foram cultivadas no microchip e incubada com Hy (116 nmol L⁻¹) sob tensão de cisalhamento de 1,4 a 7 dina cm⁻² por 2 h, seguido por uma irradiação de LEDs amarelos (10 J cm⁻²) e um período de pós-irradiação de 4 h. Microscopia de fluorescência das células HUVEC coradas com a mistura de LA/BE após a Hy-PDT. Barra de escala = 200 μ m. Cor laranja-vermelha indica célula morta e cor verde indica célula viva. O controle foi feito com a incubação de Hy no escuro.



Fonte: Autoria própria

Na Figura 55, observou-se que numa taxa de tensão de cisalhamento baixa (1,4 dina cm⁻²), a viabilidade celular foi próxima da incubação estática de Hy, entretanto conforme que essa taxa foi incrementada, o número das células mortas tornou significativamente mais alto (p >0,05). Em todos os experimentos foram feitos os microchips de controle negativo, ou seja, mantidos no escuro, utilizando as mesmas condições como a cultura dinâmica das células HUVEC e a incubação de Hy na mesma tensão de cisalhamento. **Figura 56.** As células foram cultivadas no microchip e incubada com Hy (116 nmol L⁻¹) sob tensão de cisalhamento de 1,4 a 7 dina cm⁻² por 2 h, seguido por uma irradiação de LEDs amarelos ($\lambda = 590$ nm, 10 J cm⁻²) e um período de pós-irradiação de 4 h. Quantificação de células vivas e mortas pelas imagens microscópicas de fluorescência. O controle foi feito com a incubação de Hy no escuro. Diferença estatística significativa: * *p* < 0,05.



Fonte: Autoria própria

A incubação de Hy sob a tensão de cisalhamento pode induzir um acúmulo maior de Hy nas células HUVEC, por conseguinte, essa grande quantidade de fotossensibilizador é ativada pela irradiação e a morte celular aumenta. Um estudo similar que investigou a toxicidade do fármaco vandetanib, utilizado para o tratamento do câncer de tireoide, nas células HUVEC sob a tensão de cisalhamento, concluiu que houve a dependência acentuada da toxicidade desse medicamento com o incremento da tensão de cisalhamento. ²⁷³ Estudos também mostraram que a incubação dinâmica promove a maior internalização das nanopartículas como de ouro, sílica e TiO₂ nas células HUVEC, e pode reduzir drasticamente a viabilidade celular em comparação com a incubação estática. ²⁷⁴⁻²⁷⁶ Em condição fisiológica humana, os parâmetros hemodinâmicos, como velocidade, distúrbios de fluxo e tensão de cisalhamento exercem uma força tangencial que potencialmente foram identificados como fatores que influenciam a distribuição de fármacos e nanopartículas na superfície das células endoteliais. ²⁷⁷ Por tanto, o sistema microfluídico permite viabilizar o monitoramento dinâmico das células na futura triagem de fármacos levando em consideração um microambiente específico.

4.4. Apoptose induzida pela Hy-PDT nas células HUVEC

O tipo de morte celular foi investigado utilizando a citometria de fluxo para monitorar atividade das caspases 3 e 7. Figura 56 mostra que a aplicação da Hy-PDT nas células HUVEC

sob a tensão de cisalhamento realmente teve maior inibição de viabilidade celular e foi capaz de induzir a morte celular majoritariamente via apoptose, visto que Hy fotoativada possui um rendimento quântico alto para gerar o oxigênio singleto, este tem como alvo principal a mitocôndria e induz a sua liberação do citocromo c que leva à ativação de proteínas da família das caspases como (caspases 3 e 7) que são os precursores da morte celular via apoptose. As caspases desencadeiam a apoptose por meio da clivagem proteolítica de milhares outras proteínas inibindo a proliferação celular. ^{278, 279}

Figura 57. Citometria de fluxo do ensaio de caspases 3 e 7 das células HUVEC após a Hy-PDT. As células foram cultivadas no microchip e incubadas com Hy (116 nmol L⁻¹) sob tensão de cisalhamento de 1,4 a 7 dina cm⁻² por 2 h, seguido por uma irradiação de LEDs amarelos ($\lambda = 590$ nm, 10 J cm⁻²) e um período de pós-irradiação de 4 h. A) Controle (incubação de Hy no escuro) B) 0 C)1,4 D) 2,8 E) 4,2 F) 5,6 G) 7 dina cm⁻².



Fonte: Autoria própria

Nas mesmas condições da PDT e quantidades iguais de Hy aplicada, o resultado da citometria de fluxo continuou mostrando a maior morte celular para os microchips com alta tensão de cisalhamento (Figura 57). Embora a morte celular via apoptose seja predominante, a porcentagem de necrose se acentuou conforme o aumento da tensão de cisalhamento. Isso é devido a maior acumulação intracelular de Hy sob a incubação dinâmica, visto que a transição de apoptose e necrose é Hy dose-dependente. Em doses baixas, os danos celulares provocados pela ROS podem ser neutralizados e reparados por mecanismos antioxidantes celulares, em doses moderadas, as ROS induzidas pela PDT levam à apoptose, entretanto em concentrações ainda mais altas, as ROS resultam em necrose. ²⁸⁰

A transição da eficácia da Hy-PDT em cultura estática para sob fluxo contínuo também pode estar associada a outros fatores críticos que determinaram a morte celular necrótica devido à indução de uma resposta inflamatória. Evidências acumuladas indicam que tanto o estresse oxidativo quanto a tensão mecânica nas células HUVEC estimulam sinais endógenos que desencadeiam respostas inflamatórias para provocar imunidade antitumoral protetora. ²⁸¹ Além disso, o direcionamento de células endoteliais na PDT tem sido bem explorado como marcadores de interrupção da angiogênese e pode influenciar na sobrevivência do tumor. ²⁸²

Figura 58. Porcentagens de apoptose e necrose das células HUVEC após a Hy-PDT. As células foram cultivadas no microchip e incubadas com Hy (116 nmol L⁻¹) sob diferentes tensões de cisalhamento (1,4 a 7 dina cm⁻²) por 2 h, seguido por uma irradiação de LEDs amarelos ($\lambda = 590$ nm, 10 J cm⁻²) e um período de pós-irradiação de 24 h. A comparação da morte celular necrótica entre diferentes tensões de cisalhamento (dina cm⁻²) é apresentada com a diferença estatística significativa: ns = não há diferença significativa, * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001.



Fonte: Autoria própria

5. Conclusão

A magnitude da tensão de cisalhamento e o perfil do fluxo de fluido demonstraram a sua influência na proliferação e no aumento da expressão de VEGF das células HUVEC. Nos ensaios de microchips, a eficiência da Hy-PDT exibiu a dependência marcante da incubação dinâmica de Hy na acentuação da sua fototoxicidade e no aumento da morte celular via necrose. Em comparação com a cultura celular convencional e estática, os microchips podem proporcionar a melhor otimização da administração de dose mais segura de Hy considerando o estresse de cisalhamento fisiológico humano minimizando a fotossensibilização excessiva dos pacientes. Além disso, o microchip desenvolvido pode ser aplicado como um método alternativo padrão e direto a outros dispositivos órgão-em-chip com canais microfluídicos que permite uma correlação dos estudos *in vitro* com a tensão de cisalhamento precisamente controlada.

6. Publicação relacionada

Parte dos resultados apresentados neste capitulo foi publicada em Ma, Hui Ling; Urbaczek, Ana Carolina; Zeferino Ribeiro De Souza, Fayene; Augusto Gomes Garrido Carneiro Leão, Paulo; Rodrigues Perussi, Janice; Carrilho, Emanuel. Rapid Fabrication of Microfluidic Devices for Biological Mimicking: A Survey of Materials and Biocompatibility. **Micromachines**, v. 12, p. 346, 2021.

Referências

1 SINGH, D.; BEDI, N.; TIWARY, A. K. Enhancing solubility of poorly aqueous soluble drugs: critical appraisal of techniques. **Journal of Pharmaceutical Investigation**. Bangelorev, v. 48, p. 509-526, 2018.

2 SEHNERT, S. S. Drug bioavailability: estimation of solubility; permeability; absorption and bioavailability. **Journal of the National Medical Association**, Washington, v. 96, p. 1243, 2004.

3 LIPINSKI, C. Poor aqueous solubility—an industry wide problem in drug discovery. **American Pharmaceutical Review**, Fishers, v. 5, p. 82-85, 2002.

4 LIPINSKI, C. A.; LOMBARDO, F.; DOMINY, B. W.; FEENEY, P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. Advanced Drug Delivery Reviews, Amsterdam, v. 23, p. 3-25, 1997.

5 MERISKO-LIVERSIDGE, E. M.; LIVERSIDGE, G. G. Drug nanoparticles: formulating poorly water-soluble compounds. **Toxicologic Pathology**, California, v. 36, p. 43-48, 2008.

6 BROUGH; C.; WILLIAMS III, R. Amorphous solid dispersions and nano-crystal technologies for poorly water-soluble drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 453, p. 157-166, 2013.

7 MURA, S.; NICOLAS, J.; COUVREUR, P. Stimuli-responsive nanocarriers for drug delivery. **Nature Materials**, Berlin, v. 12, p. 991-1003, 2013.

8 CHEN, H.; KHEMTONG, C.; YANG, X.; CHANG, X.; GAO; J. Nanonization strategies for poorly water-soluble drugs. **Drug Discovery Today**, Oxford, v. 16, p. 354-360, 2011.

9 SAVJANI, K. T.; GAJJAR, A. K.; SAVJANI, J. K. Drug solubility: importance and enhancement techniques. International Scholarly Research Notices, London, v. 2012, 2012.

10 QIDWAI, A.; NABI, B.; KOTTA, S.; NARANG, J. K; BABOOTA, S.; ALI, J. Role of nanocarriers in photodynamic therapy. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, Amsterdam, v. 30, p. 101782, 2020.

11 CHIDAMBARAM, M.; MANAVALAN, R.; KATHIRESAN, K. Nanotherapeutics to overcome conventional cancer chemotherapy limitations. Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences, Edmonton, v. 14, p. 67-77, 2011.

12 AGOSTINIS, P.; VANTIEGHEM, A.; MERLEVEDE, W.; DE WITTE, P. A. Hypericin in cancer treatment: more light on the way. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, Oxford, v. 34, p. 221-241, 2002.

13 TEGOS, G.; DAI, T.; FUCHS, B. B.; COLEMAN, J. J.; PRATES, R. A.; ASTRAKAS, C.; ST DENIS, T. G.; RIBEIRO, M. S.; MYLONAKIS, E.; HAMBLIN, M. R. Concepts and principles of photodynamic therapy as an alternative antifungal discovery platform. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 3, p. 120, 2012.

14 XU, L.; ZHANG, X.; CHENG,W.; WANG, Y.; YI, K.; WANG, Z.; ZHANG, Y.; SHAO, L.; ZHAO, T. Hypericin-photodynamic therapy inhibits the growth of adult T-cell leukemia cells through induction of apoptosis and suppression of viral transcription. **Retrovirology**, London, v. 16, p. 5, 2019.

15 YOW, C. M.; TANG, H. M.; CHU, E. S.; HUANG, Z. Hypericin-mediated photodynamic antimicrobial effect on clinically isolated pathogens. **Photochemistry and Photobiology**, Hoboken, v. 88, p. 626-632, 2012.

16 HOPPER, C. Photodynamic therapy: a clinical reality in the treatment of cancer. **The Lancet Oncology**, London, v.1, p. 212-219, 2000.

17 ABRAHAMSE, H.; HAMBLIN, M. R. New photosensitizers for photodynamic therapy. **Biochemical Journal**, London, v. 473, p. 347-364, 2016.

18 BERNAL, C.; RIBEIRO, A. O.; ANDRADE, G. P.; PERUSSI, J. R. Photodynamic efficiency of hypericin compared with chlorin and hematoporphyrin derivatives in HEp-2 and vero epithelial cell lines. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, Amsterdam, v. 12, p. 176-185, 2015.

19 HU, X.; HUANG, Y.-Y.; WANG, Y.; WANG, X.; HAMBLIN, M.R. Antimicrobial Photodynamic Therapy to Control Clinically Relevant Biofilm Infections, **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 9, 2018.

20 CHEN, B.; XU, Y.; ROSKAMS, T.; DELAEY, E.; AGOSTINIS, P.; VANDENHEEDE, J. R.; DE WITTE, P. Efficacy of antitumoral photodynamic therapy with hypericin: relationship between biodistribution and photodynamic effects in the RIF-1 mouse tumor model. **International Journal of Cancer**, Hoboken, v. 93, p. 275-282, 2001.

21 DĄBROWSKI, J. M.; ARNAUT, L. G. Photodynamic therapy (PDT) of cancer: from local to systemic treatment. **Photochemical & Photobiological Sciences**, Amsterdam, v. 14, p. 1765-1780, 2015.

22 YAVARI, N.; ANDERSSON-ENGELS, S.; SEGERSTEN, U.; MALMSTROM, P. U.An overview on preclinical and clinical experiences with photodynamic therapy for bladder cancer. **Canadian Journal of Urology**, Quebec, v. 18, p. 5778-5786, 2011.

23 ZEISSER-LABOUEBE, M.; LANGE, N.; GURNY, R.; DELIE, F. Hypericin-loaded nanoparticles for the photodynamic treatment of ovarian cancer. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 326, p. 174-181, 2006.

24 LIU, C.D.; KWAN, D.; SAXTON, R.E.; MCFADDEN, D. W. Hypericin and photodynamic therapy decreases human pancreatic cancer in vitro and in vivo. **Journal of Surgical Research**, San Diego, v. 93, p. 137-143, 2000.

24 WANG, X.; GUO, Y.; YANG, S.; WANG, C.; FU, X.; WANG, J.; MAO, Y.; ZHANG, J.; LI, Y.; Cellular and molecular mechanisms of photodynamic hypericin therapy for nasopharyngeal carcinoma cells. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, Baltimore, v. 334, p. 847-853, 2010.

25 DAVIDS, L.M.; KLEEMANN, B.; KACEROVSKA, D.; PIZINGER, K.; KIDSON, S. H. Hypericin phototoxicity induces different modes of cell death in melanoma and human skin cells. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: biology**, Amsterdam, v. 91, p. 67-76, 2008.

27 OSTAŃSKA, E.; AEBISHER, D.; BARTUSIK-AEBISHER, D. The potential of photodynamic therapy in current breast cancer treatment methodologies. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, Paris, v. 137, p. 111302, 2021.

28 KHDAIR, A.; CHEN, D.; PATIL, Y.; MA, L.; DOU, Q.P.; SHEKHAR, M. P.; PANYAM; J. Nanoparticle-mediated combination chemotherapy and photodynamic therapy overcomes tumor drug resistance. **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v. 141, p. 137-144, 2010.

29 HE, J.; YANG, L.; YI, W.; FAN, W.; WEN, Y.; MIAO, X.; XIONG, L. Combination of fluorescence-guided surgery with photodynamic therapy for the treatment of cancer. **Molecular Imaging**, California, v. 16, p. 1-15, 2017.

30 NAKANO, A.; WATANABE, D.; AKITA, Y.; KAWAMURA, T.; TAMADA, Y.; MATSUMOTO, Y. Treatment efficiency of combining photodynamic therapy and ionizing radiation for Bowen's disease. Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology, Hoboken, v. 25, p. 475-478, 2011.

31 BIENIA, A.; WIECHEĆ-CUDAK, O.; MURZYN, A. A.; KRZYKAWSKA-SERDA, M. Photodynamic therapy and hyperthermia in combination treatment—neglected forces in the fight against cancer. **Pharmaceutics**, Basel, v. 13, p. 1147, 2021.

32 KLEINOVINK, J. W.; VAN DRIEL, P. B.; SNOEKS, T. J.; PROKOPI, N.; FRANSEN, M. F.; CRUZ, L J.; MEZZANOTTE, L.; CHAN, A.; LÖWIK, C. W.; OSSENDORP, F. Combination of photodynamic therapy and specific immunotherapy efficiently eradicates established tumors. **Clinical Cancer Research**, Philadelphia, v. 22, p. 1459-1468, 2016.

33 LIU, X.; JIANG, C.; LI, Y.; LIU, W.; YAO, N.; GAO, M.; JI, Y.; HUANG, D.; YIN;, Z.; SUN, Z. Evaluation of hypericin: effect of aggregation on targeting biodistribution. Journal of Pharmaceutical Sciences, Hoboken, v. 104, p. 215-222, 2015.

34 DELAEY, E.; OBERMUELLER, R.; ZUPKO, I.; DE VOS, D.; FALK, H.; DE WITTE, P. In vitro study of the photocytotoxicity of some hypericin analogs on different cell lines. **Photochemistry and Photobiology**, Hoboken, v. 74, p. 164-171, 2001.

35 BERNAL, C.; TOMINAGA, T. T.; RIBEIRO, A. O.; IMASATO, H.; PERUSSI, J. R. Comparative studies of photophysical and biological properties of hypericin and hypericinglucamine. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, Amsterdam, v. 8, p. 190, 2011. 36 LIMA, A. M.; DAL PIZZOL, C.; MONTEIRO, F. B.; CRECZYNSKI-PASA, T. B.; ANDRADE, G. P.; RIBEIRO, A. O.; PERUSSI, J. R. Hypericin encapsulated in solid lipid nanoparticles: phototoxicity and photodynamic efficiency. Journal of Photochemistry and Photobiology B: biology, Amsterdam, v. 125, p. 146-154, 2013.

37 DERYCKE, A. S.; DE WITTE, P. A. Transferrin-mediated targeting of hypericin embedded in sterically stabilized PEG-liposomes. **International Journal of Oncology**, Athens, v. 20, p. 181-187, 2002.

38 ZHANG, W.; GONG, X.; CAI, Y.; ZHANG, C.; YU, X.; FAN, J.; DIAO, G. Investigation of water-soluble inclusion complex of hypericin with β -cyclodextrin polymer. **Carbohydrate Polymers**, London, v. 95, p. 366-370, 2013.

39 TADROS, T. F. Emulsion formation and stability. New York: John Wiley, 2013. v. 1, p. 56-73.

40 KHAN, B. A.; AKHTAR, N.; KHAN, H. M. S.; WASEEM, K.; MAHMOOD, T.; RASUL, A.; IQBAL, M.; KHAN, H. Basics of pharmaceutical emulsions: a review. African Journal of Pharmacy and Pharmacology, Nigéria, v. 5, p. 2715-2725, 2011.

41 MYERS, D. Surfactant science and technology. New Jersey: John Wiley, 2020. v. 1, p. 121-145.

42 SARKER, D.K. Engineering of nanoemulsions for drug delivery. **Current Drug Delivery**, Sharjah, v. 2, p. 297-310, 2005.

43 PATHAK, K.; PATTNAIK, S.; SWAIN, K. Application of nanoemulsions in drug delivery. *In:* **Nanoemulsions**. San Diego: Academic Press, 2018. p. 415-433.

44 SHAH, P.; BHALODIA, D.; SHELAT, P. Nanoemulsion: a pharmaceutical review. Systematic Reviews in Pharmacy, Mumbai, v. 1, n. 1, 2010.

45 HE; C. X.; HE; Z. G.; GAO; J. Q.; Microemulsions as drug delivery systems to improve the solubility and the bioavailability of poorly water-soluble drugs. **Expert Opinion on Drug Delivery**, Oxon; v. 7, p. 445-460, 2010.

46 AMERICAS; I.C.I.; The HLB system: a time-saving guide to emulsifier selection; ICI Americas, New York, v. 1, p. 1-19, 1984.

47 HONG, I. K.; KIM S. I.; LEE S. B. Effects of HLB value on oil-in-water emulsions: droplet size, rheological behavior, zeta-potential; and creaming index. Journal of Industrial and Engineering Chemistry, New York, v. 67, p. 123-131, 2018.

48 COURTNEY, D.L. Emulsifier selection/HLB. *In*: **Surfactants in cosmetics**. 2 ed. New York: Routledge, 2017. v.1, p. 147-158.

49 TAMILVANAN S.; BENITA S. The potential of lipid emulsion for ocular delivery of lipophilic drugs. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, Amsterdam, v. 58, p. 357-368; 2004.

50 LOH, Z. H.; SAMANTA, A. K. SIA HENG, P. W. Overview of milling techniques for improving the solubility of poorly water-soluble drugs. Asian Journal of Pharmaceutical Sciences, Hoboken, v. 10, p. 255-274, 2015.

51 KALE, S. N; DEORE, S. L. Emulsion micro emulsion and nano emulsion: a review. Systematic Reviews in Pharmacy, Mumbai, v. 8, p. 39, 2017.

52 TALEGAONKAR, S.; AZEEM, A.; AHMAD, F. J.; KHAR, R. K.; PATHAN, S. A.; KHAN, Z. I. Microemulsions: a novel approach to enhanced drug delivery. **Recent Patents on Drug Delivery & Formulation**, Sharjah, v. 2, p. 238-257, 2008.

53 THAKUR, N.; GARG, G.; SHARMA, P.; KUMAR, N. Nanoemulsions: a review on various pharmaceutical application. **Global Journal of Pharmacology**, Punjab, v. 6, p. 222-225, 2012.

54 GUPTA, A.; ERAL, H. B.; HATTON, T. A.; DOYLE, P. S. Nanoemulsions: formation, properties and applications. **Soft Matter**, Cambridge, v. 12, p. 2826-2841, 2016.

55 MISHRA, A.; PANOLA, R.; RANA, A. Microemulsions: as drug delivery system. Journal of Scientific and Innovative Research, New Delhi, v. 3, p. 467-474, 2014.

56 MCCLEMENTS, D. J. Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences, and similarities. **Soft Matter**, Cambridge, v. 8, p. 1719-1729, 2012.

57 EGITO, E.; AMARAL-MACHADO, L.; ALENCAR, E.; OLIVEIRA, A. Microemulsion systems: from the design and architecture to the building of a new delivery system for multiple-route drug delivery. **Drug Delivery and Translational Research**, Heidelberg, v. 11, p. 1-26, 2020.

58 LAWRENCE, M. J.; REES, G. D. Microemulsion-based media as novel drug delivery systems. Advanced Drug Delivery Reviews, Amsterdam, v. 64, p. 175-193, 2012.

59 SCHWUGER, M. J.; STICKDORN, K.; SCHOMAECKER, R. Microemulsions in technical processes. **Chemical Reviews**, Washington, v. 95, p. 849-864, 1995.

60 DATE, A. A.; NAGARSENKER, M. S. Parenteral microemulsions: an overview. International Journal of Pharmaceutics, Amsterdam, v. 355, p. 19-30, 2008.

61 MUZAFFAR, F.; SINGH, U.; CHAUHAN, L. Review on microemulsion as futuristic drug delivery. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, Bhopal, v. 5, p. 39-53, 2013.

62 HU, L.; YANG, J.; LIU, W.; LI, L. Preparation and evaluation of ibuprofen-loaded microemulsion for improvement of oral bioavailability. **Drug Delivery**, Oxon, v. 18, p. 90-95, 2011.

63 ABOUMANEI, M. H.; ABDELBARY, A. A.; IBRAHIM, I. T.; TADROS, M. I.; EL-KOLALY, M. T. Design and development of microemulsion systems of a new antineoplaston A10 analog for enhanced intravenous antitumor activity: In vitro characterization, molecular docking, 125I-radiolabeling and in vivo biodistribution studies. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 545, p. 240-253, 2018.

64 RYU, K. A.; PARK, P. J.; KIM, S. B.; BIN, B. H.; JANG, D. J.; KIM, S. T. Topical delivery of coenzyme q10-loaded microemulsion for skin regeneration. **Pharmaceutics**, Basel, v. 12, p. 332, 2020.

65 BENBOW, T.; CAMPBELL, J. Microemulsions as transdermal drug delivery systems for nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs): a literature review. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, Oxon, v. 45, p. 1849-1855, 2019.

66 JADHAV, K.; SHAIKH, I.; AMBADE, K.; KADAM, V. Applications of microemulsion based drug delivery system. **Current Drug Delivery**, Sharjah, v. 3, p. 267-273, 2006.

67 FROELICH, A.; OSMAŁEK, T.; JADACH, B.; PURI, V.; MICHNIAK-KOHN, B. Microemulsion-based media in nose-to-brain drug delivery. **Pharmaceutics**, Basel, v. 13, p. 201, 2021.

68 LIDICH, N.; GARTI-LEVY, S.; ASERIN, A.; GARTI, N. Potentiality of microemulsion systems in treatment of ophthalmic disorders: keratoconus and dry eye syndrome–In vivo study. **Colloids and Surfaces B:** biointerfaces, Amsterdam, v. 173, p. 226-232, 2019.

69 DAS, S.; LEE, S. H.; CHIA, V. D.; CHOW, P. S.; MACBEATH, C.; LIU, Y.; SHLIEOUT, G. Development of microemulsion based topical ivermectin formulations: Pre-formulation and formulation studies. **Colloids and Surfaces B:** biointerfaces, Amsterdam, v. 189, p. 110823, 2020.

70 CANNON, J. B.; SHI, Y.; GUPTA, P. Emulsions, microemulsions, and lipid-based drug delivery systems for drug solubilization and delivery—part I: parenteral applications. *In*: **Water-insoluble drug formulation**. Boca Raton: CRC Press, 2018. p. 211-245..

71 PAUL, B. K.; MOULIK, S. P. Uses and applications of microemulsions. **Current Science**, Bangalore, p. 990-1001, 2001.

72 JAISWAL, M.; DUDHE, R.; SHARMA, P. Nanoemulsion: an advanced mode of drug delivery system. **3 Biotech**, Berlin, v. 5, p. 123-127, 2015.

73 DUKOVSKI, B. J.; JURETIĆ, M.; BRAČKO, D.; RANDJELOVIĆ, D.; SAVIĆ, S.; MORAL, M. C.; DIEBOLD, Y.; FILIPOVIĆ-GRČIĆ, J.; PEPIĆ, I.; LOVRIĆ, J. Functional ibuprofen-loaded cationic nanoemulsion: development and optimization for dry eye disease treatment. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 576, p. 118979, 2020.

74 YEN, C. C.; CHEN, Y. C.; WU, M. T.; WANG, C. C.; WU, Y. T. Nanoemulsion as a strategy for improving the oral bioavailability and anti-inflammatory activity of andrographolide. **International Journal of Nanomedicine**, Auckland, v. 13, p. 669, 2018.

75 QIN, X.; ZHOU, Y.; WANG, Y.; WANG, Z.; WANG, Y.; CHEN, J.; ZHU, L.; QUAN, X.; LIU, Z.; ZHANG, H.; JIANG, L.; DONG, H.; ZHANG, Z. Preparation and characterization of protein-loaded pfc nanoemulsions for the treatment of heart diseases by pulmonary administration. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, Amsterdam, v. 158, p. 105690, 2021.

76 SU, R.; YANG, L.; WANG, Y.; YU, S.; GUO, Y.; DENG, J.; ZHAO, Q.; JIN, X. Formulation, development, and optimization of a novel octyldodecanol-based nanoemulsion for transdermal delivery of ceramide IIIB. **International Journal of Nanomedicine**, Auckland, v. 12, p. 5203, 2017.

77 H RMANN, K.; ZIMMER, A. Drug delivery and drug targeting with parenteral lipid nanoemulsions — a review. **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v. 223, p. 85-98, 2016.

78 AHMED, K.; L.I, Y.; MCCLEMENTS, D. J.; XIAO, H. Nanoemulsion-and emulsion-based delivery systems for curcumin: encapsulation and release properties. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 132, p. 799-807, 2012.

79 QIAN, C.; DECKER, E. A.; XIAO, H.; MCCLEMENTS, D. J. Nanoemulsion delivery systems: influence of carrier oil on β -carotene bioaccessibility. Food Chemistry, Amsterdam, v. 135, p. 1440-1447, 2012.

80 MELESON, K.; GRAVES, S.; MASON, T. G. Formation of concentrated nanoemulsions by extreme shear. **Soft Materials**, Philadelphia, v. 2, p. 109-123, 2004.

81 GANTA, S.; DEVALAPALLY, H.; BAGULEY, B. C.; GARG, S.; AMIJI, M. Microfluidic preparation of chlorambucil nanoemulsion formulations and evaluation of cytotoxicity and proapoptotic activity in tumor cells. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, Valencia, v. 4, p. 165-173, 2008.

82 KENTISH, S.; WOOSTER, T. J.; ASHOKKUMAR, A.; BALACHANDRAN, S.; MAWSON, R.; SIMONS, L. The use of ultrasonics for nanoemulsion preparation. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, Oxford, v. 9, p. 170-175, 2008.

83 SU, D.; ZHONG, Q. X. Lemon oil nanoemulsions fabricated with sodium caseinate and Tween 20 using phase inversion temperature method. **Journal of Food Engineering**, Oxford, v. 171, p. 214-221, 2016.

84 SAJJADI, S. Nanoemulsion formation by phase inversion emulsification: on the nature of inversion. Langmuir, Washington, v. 22, p. 5597-5603, 2006.

85 SIVAKUMAR, M.; TANG, S. Y.; TAN, K. W. Cavitation technology – a greener processing technique for the generation of pharmaceutical nanoemulsions. **Ultrasonics Sonochemistry**, Amsterdam, v. 21, p. 2069-2083, 2014.

86 KAUR, K.; KUMAR, R.; MEHTA, S. Nanoemulsion: a new medium to study the interactions and stability of curcumin with bovine serum albumin. Journal of Molecular Liquids, Amsterdam, v. 209, p. 62-70, 2015.

87 FALK, H.; MEYER, J.; OBERREITER, M. A Convenient semisynthetic route to hypericin. Monatshefte fur Chemie, Austria, v. 124, p. 339-341, 1993.

88 MAHDI, E. S.; SAKEENA, M. H.; ABDULKARIM, M. F.; ABDULLAH, G. Z.; SATTAR, M. A.; NOOR, A. M. Effect of surfactant and surfactant blends on pseudoternary phase diagram behavior of newly synthesized palm kernel oil esters. **Drug Design, Development and Therapy**, London, v. 5, p. 311, 2011.

89 RYDHAG, L.; WILTON, I. The function of phospholipids of soybean lecithin in emulsions. Journal of the American Oil Chemists' Society, Hoboken, v. 58, p. 830-837, 1981.

90 BOELSMA, E.; TANOJO, H.; BODD, H.; PONEC, M. Assessment of the potential irritancy of oleic acid on human skin: evaluation in vitro and in vivo. **Toxicology in Vitro**, Oxford, v. 10, p. 729-742, 1996.

91 WARISNOICHAROEN, W.; LANSLEY, A.; LAWRENCE, M. Nonionic oil-in-water microemulsions: the effect of oil type on phase behaviour. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 198, p. 7-27, 2000.

92 D'MELLO, S. R.; CRUZ, C. N.; CHEN, M. L.; KAPOOR, M.; LEE, S. L.; TYNER, K. M. The evolving landscape of drug products containing nanomaterials in the United States. **Nature Nanotechnology**, Berlin, v. 12, p. 523-529, 2017.

93 ROOHINEJAD, S.; OEY, I.; WEN, J.; LEE, S. J.; EVERETT, D. W.; BURRITT, D. J. Formulation of oil-in-water β -carotene microemulsions: effect of oil type and fatty acid chain length. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 174, p. 270-278, 2015.

94 B N, G.; STANIČOVÁ, J.; JANCURA, D.; MAREK, J.; BÁNÓ, M.S.; ULIČNÝ, J.; STREJČKOVÁ, A.; MIŠKOVSKÝ, P. On the diffusion of hypericin in dimethylsulfoxide/water mixtures—the effect of aggregation. **The Journal of Physical Chemistry B**, Washington, v. 115, p. 2417-2423, 2011.

95 DOS SANTOS, A. L.F.; DE ALMEIDA, D. R. Q.; TERRA, L. F.; BAPTISTA, M. C.; S.LABRIOLA, L. Photodynamic therapy in cancer treatment-an update review. Journal of Cancer Metastasis and Treatment, Alhambra, v. 5, p. 1-25, 2019.

96 MANNERSTR M, M.; TOIMELA, T.; SARKANEN, J.R.HEINONEN, T. Human BJ fibroblasts is an alternative to mouse BALB/c 3T3 cells in in vitro neutral red uptake assay, **Basic & clinical pharmacology & toxicology**, Reino Unidos, v. 121, p. 109-115, 2017.

97 NORNOO, A. O.; ZHENG, H.; LOPES, L. B.; JOHNSON-RESTREPO, B.; KANNAN, K.; REED, R. Oral microemulsions of paclitaxel: in situ and pharmacokinetic studies. **European** Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, Amsterdam, v. 71, p. 310-317, 2009.

98 TEIXEIRA, R. S.; CURI, R.; MARANHAO, R. C. Effects on walker 256 tumour of carmustine associated with a cholesterol-rich microemulsion (LDE). Journal of Pharmacy and Pharmacology, Oxford, v. 56, p. 909-914, 2004.

99 RAHDAR, A.; HAJINEZHAD, M. R.; NASRI, S.; BEYZAEI, H.; BARANI, M.; TRANT, J.F. The synthesis of methotrexate-loaded F127 microemulsions and their in vivo toxicity in a rat model. **Journal of Molecular Liquids**, Amsterdam, v. 313, p. 113449, 2020.

100 FORMARIZ, T.; SARMENTO, V.; SILVA-JUNIOR, A.; SCARPA, M.; SANTILLI, C.V.; OLIVEIRA, A. Doxorubicin biocompatible O/W microemulsion stabilized by mixed surfactant containing soya phosphatidylcholine. **Colloids and Surfaces B:** biointerfaces, Amsterdam, v. 51, p. 54-61, 2006.

101 SINGH, Y.; MEHER, J. G.; RAVAL, K.; KHAN, F.A.; CHAURASIA, M.; JAIN, N. K.; CHOURASIA, M. K. Nanoemulsion: c oncepts, development and applications in drug delivery. **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v. 252, p. 28-49, 2017.

102 SHAFIQ-UN-NABI, S.; SHAKEEL, F.; TALEGAONKAR, S.; ALI, J.; BABOOTA, S.; AHUJA, A.; KHAR, R.K.; ALI, M. Formulation development and optimization using nanoemulsion technique: a technical note. **AAPS pharmscitech**, New York, v. 8, p. E12-E17, 2007.

103 SCHWARTZBERG, L.S.; NAVARI, R.M. Safety of polysorbate 80 in the oncology setting. Advances in Therapy, New York, v. 35, p. 754-767, 2018.

104 BERTHELSEN, R.; HOLM, R.; JACOBSEN, J.; KRISTENSEN, J.; ABRAHAMSSON, B.; MÜLLERTZ, A. Kolliphor surfactants affect solubilization and bioavailability of fenofibrate. Studies of in vitro digestion and absorption in rats. **Molecular Pharmaceutics**, Washington, v. 12, p. 1062-1071, 2015.

105 PERIASAMY, V. S.; ATHINARAYANAN, J.; ALSHATWI, A. A. Anticancer activity of an ultrasonic nanoemulsion formulation of nigella sativa L. essential oil on human breast cancer cells. **Ultrasonics Sonochemistry**, Amsterdam, v. 31, p. 449-455, 2016.

106 SIVAKUMAR, M.; TANG, S. Y.; TAN, K. W. Cavitation technology-a greener processing technique for the generation of pharmaceutical nanoemulsions. **Ultrasonics Sonochemistry**, Amsterdam, v. 21, p. 2069-2083, 2014.

107 GUO, L.; SANTSCHI, P. H. Ultrafiltration and its applications to sampling and characterisation of aquatic colloids. **IUPAC Series on Analytical and Physical Chemistry of Environmental Systems**, Oxford, v. 10, p. 159, 2007.

108 RAHN-CHIQUE, K.; PUERTAS, A. M.; ROMERO-CANO, M. S.; ROJAS, C.; URBINA-VILLALBA, G. Nanoemulsion stability: experimental evaluation of the flocculation rate from turbidity measurements. **Advances in Colloid and Interface Science**, Amsterdam, v. 178, p. 1-20, 2012.

109 ZHANG, Z.; MCCLEMENTS, D. J.; JAFARI, S. M.; MCCLEMENTS, D. J. Overview of nanoemulsion properties: stability, rheology, and appearance. *In*: **Nanoemulsions**, New York, 2018. cap. 2, p. 21-49.

110 JÜRGENLIEMK, G.; NAHRSTEDT, A. Dissolution, solubility and cooperativity of phenolic compounds from hypericum perforatum L. in aqueous systems. **Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences**, Berlin, v. 58, p. 200-203, 2003.

111 WEISZH R, Z.; CZUCZ, J.; REVESZ, C.; ROSIVALL, L.; SZEBENI, J.; ROZSNYAY, Z. Complement activation by polyethoxylated pharmaceutical surfactants: cremophor-EL, tween-80 and tween-20. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, Amsterdam, v. 45, p. 492-498, 2012.

112 HINGER, D.; GRAFE, S.; NAVARRO, F.; SPINGLER, B.; PANDIARAJAN, D.; WALT, H.; COUFFIN, A. C.; MAAKE, C. Lipid nanoemulsions and liposomes improve photodynamic treatment efficacy and tolerance in CAL-33 tumor bearing nude mice. **Journal of Nanobiotechnology**, London, v. 14, p. 71, 2016.

113 ALKHATIB, M. H.; ALBISHI, H. M. In vitro evaluation of antitumor activity of doxorubicin-loaded nanoemulsion in MCF-7 human breast cancer cells. **Journal of Nanoparticle Research**, Amsterdam, v. 15, p. 1489, 2013.

114 MAHATO, R. Nanoemulsion as targeted drug delivery system for cancer therapeutics. Journal of Pharmaceutical Sciences and Pharmacology, Valencia, v. 3, p. 83-97, 2017.

115 BHEERAM, V.; MALLA, R.; KUMARI, S.; SAHA, A.; MUKKAMALA, S. Cytotoxic effect of photoluminescent re3+ doped ca3 (po4) 2 nanorods on breast cancer cell lines. **IRBM**, Innovation and Research in BioMedical engineering, Paris, v. 40, p. 270-278, 2019.

116 TORCHILIN, V. P. Drug targeting. European Journal of Pharmaceutical Sciences, Amsterdam, v. 11, p. S81-S91, 2000.

117 KRAMMER, B.; VERWANGER, T. Molecular response to hypericin-induced photodamage. **Current Medicinal Chemistry**, Sharjah, v. 19, p. 793-798, 2012.

118 CAO, H.; ZHONG, S.; WANG, Q.; CHEN, C.; TIAN, J.; ZHANG, W. Enhanced photodynamic therapy based on an amphiphilic branched copolymer with pendant vinyl groups for simultaneous GSH depletion and Ce6 release. **Journal of Materials Chemistry B**, London, v. 8, p. 478-483, 2020.

119 PAMPALONI, F.; REYNAUD, E. G.; STELZER, E. H. The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. **Nature Reviews Molecular cell biology**, Berlin, v. 8, p. 839-845, 2007.

120 BUTLER, M. Animal cell culture and technology. London: Taylor & Francis, 2004. v. 1, p. 256.

121 THEOCHARIS, A. D.; SKANDALIS, S. S.; GIALELI, C.; KARAMANOS, N. K. Extracellular matrix structure. Advanced Drug Delivery Reviews, Amsterdam, v. 97, p. 4-27, 2016.

122 WALKER, C.; MOJARES, E.; DELRO HERN NDEZ, A. Role of extracellular matrix in development and cancer progression. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 19, p. 3028, 2018.

123 KOLEDOVA, Z. 3D Cell Culture: an Introduction. *In*: **3D cell culture**: methods and protocols. New York: Springer, 2017. p. 1-11.

124 CHEN, H.; YU, Z.; BAI, S.; LU, H.; XU, D.; CHEN, C.; LIU, D.; ZHU, Y. Microfluidic models of physiological or pathological flow shear stress for cell biology, disease modeling and drug development. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, 2019.

125 JAIN, A.; JAIN, A.; GULBAKE, A.; HURKAT, D. P.; JAIN, S. Solid tumors: a review. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Amsterdam, v. 3, 2011.

126 THOMA, C. R.; ZIMMERMANN, M.; AGARKOVA, I.; KELM, J. M.; KREK, W. 3D cell culture systems modeling tumor growth determinants in cancer target discovery. Advanced **Drug Delivery Reviews**, Amsterdam, v. 69-70, p. 29-41, 2014.

127 KNIGHT, M.STANLEY, S. HIF-1 α as a central mediator of cellular resistance to intracellular pathogens. **Current Opinion in Immunology**, Oxford, v. 60, p. 111-116, 2019.

128 WARFEL, N.; EL-DEIRY, W. HIF-1 signaling in drug resistance to chemotherapy. **Current Medicinal Chemistry**, United Arab Emirates, v. 21, p. 3021-3028, 2014.

129 LOVITT, C. J.; SHELPER, T. B.; AVERY, V. M. Advanced cell culture techniques for cancer drug discovery. **Biology**, Basel, v. 3, p. 345-367, 2014.

130 RIBATTI, D. The chick embryo chorioallantoic membrane (CAM) assay. **Reproductive Toxicology**, Oxford, v. 70, p. 97-101, 2017.

131 KEFFER, J.; PROBERT, L.; CAZLARIS, H.; GEORGOPOULOS, S.; KASLARIS, E.; KIOUSSIS, D.; KOLLIAS, G. Transgenic mice expressing human tumour necrosis factor: a predictive genetic model of arthritis. **The EMBO Journal**, Berlin, v. 10, p. 4025-4031, 1991.

132 HIDALGO, M.; AMANT, F.; BIANKIN, A.V.; BUDINSK, E.; BYRNE, A.T.; CALDAS, C.; CLARKE, R. B.; DE JONG, S.; JONKERS, J.; LANDSMO, G. M. Patient-derived xenograft models: an emerging platform for translational cancer research. **Cancer Discovery**, Philadelphia, v. 4, p. 998-1013, 2014.

133 MAK, I. W.; EVANIEW, N.; GHERT, M. Lost in translation: animal models and clinical trials in cancer treatment. **American Journal of Translational Research**, Madison, v. 6, p. 114, 2014.

134 RAVI, M.; PARAMESH, V.; KAVIYA, S.; ANURADHA, E.; SOLOMON, F. 3D cell culture systems: advantages and applications. **Journal of Cellular Physiology**, Hoboken, v. 230, p. 16-26, 2015.

135 FONTANA, F.; RAIMONDI, M.; MARZAGALLI, M.; SOMMARIVA, M.; GAGLIANO, N.; LIMONTA, P. Three-dimensional cell cultures as an in vitro tool for prostate cancer modeling and drug discovery. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 21, p. 6806, 2020.

136 ANTONI, D.; BURCKEL, H.; JOSSET, E.; NOEL, G. Three-dimensional cell culture: a breakthrough in vivo. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 16, p. 5517-5527, 2015.

137 FENNEMA, E.; RIVRON, N.; ROUWKEMA, J.; VAN BLITTERSWIJK, C.; DE BOER, J. Spheroid culture as a tool for creating 3D complex tissues. **Trends in Biotechnology**, London, v. 31, p. 108-115, 2013.

138 RIEU, C.; PARISI, C.; MOSSER, G.; HAYE, B.; CORADIN, T.; FERNANDES, F. M.; TRICHET, L. Topotactic fibrillogenesis of freeze-cast microridged collagen scaffolds for 3D cell culture. **ACS Applied Materials & Interfaces**, Washington, v. 11, p. 14672-14683, 2019.

139 LUO, H.; ZHANG, Y.; GAN, D.; YANG, Z.; AO, H.; ZHANG, Q.; YAO, F.; WAN, Y. Incorporation of hydroxyapatite into nanofibrous PLGA scaffold towards improved breast cancer cell behavior. **Materials Chemistry and Physics**, Switzerland, v. 226, p. 177-183, 2019.

140 CHOI, J. S.; KIM, B. S.; KIM, J. Y.; KIM, J. D.; CHOI, Y. C.; YANG, H. J.; PARK, K.; LEE, H. Y.; CHO, Y. W. Decellularized extracellular matrix derived from human adipose tissue as a potential scaffold for allograft tissue engineering. Journal of Biomedical Materials **Research Part A**, Hoboken, v. 97, p. 292-299, 2011.

141 UNAGOLLA, J. M.; JAYASURIYA, A. C. Hydrogel-based 3D bioprinting: a comprehensive review on cell-laden hydrogels, bioink formulations, and future perspectives. **Applied Materials Today**, Amsterdam, v. 18, p. 100479, 2020.

142 ALGHUWAINEM, A.; ALSHAREEDA, A. T.; ALSOWAYAN, B. Scaffold-free 3-D Cell sheet technique bridges the gap between 2-d cell culture and animal models. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 20, p. 4926, 2019.

143 GLACKEN, M.; FLEISCHAKER, R.; SINSKEY, A. Mammalian cell culture: engineering principles and scale-up. **Trends in Biotechnology**, London, v. 1, p. 102-108, 1983.

144 GUNGOR-OZKERIM, P.S.; INCI, I.; ZHANG, Y. S.; KHADEMHOSSEINI, A.; DOKMECI, M. R. Bioinks for 3D bioprinting: an overview. **Biomaterials Science**, Cambs, v. 6, p. 915-946, 2018.

145 DHIMAN, H.K.; RAY, A. R.; PANDA, A. K. Three-dimensional chitosan scaffold-based MCF-7 cell culture for the determination of the cytotoxicity of tamoxifen. **Biomaterials**, Amsterdam, v. 26, p. 979-986, 2005.

146 MENG, Q. Three-dimensional culture of hepatocytes for prediction of drug-induced hepatotoxicity. **Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology**, Oxon, v. 6, p. 733-746, 2010.

147 YIN, J.; MENG, Q.; ZHANG, G.; SUN, Y. Differential methotrexate hepatotoxicity on rat hepatocytes in 2-D monolayer culture and 3-D gel entrapment culture. **Chemico-Biological Interactions**, Ireland, v. 180, p. 368-375, 2009.

148 TR DAN, O.; GALMARINI, C. M.; PATEL, K.; TANNOCK, I. F. Drug resistance and the solid tumor microenvironment. **Journal of the National Cancer Institute**, London, v. 99, p. 1441-1454, 2007.

149 HUH, D.; HAMILTON, G.A.; INGBER, D. E. From 3D cell culture to organs-onchips. **Trends in Cell Biology**, London, v. 21, p. 745-754, 2011.

150 TIBBITT, M. W.; ANSETH, K. S. Hydrogels as extracellular matrix mimics for 3D cell culture. **Biotechnology and Bioengineering**, Hoboken, v. 103, p. 655-663, 2009.

151 NICODEMUS, G. D.; BRYANT, S. J. Cell encapsulation in biodegradable hydrogels for tissue engineering applications. **Tissue Engineering Part B:** reviews, Hoboken, v. 14, p. 149-165, 2008.

152 RUEDINGER, F.; LAVRENTIEVA, A.; BLUME, C.; PEPELANOVA, I.; SCHEPER, T. Hydrogels for 3D mammalian cell culture: a starting guide for laboratory practice. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 99, p. 623-636, 2015.

153 FU, J. Hydrogel properties and applications. **Journal of Materials Chemistry B**, London, v. 7, p. 1523-1525, 2019.

154 ZHU, J.; MARCHANT, R. E. Design properties of hydrogel tissue-engineering scaffolds. **Expert Review of Medical Devices**, Oxon, v. 8, p. 607-626, 2011.

155 XIAO, S.; ZHAO, T.; WANG, J.; WANG, C.; DU, J.; YING, L.; LIN, J.; ZHANG, C.; HU, W.; WANG, L. Gelatin methacrylate (GelMA)-based hydrogels for cell transplantation: an effective strategy for tissue engineering. **Stem Cell Reviews and Reports**, New York, v. 15, p. 664-679, 2019.

156 VAN DEN BULCKE, A.I.; BOGDANOV, B.; DE ROOZE, N.; SCHACHT, E.H.; CORNELISSEN, M.; BERGHMANS, H. Structural and rheological properties of methacrylamide modified gelatin hydrogels. **Biomacromolecules**, Hoboken, v. 1, p. 31-38, 2000.

157 KUMAR, H.; KIM, K. Stereolithography 3D bioprinting. **3D Bioprinting**, Amsterdam, p. 93-108, 2020.

158 BAGHERI, A.; JIN, J. Photopolymerization in 3D printing. ACS Applied Polymer Materials, Washington, v. 1, p. 593-611, 2019.

159 CONCONI, A.; BELL, B. Molecular biology: the long and short of a DNA-damage response. **Nature**, Berlin, v. 545, p. 165-166, 2017.

160 KNOWLTON, S.; YENILMEZ, B.; ANAND, S.; TASOGLU, S. Photocrosslinking-based bioprinting: examining crosslinking schemes. **Bioprinting**, Amsterdam, v. 5, p. 10-18, 2017.

161 WANG, Z.; KUMAR, H.; TIAN, Z.; JIN, X.; HOLZMAN, J.F.; MENARD, F.; KIM, K. Visible light photoinitiation of cell-adhesive gelatin methacryloyl hydrogels for stereolithography 3D bioprinting. **ACS Applied Materials & Interfaces**, Washington, v. 10, p. 26859-26869, 2018.

162 XIANG, L.; CUI, W. Biomedical application of photo-crosslinked gelatin hydrogels. Journal of Leather Science and Engineering, New York, v. 3, p. 1-24, 2021.

163 DARVISHI, S.; SOUISSI, M.; KHARAZIHA, M.; KARIMZADEH, F.; SAHARA, R.; AHADIAN, S. Gelatin methacryloyl hydrogel for glucose biosensing using Ni nanoparticlesreduced graphene oxide: an experimental and modeling study. **Electrochimica Acta**, Amsterdam, v. 261, p. 275-283, 2018.

164 DONG, Z.; YUAN, Q.; HUANG, K.; XU, W.; LIU, G.; GU, Z. Gelatin methacryloyl (GelMA)-based biomaterials for bone regeneration. **RSC Advances**, London, v. 9, p. 17737-17744, 2019.

165 GAO, G.; SCHILLING, A.F.; HUBBELL, K.; YONEZAWA, T.; TRUONG, D.; HONG, Y.; DAI, G.; CUI, X. Improved properties of bone and cartilage tissue from 3D inkjetbioprinted human mesenchymal stem cells by simultaneous deposition and photocrosslinking in PEG-GelMA. **Biotechnology Letters**, Amsterdam, v. 37, p. 2349-2355, 2015.

166 BEJLERI, D.; STREETER, B. W.; NACHLAS, A.L.; BROWN, M. E.; GAETANI, R.; CHRISTMAN, K. L.; DAVIS, M. E. A bioprinted cardiac patch composed of cardiac-specific extracellular matrix and progenitor cells for heart repair. Advanced Healthcare Materials, Hoboken, v. 7, p. 1800672, 2018.

167 LIN, R. Z.; CHEN, Y. C.; MORENO-LUNA, R.; KHADEMHOSSEINI, A.; MELERO-MARTIN, J. M. Transdermal regulation of vascular network bioengineering using a photopolymerizable methacrylated gelatin hydrogel. **Biomaterials**, Amsterdam, v. 34, p. 6785-6796, 2013.

168 YUE, K.; TRUJILLO-DE SANTIAGO, G.; ALVAREZ, M. M.; TAMAYOL, A.; ANNABI, N.; KHADEMHOSSEINI, A. Synthesis, properties, and biomedical applications of gelatin methacryloyl (GelMA) hydrogels. **Biomaterials**, Amsterdam, v. 73, p. 254-271, 2015.

169 NICHOL, J. W.; KOSHY, S. T.; BAE, H.; HWANG, C.M.; YAMANLAR, S.; KHADEMHOSSEINI, A. Cell-laden microengineered gelatin methacrylate hydrogels. **Biomaterials**, Amsterdam, v. 31, p. 5536-5544, 2010.

170 PEPELANOVA, I.; KRUPPA, K.; SCHEPER, T.; LAVRENTIEVA, A. Gelatinmethacryloyl (GelMA) hydrogels with defined degree of functionalization as a versatile toolkit for 3D cell culture and extrusion bioprinting. **Bioengineering**, Basel, v. 5, p. 55, 2018.

171 LEE, Y.; LEE, J. M.; BAE, P. K.; CHUNG, I.Y.; CHUNG, B. H.; CHUNG, B. G. Photocrosslinkable hydrogel-based 3D microfluidic culture device. **Electrophoresis**, Hoboken, v. 36, p. 994-1001, 2015.

172 GORDON, R. Skin Cancer: an overview of epidemiology and risk factors. **Seminars in Oncology Nursing**, New York, v. 29, p. 160-169, 2013.

173 DIDONA, D.; PAOLINO, G.; BOTTONI, U.; CANTISANI, C. Non melanoma skin cancer pathogenesis overview. **Biomedicines**, Basel, v. 6, p. 6, 2018.

174 SCHADENDORF, D.; VAN AKKOOI, A .C.; BERKING, C.; GRIEWANK, K. G.; GUTZMER, R.; HAUSCHILD, A.; STANG, A.; ROESCH, A.; UGUREL, S. Melanoma. **The Lancet**, Oxford, v. 392, p. 971-984, 2018.

175 CHAMPSAS, G.; PAPADOPOULOS, O. The role of the sentinel lymph node biopsy in the treatment of nonmelanoma skin cancer and cutaneous melanoma, non-melanoma skin cancer and cutaneous melanoma, **Springer Nature**, Berlin, p. 647-704, 2020.

176 CROWSON, A.N.; MAGRO, C. M.; MIHM, M. C. Prognosticators of melanoma, the melanoma report, and the sentinel lymph node. **Modern Pathology**, London, v. 19, p. S71-S87, 2006.

177 NARAYANAN, D. L.; SALADI, R. N.; FOX, J. L. Review: ultraviolet radiation and skin câncer. **International Journal of Dermatology**, London, v. 49, p. 978-986, 2010.

178 ATALLAH, E.; FLAHERTY, L. Treatment of metastatic malignant melanoma. Current treatment options in oncology, New York, v. 6, p. 185-193, 2005.

179 SALADI, R. N.; PERSAUD, A. N. The causes of skin cancer: a comprehensive review. **Drugs of Today**, Barcelona, v. 41, p. 37-54, 2005.

180 DOMINGUES, B.; LOPES, J. M.; SOARES, P.; PULO, H. Melanoma treatment in review. ImmunoTargets and therapy, Auckland, v. 7, p. 35, 2018.

181 DOLMANS, D. E.; FUKUMURA, D.; JAIN, R.K. Photodynamic therapy for câncer. **Nature Reviews Cancer**, Berlin, v. 3, p. 380, 2003.

182 ZHANG, L.; JI, Z.; ZHANG, J.; YANG, S. Photodynamic therapy enhances skin cancer chemotherapy effects through autophagy regulation. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, Amsterdam, v. 28, p. 159-165, 2019.

183 DRIEHUIS, E.; SPELIER, S.; BELTR N HERN NDEZ, I.; DE BREE, R.; M WILLEMS, S.; CLEVERS, H.; OLIVEIRA, S. Patient-derived head and neck cancer organoids recapitulate egfr expression levels of respective tissues and are responsive to egfr-targeted photodynamic therapy. **Journal of Clinical Medicine**, Basel, v. 8, p. 1880, 2019.

184 BANERJEE, S.; MACROBERT, A.; MOSSE, C.; PERIERA, B.; BOWN, S.; KESHTGAR, M. Photodynamic therapy: Inception to application in breast cancer. **The Breast**, Amsterdam, v. 31, p. 105-113, 2017.

185 DE ALBUQUERQUE, I. O.; NUNES, J.; LONGO, J. P. F.; MUEHLMANN, L. A.; AZEVEDO, R. B. Photodynamic therapy in superficial basal cell carcinoma treatment. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, Amsterdam, v. 27, p. 428-432, 2019.

186 YOON, I.; LI, J.Z.; SHIM, Y. K. Advance in photosensitizers and light delivery for photodynamic therapy. **Clinical Endoscopy**, Seoul, v. 46, p. 7, 2013.

187 BAROLET, D. Light-emitting diodes (leds) in dermatology. Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery, New York, v. 27, p. 227-238, 2009.

188 DĄBROWSKI, J. M.; PUCELIK, B.; REGIEL-FUTYRA, A.; BRINDELL, M.; MAZURYK, O.; KYZIOŁ, A.; STOCHEL, G.; MACYK, W.; ARNAUT, L. G. Engineering of relevant photodynamic processes through structural modifications of metallotetrapyrrolic photosensitizers. **Coordination Chemistry Reviews**, Amsterdam, v. 325, p. 67-101, 2016.

189 HIGGINS, S. L.; BREWER, K. J. Designing red-light-activated multifunctional agents for the photodynamic therapy. **Angewandte Chemie International Edition**, Berlin, v. 51, p. 11420-11422, 2012.

190 YIN, R.; DAI, T.; AVCI, P.; JORGE, A. E. S.; DE MELO, W. C.; VECCHIO, D.; HUANG, Y.-Y.; GUPTA, A; HAMBLIN, M. R. Light based anti-infectives: ultraviolet C irradiation, photodynamic therapy, blue light, and beyond. **Current opinion in pharmacology**, Oxford, v. 13, p. 731-762, 2013.

191 MUREKATETE, B.; SHOKOOHMAND, A.; MCGOVERN, J.; MOHANTY, L.; MEINERT, C.; HOLLIER, B. G.; ZIPPELIUS, A.; UPTON, Z.; KASHYAP, A. S. Targeting insulin-like growth factor-i and extracellular matrix interactions in melanoma progression. Scientific Reports, Berlin, v. 8, p. 1-12, 2018.

192 MORALES, D.; LOMBART, F.; TRUCHOT, A.; MAIRE, P.; HUSSEIN, M.; HAMITOU, W.; VIGNERON, P.; GALMICHE, A.; LOK, C.; VAYSSADE, M. 3D coculture models underline metastatic melanoma cell sensitivity to vemurafenib. **Tissue Engineering Part A**, New Rochelle, v. 25, p. 1116-1126, 2019.

193 GOERS, L.; FREEMONT, P.; POLIZZI, K.M. Co-culture systems and technologies: taking synthetic biology to the next level. **Journal of The Royal Society Interface**, London, v. 11, p. 20140065, 2014.

194 MIKI, Y.; ONO, K.; HATA, S.; SUZUKI, T.; KUMAMOTO, H.; SASANO, H. The advantages of co-culture over mono cell culture in simulating in vivo environment. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, Amsterdam, v. 131, p. 68-75, 2012.

195 KOSTADINOVA, R.; BOESS, F.; APPLEGATE, D.; SUTER, L.; WEISER, T.; SINGER, T.; NAUGHTON, B.; ROTH, A. A long-term three dimensional liver co-culture system for improved prediction of clinically relevant drug-induced hepatotoxicity. **Toxicology and Applied Pharmacology**, Amsterdam, v. 268, p. 1-16, 2013.

196 ANTUNES, F.; ANDRADE, F.; ARA JO, F.; FERREIRA, D.SARMENTO, B. Establishment of a triple co-culture in vitro cell models to study intestinal absorption of peptide drugs. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, Amsterdam, v. 83, p. 427-435, 2013.

197 MIRI, A. K.; HOSSEINABADI, H. G.; CECEN, B.; HASSAN, S.; ZHANG, Y. S. Permeability mapping of gelatin methacryloyl hydrogels. Acta Biomaterialia, Oxford, v. 77, p. 38-47, 2018.

198 SARNA, M.; KRZYKAWSKA-SERDA, M.; JAKUBOWSKA, M.; ZADLO, A.; URBANSKA, K. Melanin presence inhibits melanoma cell spread in mice in a unique mechanical fashion. **Scientific Reports**, Berlin, v. 9, p. 1-9, 2019.

199 CUVELLIER, M.; EZAN, F.; OLIVEIRA, H.; ROSE, S.; FRICAIN, J. C.; LANGOU T, S.; LEGAGNEUX, V.; BAFFET, G. 3D culture of HepaRG cells in GelMa and its application to bioprinting of a multicellular hepatic model. **Biomaterials**, Oxford, v. 269, p. 120611, 2021.

200 STRICKER, J.; FALZONE, T.; GARDEL, M. L. Mechanics of the F-actin cytoskeleton. Journal of Biomechanics, Oxford, v. 43, p. 9-14, 2010.

201 HAKKINEN, K. M.; HARUNAGA, J. S.; DOYLE, A. D.; YAMADA, K. M. Direct comparisons of the morphology, migration, cell adhesions, and actin cytoskeleton of fibroblasts in four different three-dimensional extracellular matrices. **Tissue Engineering Part A**, New Rochelle, v. 17, p. 713-724, 2011.

202 ŠKALAMERA, D.; STEVENSON, A.J.; EHMANN, A.; AINGER, S. A.; LANAGAN, C.; STURM, R. A.; GABRIELLI, B. Melanoma mutations modify melanocyte dynamics in coculture with keratinocytes or fibroblasts. **Journal of Cell Science**, London, v. 132, n. 24, p. 234716, 2019.

203 PAPACCIO, F.; KOVACS, D.; BELLEI, B.; CAPUTO, S.; MIGLIANO, E.; COTA, C.; PICARDO, M. Profiling cancer-associated fibroblasts in melanoma. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 22, p. 7255, 2021.

204 FLACH, E. H.; REBECCA, V. W.; HERLYN, M.; SMALLEY, K. S.; ANDERSON, A. R. Fibroblasts contribute to melanoma tumor growth and drug resistance. **Molecular Pharmaceutics**, Washington, v. 8, p. 2039-2049, 2011.

205 STEER, A.; CORDES, N.; JENDROSSEK, V.; KLEIN, D. Impact of cancer-associated fibroblast on the radiation-response of solid xenograft tumors. **Frontiers in Molecular Biosciences**, Basel, v. 6, p. 70, 2019.

206 SMALLEY, K. S.; LIONI, M.; HERLYN, M. Targeting the stromal fibroblasts: a novel approach to melanoma therapy. **Expert Review of** Unido, v. 5, p. 1069-1078, 2005.

207 SLOMINSKI, A.; KIM, T. K.; BROŻYNA, A.; JANJETOVIC, Z.; BROOKS, D.; SCHWAB, L.; SKOBOWIAT, C.; J ŹWICKI, W.; SEAGROVES, T. The role of melanogenesis in regulation of melanoma behavior: Melanogenesis leads to stimulation of HIF-1 α expression and HIF-dependent attendant pathways. Archives of Biochemistry and Biophysics, New York, v. 563, p. 79-93, 2014.

208 FANG, Y.; EGLEN, R.M. Three-dimensional cell cultures in drug discovery and development. **SLAS DISCOVERY:** Advancing the Science of Drug Discovery, Thousand Oaks, v. 22, p. 456-472, 2017.

209 GHOSH, S.; SPAGNOLI, G. C.; MARTIN, I.; PLOEGERT, S.; DEMOUGIN, P.; HEBERER, M.; RESCHNER, A. Three-dimensional culture of melanoma cells profoundly affects gene expression profile: A high density oligonucleotide array study. Journal of Cellular Physiology, New York, v. 204, p. 522-531, 2005.

210 QU, D.; GUO, M.; QIN, Y.; WANG, L.; ZONG, B.; CHEN, Y.; CHEN, Y. A multicomponent microemulsion using rational combination strategy improves lung cancer treatment through synergistic effects and deep tumor penetration. **Drug Delivery**, Washington, v. 24, p. 1179-1190, 2017.

211 LOPES, L. B. Overcoming the cutaneous barrier with microemulsions. **Pharmaceutics**, Basel, v. 6, p. 52-77, 2014.

212 VERSLUIS, A.; VAN GEEL, P.; OPPELAAR, H.; VAN BERKEL, T.; BIJSTERBOSCH, M. Receptor-mediated uptake of low-density lipoprotein by B16 melanoma cells in vitro and in vivo in mice. **British Journal of Cancer**, Berlin, v. 74, p. 525-532, 1996.

213 FAVERO, G. M.; PAZ, J. L.; OTAKE, A. H.; MARIA, D. A.; CALDINI, E. G.; DE MEDEIROS, R. S.; DEUS, D. F.; CHAMMAS, R.; MARANHAO, R. C.; BYDLOWSKI, S. P. Cell internalization of 7-ketocholesterol-containing nanoemulsion through LDL receptor reduces melanoma growth in vitro and in vivo: a preliminary report. **Oncotarget**, Orchard Park, v. 9, p. 14160, 2018.

214 WHITESIDES, G.M. The origins and the future of microfluidics. **Nature**, Berlin, v. 442, p. 368-373, 2006.

215 YANG, Y.; LEONG, K. W. Microfluidic platforms with nanoscale features. Microfluidic Cell Culture Systems, Amsterdam a, p. 65-90, 2019.

216 BHATIA, S.N.; INGBER, D.E. Microfluidic organs-on-chips. Nature Biotechnology, Berlin, v. 32, p. 760, 2014.

217 BOUSSOMMIER-CALLEJA, A.; LI, R.; CHEN, M. B.; WONG, S. C.; KAMM, R. D. Microfluidics: a new tool for modeling cancer–immune interactions. **Trends in Cancer**, London, v. 2, p. 6-19, 2016.

218 BEINER, N.; LORENZ, T.; REICHL, S. Organ on chip, microsystems for pharmatechnology. Berlin: Springer, 2016. p. 299-339.

219 SHAO, J.; WU, L.; WU, J.; ZHENG, Y.; ZHAO, H.; JIN, Q.; ZHAO, J. Integrated microfluidic chip for endothelial cells culture and analysis exposed to a pulsatile and oscillatory shear stress. **Lab on a Chip**, Cambs, v. 9, p. 3118-3125, 2009.

220 SUN, H.; JIA, Y.; DONG, H.; DONG, D.; ZHENG, J. Combining additive manufacturing with microfluidics: an emerging method for developing novel organs-on-chips. **Current Opinion in Chemical Engineering**, Amsterdam, v. 28, p. 1-9, 2020.

221 VAN DUINEN, V.; TRIETSCH, S.J.; JOORE, J.; VULTO, P.; HANKEMEIER, T. Microfluidic 3D cell culture: from tools to tissue models. **Current Opinion in Biotechnology**, Oxford, v. 35, p. 118-126, 2015.

222 WU, Q.; LIU, J.; WANG, X.; FENG, L.; WU, J.; ZHU, X.; WEN, W.; GONG, X. Organon-a-chip: recent breakthroughs and future prospects. **Biomedical Engineering Online**, London, v. 19, p. 1-19, 2020.

223 BOUSSOMMIER-CALLEJA, A.; LI, R.; CHEN, M.B.; WONG, S.C.; KAMM, R.D. Microfluidics: a new tool for modeling cancer-immune interactions. **Trends Cancer**, Cambridge, v. 2, p. 6-19, 2016.

224 LOWENSTEIN, P. R.; CASTRO, M. G. Uncertainty in the translation of preclinical experiments to clinical trials. why do most phase III clinical trials fail?. **Current Gene Therapy**, Sharjah, v. 9, p. 368-374, 2009.

225 VANNORMAN, G. A. Limitations of animal studies for predicting toxicity in clinical trials: is it time to rethink our current approach?. **Journal of the American College of Cardiology**: basic to translational science, New York, v. 4, p. 845-854, 2019.

226 ESCH, E. W.; BAHINSKI, A.; HUH, D. Organs-on-chips at the frontiers of drug discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, Berlin, v. 14, p. 248-260, 2015.

227 LIU, Y.; GILL, E.; SHERY HUANG, Y.Y. Microfluidic on-chip biomimicry for 3D cell culture: a fit-for-purpose investigation from the end user standpoint. **Future Science OA**, London, v. 3, p. FSO173, 2017.

228 JUNAID, A.; MASHAGHI, A.; HANKEMEIER, T.; VULTO, P. An end-user perspective on organ-on-a-chip: assays and usability aspects. **Current Opinion in Biomedical Engineering**, Amsterdam, v. 1, p. 15-22, 2017.

229 JIANG, X.; WANG, J.; DENG, X.; XIONG, F.; ZHANG, S.; GONG, Z.; LI, X.; CAO, K.; DENG, H.; HE, Y.; LIAO, Q.; XIANG, B.; ZHOU, M.; GUO, C.; ZENG, Z.; LI, G.; LI, X.; XIONG, W. The role of microenvironment in tumor angiogenesis. Journal of Experimental & Clinical Cancer Research, London, v. 39, p. 204, 2020.

230 NAUMOV, G.N.; AKSLEN, L.A.; FOLKMAN, J. Role of Angiogenesis in Human Tumor Dormancy: Animal Models of the Angiogenic Switch. **Cell Cycle**, Milton Park, v. 5, p. 1779-1787, 2006.

231 CHEN, B.; ROSKAMS, T.DE WITTE, P.A.M. Antivascular tumor eradication by hypericin-mediated photodynamic therapy. **Photochemistry and Photobiology**, Hoboken, v. 76, p. 509-513, 2002.

232 ZHAO, Y.; TU, P.; ZHOU, G.; ZHOU, Z.; LIN, X.; YANG, H.; LU, Z.; GAO, T.; TU, Y.; XIE, H.; ZHENG, Q.; GU, Y.; TAO, J.; ZHU, X. Hemoporfin Photodynamic Therapy for Port-Wine Stain: A Randomized Controlled Trial. **PLOS ONE**, San Francisco, v. 11, p. e0156219, 2016.

233 PREISE, D.; OREN, R.; GLINERT, I.; KALCHENKO, V.; JUNG, S.; SCHERZ, A.; SALOMON, Y. Systemic antitumor protection by vascular-targeted photodynamic therapy involves cellular and humoral immunity. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, Berlin, v. 58, p. 71-84, 2009.

234 AUGUSTIN, A.J.S; CHMIDT-ERFURTH, U. Verteporfin therapy combined with intravitreal triamcinolone in all types of choroidal neovascularization due to age-related macular degeneration. **Ophthalmology**, San Francisco, v. 113, p. 14-22, 2006.

235 CHISTIAKOV, D.A.; OREKHOV, A.N.; BOBRYSHEV, Y.V. Effects of shear stress on endothelial cells: go with the flow. **Acta physiologica**, Hoboken, v. 219, p. 382-408, 2017.

236 RISAU, W.; WOLBURG, H. Development of the blood-brain barrier. Trends in Neurosciences, London, v. 13, p. 174-178, 1990.

237 NIETHAMER, T. K.; STABLER, C. T.; LEACH, J. P.; ZEPP, J.A.; MORLEY, M. P.; BABU, A.; ZHOU, S.; MORRISEY, E. E. Defining the role of pulmonary endothelial cell heterogeneity in the response to acute lung injury. **eLife**, Cambridge, v. 9, p. e53072, 2020.

238 JEANSSON, M.; HARALDSSON, B. Morphological and functional evidence for an important role of the endothelial cell glycocalyx in the glomerular barrier. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, New York, v. 290, p. F111-F116, 2006.

239 ADAIR, T. H.; GAY, W.J.; MONTANI, J.P. Growth regulation of the vascular system: evidence for a metabolic hypothesis. American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, Rockville, v. 259, p. R393-R404, 1990.

240 WARREN, B. A. The vascular morphology of tumors. In: PETERSON, H. I. (Ed.). **Tumor blood circulation: angiogenesis, vascular morphology and blood flow of experimental and human tumors**. Boca Raton: CRC Press, 2020. p. 1-47.

241 DEWEY JUNIOR, C.; BUSSOLARI, S.; GIMBRONE JUNIOR, M.; DAVIES, P. F. The dynamic response of vascular endothelial cells to fluid shear stress. **Journal of Biomechanical Engineering**, New York, v. 103, p. 177-185, 1981.

242 LI, Y. S .J.; HAGA, J. H.; CHIEN, S. Molecular basis of the effects of shear stress on vascular endothelial cells. **Journal of Biomechanics**, Oxon, v. 38, p. 1949-1971, 2005.

243 CONWAY, D. E.; SCHWARTZ, M. A. Mechanotransduction of shear stress occurs through changes in VE-cadherin and PECAM-1 tension: implications for cell migration. Cell Adhesion & Migration, Philadelphia, v. 9, p. 335-339, 2015.

244 CHUNG, J.; KIM, K. H.; AN, S. H.; LEE, S.; LIM, B. K.; KANG, S. W.; KWON, K. Coxsackievirus and adenovirus receptor mediates the responses of endothelial cells to fluid shear stress. **Experimental & Molecular Medicine**, London, v. 51, p. 1-15, 2019.

245 CUNNINGHAM, K. S.; GOTLIEB, A. I. The role of shear stress in the pathogenesis of atherosclerosis. Laboratory Investigation, London, v. 85, p. 9-23, 2005.

246 DELA PAZ, N. G.; WALSHE, T. E.; LEACH, L .L.; SAINT-GENIEZ, M.; D'AMORE, P.A. Role of shear-stress-induced VEGF expression in endothelial cell survival. **Journal of Cell Science**, Histon, v. 125, p. 831-843, 2012.

247 BAEYENS, N.; BANDYOPADHYAY, C.; COON, B. G.; YUN, S.; SCHWARTZ, M. A. Endothelial fluid shear stress sensing in vascular health and disease. Journal of Clinical Investigation, Ann Arbor, v. 126, p. 821-828, 2016.

248 KIM, D.; LIN, Y. S.; HAYNES, C. L. On-chip evaluation of shear stress effect on cytotoxicity of mesoporous silica nanoparticles. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 83, p. 8377-8382, 2011.

249 HATTORI, K.; MUNEHIRA, Y.; KOBAYASHI, H.; SATOH, T.; SUGIURA, S.; KANAMORI, T. Microfluidic perfusion culture chip providing different strengths of shear stress for analysis of vascular endothelial function. Journal of Bioscience and Bioengineering, Osaka, v. 118, p. 327-332, 2014.

250 INGLEBERT, M.; LOCATELLI, L.; TSVIRKUN, D.; MAIER, J. A.; MISBAH, C.; BUREAU, L. The effect of shear stress reduction on endothelial cells: a microfluidic study of the actin cytoskeleton. **Biomicrofluidics**, Melville, v. 14, p. 024115, 2020.

251 CUI, P.: WANG, S. Application of microfluidic chip technology in pharmaceutical analysis: A review. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, Amsterdam, v. 9, p. 238-247, 2019.

252 PARK, T. H.; SHULER, M. L. Integration of cell culture and microfabrication technology. **Biotechnology Progress**, Hoboken, v. 19, p. 243-253, 2003.

253 ZORLUTUNA, P.; ANNABI, N.; CAMCI-UNAL, G.; NIKKHAH, M.; CHA, J. M.; NICHOL, J. W.; MANBACHI, A.; BAE, H.; CHEN, S.; KHADEMHOSSEINI, A. Microfabricated biomaterials for engineering 3D tissues. Advanced Materials, Weinheim, v. 24, p. 1782-1804, 2012.

254 REN, K.; ZHOU, J.; WU, H. Materials for microfluidic chip fabrication. Accounts of Chemical Research, Washington, v. 46, p. 2396-2406, 2013.

255 WHITESIDES, G. M.; OSTUNI, E.; TAKAYAMA, S.; JIANG, X.; INGBER, D. E. Soft lithography in biology and biochemistry. **Annual Review of Biomedical Engineering**, Palo Alto, v. 3, p. 335-373, 2001.

256 SIDDIQUE, A.; MECKEL, T.; STARK, R.W.; NARAYAN, S. Improved cell adhesion under shear stress in PDMS microfluidic devices. **Colloids and Surfaces B:** biointerfaces, Amsterdam, v. 150, p. 456-464, 2017.

257 KIM, P.; KWON, K. W.; PARK, M. C.; LEE, S. H.; KIM, S.; M.SUH, K. Y. Soft lithography for microfluidics: a review. **BioChip Journal**, Seoul, v. 2, p. 1-11, 2008.

258 QIN, D.; XIA, Y.; WHITESIDES, G. M. Soft lithography for micro-and nanoscale patterning. **Nature Protocols**, Berlin, v. 5, p. 491-502, 2010.

259 XIA, Y.; WHITESIDES, G. M. Soft lithography. Angewandte Chemie International Edition, Berlin, v. 37, p. 550-575, 1998.

260 THOMPSON, B. L.; OUYANG, Y.; DUARTE, G. R. M.; CARRILHO, E.; KRAUSS, S. T.; LANDERS, J. P. Inexpensive, rapid prototyping of microfluidic devices using overhead transparencies and a laser print, cut and laminate fabrication method. **Nature Protocols**, Berlin, v. 10, p. 875, 2015.

261 URBACZEK, A. C.; LEÃO, P. A. G. C.; DE SOUZA, F. Z. R.; AFONSO, A.; ALBERICE, J. V.; CAPPELINI, L. T. D.; CARLOS, I. Z.; CARRILHO, E. Endothelial cell culture under perfusion on a polyester-toner microfluidic device. **Scientific Reports**, Berlin, v. 7, p. 10466, 2017.

262 PATKO, D.; M RTONFALVI, Z.; KOVACS, B.; VONDERVISZT, F.; KELLERMAYER, M.; HORVATH, R. Microfluidic channels laser-cut in thin double-sided tapes: cost-effective biocompatible fluidics in minutes from design to final integration with optical biochips. **Sensors and Actuators B:** chemical, Amsterdam, v. 196, p. 352-356, 2014.

263 YOUNG, E. W. K.; SIMMONS, C. A. Macro- and microscale fluid flow systems for endothelial cell biology. Lab on a Chip, Cambs, v. 10, p. 143-160, 2010.

254 SNAKENBORG, D.; KLANK, H.; KUTTER, J. P. Microstructure fabrication with a CO2 laser system. Journal of Micromechanics and Microengineering, Bristol, v. 14, p. 182, 2003.

265 BADONIYA, P. CO2 laser cutting of different materials–a review. International Journal of Engineering and Technical Research, Rajasthan, v. 5, p. 1-12, 2018.

266 RAVI-KUMAR, S.; LIES, B.; ZHANG, X.; LYU, H.; QIN, H. Laser ablation of polymers: A review. **Polymer International**, Hoboken, v. 68, p. 1391-1401, 2019.

267 MEYVANTSSON, I.; BEEBE, D. J. Cell culture models in microfluidic systems. Annual Review of Analytical Chemistry, Palo Alto, v. 1, p. 423-449, 2008.

268 CHEN, J.; LI, J.; SUN, Y. Microfluidic approaches for cancer cell detection, characterization, and separation. Lab on a Chip, Cambs, v. 12, p. 1753-1767, 2012.

269 GAN, L.M.; MIOCIC, M.; DOROUDI, R.; SELIN-SJ GREN, L.; JERN, S. Distinct regulation of vascular endothelial growth factor in intact human conduit vessels exposed to laminar fluid shear stress and pressure. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, San Diego, v. 272, p. 490-496, 2000.

270 CONKLIN, B. S.; ZHONG, D. S.; ZHAO, W.; LIN, P. H.; CHEN, C. Shear stress regulates occludin and VEGF expression in porcine arterial endothelial cells. **Journal of Surgical Research**, San Diego, v. 102, p. 13-21, 2002.

271 KUREBAYASHI, J.; OTSUKI, T.; MORIYA, T.; SONOO, H. Hypoxia reduces hormone responsiveness of human breast cancer cells. **Japanese Journal of Cancer Research**, Osaka v. 92, p. 1093-1101, 2001.

272 WRAGG, J. W.; DURANT, S.; MCGETTRICK, H. M.; SAMPLE, K. M.; EGGINTON, S.; BICKNELL, R. Shear stress regulated gene expression and angiogenesis in vascular endothelium. **Microcirculation**, Hoboken, v. 21, p. 290-300, 2014.

273 FENG, S.; MAO, S.; ZHANG, Q.; LI, W.; LIN, J. M. Online analysis of drug toxicity to cells with shear stress on an integrated microfluidic chip. **ACS sensors**, Washington, v. 4, p. 521-527, 2019.

274 KLINGBERG, H.; LOFT, S.; ODDERSHEDE, L. B.; M LLER, P. The influence of flow, shear stress and adhesion molecule targeting on gold nanoparticle uptake in human endothelial cells. **Nanoscale**, London, v. 7, p. 11409-11419, 2015.

275 FREESE, C.; SCHREINER, D.; ANSPACH, L.; BANTZ, C.; MASKOS, M.; UNGER, R. E.; KIRKPATRICK, C. J. In vitro investigation of silica nanoparticle uptake into human endothelial cells under physiological cyclic stretch. **Particle and Fibre Toxicology**, London, v. 11, p. 1-12, 2014.

276 SAMBALE, F.; STAHL, F.; BAHNEMANN, D.; SCHEPER, T. In vitro toxicological nanoparticle studies under flow exposure. **Journal of Nanoparticle Research**, Amsterdam, v. 17, p. 1-12, 2015.

277 SAXER, T.; ZUMBUEHL, A. M.; LLER, B. The use of shear stress for targeted drug delivery. **Cardiovascular Research**, Oxford, v. 99, p. 328-333, 2013.

278 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**, London, v. 15, p. 58, 2015.

279 BARATHAN, M.; MARIAPPAN, V.; SHANKAR, E. M.; ABDULLAH, B. J.; GOH, K.L.; VADIVELU, J. Hypericin-photodynamic therapy leads to interleukin-6 secretion by HepG2 cells and their apoptosis via recruitment of BH3 interacting-domain death agonist and caspases. **Cell Death Discorey**, London, v. 4, p. e697, 2013.

280 KIESSLICH, T.; KRAMMER, B.; PLAETZER, K. Cellular mechanisms and prospective applications of hypericin in photodynamic therapy. **Current Medicinal Chemistry**, Sharjah, v. 13, p. 2189-2204, 2006.

281 NOWIS, D.; STOKŁOSA, T.; LEGAT, M.; ISSAT, T.; JAK BISIAK, M.; GOŁĄB, J. The influence of photodynamic therapy on the immune response. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, Amsterdam, v. 2, p. 283-298, 2005.

282 JIANG, S.; GAO, Y.; YU, Q.H.; LI, M.; CHENG, X.; HU, S.B.; SONG, Z.F.; ZHENG, Q.C. P-21-activated kinase 1 contributes to tumor angiogenesis upon photodynamic therapy via the HIF- 1α /VEGF pathway. **Biochemical and biophysical research communications**, Amsterdam, v. 526, p. 98-104, 2020.