



**Universidade de Brasília – UnB
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-graduação em Biologia Animal**

**FOTOTOXICIDADE DE NANOEMULSÃO DE EXTRATO DE CRAJIRU
(*Arrabidaea chica*) EM LINHAGEM DE CÉLULAS DE ADENOCARCINOMA
MAMÁRIO MURINO (4T1)**

RENATA CARVALHO SILVA

2013



Universidade de Brasília – UnB
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-graduação em Biologia Animal

**FOTOTOXICIDADE DE NANOEMULSÃO DE EXTRATO DE CRAJIRU
(*Arrabidaea chica*) EM LINHAGEM DE CÉLULAS DE ADENOCARCINOMA
MAMÁRIO MURINO (4T1)**

Orientadora: Profa. Dra. Carolina Madeira Lucci

Tese de Doutorado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, como parte integrante dos requisitos para a obtenção do Título de Doutor em Biologia Animal.

2013

DEDICATÓRIA

Sem dúvidas, dedicarei à natureza e ao novo cenário nacional de mudanças, que aparentam ser positivas e relevantes para o progresso do país.

“A história demonstra que a natureza supriu integralmente as necessidades humanas. A ilusão do homem moderno, de que a vida é viável em circunstâncias artificiais, tem sido a principal gênese da doença e do desequilíbrio bio-social. A reintegração com o meio ambiente, por meio do desenvolvimento sustentável, pode reabilitar a saúde integral, como domínio da vida e da natureza”.

In memoriam Vanderlei de Castro

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha orientadora, a Doutora Carolina Madeira Lucci pela excelente profissional que és, pela amizade e pela paciência. Especialmente nessa ocasião eu digo: "As coisas que queremos e parecem impossíveis só podem ser conseguidas com uma teimosia pacífica" (Mahatma Gandhi). Eu não sou teimosa. Teimosos são aqueles que teimam comigo.

Agradeço ao meu ex-chefe, líder e amigo, o Doutor Ricardo Bentes de Azevedo, pela autenticidade e profissionalismo. "Liderança é a capacidade de conseguir que as pessoas façam o que não querem fazer e gostem de fazê-lo" (Harry Truman). "Todos os cientistas têm, pelo menos, um ou dois parafusos a menos. Pois assim as ideias podem fluir livremente" (Pedro Martins).

Um agradecimento muito especial ao meu colaborador, amigo e professor, o Doutor João Paulo Figueró Longo, pelo alicerce, pelos ensinamentos, pela paciência (ou a falta dela, na maioria das vezes), pelas sugestões abrilhantadas e por ter sido o maior responsável pela concretização dessa Tese de doutorado e pela minha decisão em ingressar no Inmetro. "A tarefa essencial do professor é despertar a alegria de trabalhar e de conhecer!" (Albert Einstein). "As mulheres podem tornar-se facilmente amigas de um homem, mas para manter essa amizade, torna-se indispensável o concurso de uma pequena antipatia física" (Friedrich Nietzsche).

Um segundo agradecimento especial ao meu colaborador, amigo e empresário, o Doutor Luis Muehlmann pela arte de ser inteligente. "O Farmacêutico não facilita discussões, catalisa substratos, não tem reflexos, tem mensagem neurotransmitida involuntária" (autor desconhecido). "A verdade não tem que ser aceita com fé. Os cientistas não seguram suas mãos todo domingo, cantando, Sim a gravidade é real! Eu vou ter fé! Eu vou ser forte! Amém" (autor desconhecido).

À Professora e vice-reitora da Universidade de Brasília, a Doutora Sônia Nair Bào por disponibilizar o Laboratório de Microscopia Eletrônica, pela competência na qual me inspiro e por ser responsável por grande parte do meu aprendizado na vida profissional, principalmente no que diz respeito ao meu ingresso no Inmetro. E repito: "Sob a direção de um forte general, não haverá jamais soldados fracos" (Sócrates).

Aos meus amigos do Reprounb, principalmente ao médico veterinário José Luiz Jivago de Paula Rôlo, pela parceria. Quando há parceria, não existe dominação.

Aos meus antigos amigos brasilienses e aos meus novos amigos cariocas e paulistas que sempre me suportaram nas horas mais estressantes. A parceria é forte, a curtidão é louca e a amizade é eterna! (Césa (Burns) Palhares).

À minha família pelo amor incondicional, pelo apoio ao meu novo estilo de vida e pela graça de viver “A verdadeira família é aquela unida pelo espírito e não pelo sangue” (Luiz Gasparetto).

À CAPES e ao CNPq pela bolsa concedida, e à FINATEC, FAP-DF, PPG Animal e INCT Nanobiotecnologia pelo financiamento do projeto. “O dinheiro não tem a mínima importância desde que a gente tenha muito” (Truman Capote).

RESUMO

A terapia fotodinâmica (TFD) é uma terapia alternativa a cura de diversas doenças, entre elas o câncer. Um novo conjunto de fármacos fotossensibilizantes (FS) de origem natural oriunda de extratos e óleos vegetais tem sido testado na terapia contra o câncer. Porém, a maioria desses fármacos FS apresentam alguns entraves para uso clínico e nesse contexto, as nanoemulsões poliméricas, sistemas cineticamente estáveis, apresentam diversas potencialidades como sistemas carreadores de fármacos. O objetivo do presente estudo foi identificar e avaliar as possíveis propriedades fotoquímicas e fotofísicas do extrato clorofórmico de partes aéreas de cajuru (*Arrabidaea chica*) livre (ECr) e incorporado em nanoemulsão polimérica (NanoECr) e testar os efeitos da nanoemulsão na TFD contra células de adenocarcinoma mamário murino (4T1) *in vitro*. Por análises no espectrofotômetro, tanto o ECr quanto a NanoECr apresentaram absorvância em comprimento de onda de 670 nm e fluorescência em 690 nm e apresentaram produção de espécies reativas de oxigênio pelo teste de decaimento da absorvância do benzofurano, características fundamentais para serem considerados fármacos úteis em TFD. Pela técnica de espalhamento dinâmico da luz, a NanoECr apresentou diâmetro hidrodinâmico médio de $370,5 \pm 264,31$ nm, Pdl de $0,133 \pm 0,01$ e carga de superfície de $-36,1 \pm 0,15$ mV, características que predizem que a formulação é estável. Nas microscopias eletrônicas de transmissão (MET) e varredura (MEV), as NanoECr apresentaram morfologia esférica e superfície rugosa com diâmetros médios de 374 ± 117 nm (MET) e 367 ± 69 nm (MEV antes da metalização) e 488 ± 70 nm (após metalização), sendo a MEV sem metalização o protocolo adequado para caracterização morfométrica dessas nanoestruturas. Após incubação da linhagem celular 4T1 com a NanoECr em várias concentrações na ausência de irradiação, foi determinada, por MTT, a concentração não tóxica ($54 \mu\text{g/mL}$) e em seguida, por espectrofotômetro e microscopia confocal o tempo máximo de interação da NanoECr com a linhagem 4T1 (15 minutos). Associando $54 \mu\text{g/mL}$ de NanoECr, por 15 min com irradiação com laser de comprimento de onda de 670 nm, morte celular ocorreu quando as células foram irradiadas com doses de energia variando entre $8,57 \text{ J/cm}^2$ a $85,7 \text{ J/cm}^2$, e apenas na dose de energia de $85,7 \text{ J/cm}^2$ (maior dose de energia utilizada no experimento) ocorreu 100% de morte celular. Na avaliação do tipo de morte celular, as células irradiadas em doses de energia de $25,7 \text{ J/cm}^2$ apresentaram morte por apoptose, visualizada em microscopia confocal pela intensa marcação em laranja de corpos apoptóticos (laranja de acridina) e pela visualização de *blebs* e danos a mitocôndrias e retículo endoplasmático observados em MET. Já na dose de $85,7 \text{ J/cm}^2$, a necrose foi o tipo de celular ocorrido, observado pela intensa marcação do citoplasma das células em vermelho (brometo de etídeo) em microscopia confocal e por danos a membrana plasmática com extravasamento de conteúdo celular e presença de vacúolos no interior das células observadas em MET. Concluiu-se que o extrato clorofórmico de partes aéreas do cajuru incorporado em nanoemulsões poliméricas de PVM/MA é uma potencial formulação fotossensibilizante para uso em TFD. Além disso, as características desta preparação oferecem a perspectiva de que esta possa ser utilizada como um fotossensibilizante de 3ª geração na TFD.

Palavras-chave: câncer, terapia fotodinâmica, plantas, nanotecnologia, sustentabilidade.

ABSTRACT

Photodynamic therapy (PDT) is an alternative therapy to cure a lot of diseases, including cancer. A new set of photosensitizing (PS) drugs arising from natural plants, as vegetable oils and extracts have been tested in cancer therapy. However, most of these PS drugs present some difficulties for clinical use and in this context, polymeric nanoemulsions, kinetically stable systems, have several potential as drug carrier systems. The aim of this study was to identify and evaluate possible photochemical and photophysical properties of the chloroform extract of aerial parts of crajiru (*Arrabidaea chica*) free (ECr) and incorporated in polymeric nanoemulsion (NanoECr) and test the effects of this nanoemulsion in PDT against murine mammary adenocarcinoma cells (4T1) *in vitro*. By spectrophotometer analysis in both the ECr and NanoECr showed absorbance at a wavelength of 670 nm and fluorescence at 690 nm and production of reactive oxygen species by the decay of the absorbance of the test benzofuran, key features to be considered useful drugs in PDT. At the technique of dynamic light scattering, the NanoECr had an average hydrodynamic diameter of 370.5 ± 264.31 nm, Pdl of 0.133 ± 0.01 and surface charge of -36.1 ± 0.15 mV, characteristics that predict the formulation is stable. At transmission electron microscopy (TEM) and scanning electron microscopy (SEM), the NanoECr showed spherical morphology and a rough surface with an average diameter of 374 ± 117 nm (TEM), 367 ± 69 nm (SEM before metallization) and 488 ± 70 nm (SEM after metallization). The SEM without metallization was the most suitable protocol for morphometric characterization of these nanostructures. After incubation of 4T1 cell line with various NanoECr concentrations in the absence of irradiation, non-toxic concentration ($54 \mu\text{g/mL}$) was determined by MTT and then by confocal microscopy and spectrophotometer the maximum time of interaction between NanoECr and 4T1 line (15 minutes) was also determined. Associating $54 \mu\text{g/mL}$ of NanoECr for 15 min and irradiating the cells with a laser of 670 nm wavelength, cell death occurred when the cells were irradiated with energy ranging from 8.57 J/cm^2 to 85.7 J/cm^2 and only on the energy dose of 85.7 J/cm^2 (higher dose of energy used in the experiment) occurred 100 % of cell death. Evaluating the type of cell death, cells irradiated at a energy dose of 25.7 J/cm^2 had death by apoptosis, visualized by intense cytoplasmic staining of the apoptotic bodies with acridine orange in confocal microscopy and a visualization of blebs and mitochondria and endoplasmic reticulum damage observed in TEM. At a energy dose of 85.7 J/cm^2 necrosis was the type of cellular occurred noted by intense staining of cells cytoplasm in red (ethidium bromide) in confocal microscopy and cell membrane damage with leakage of cellular contents and presence of vacuoles inside the cells observed in TEM. We can conclude that the chloroform extract of the aerial parts of crajiru incorporated in polymeric nanoemulsions is a potential photosensitizer formulation for use in PDT. Furthermore, the characteristics of this formulation offer the prospect that it can be used as a 3rd generation photosensitizer in PDT.

Keywords: cancer, photodynamic therapy, plants, nanotechnology, sustainability.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Diagrama de Jablonski representando a excitação e o relaxamento de um fotossensibilizante e os processos fotodinâmicos que levam às reações do tipo I e do tipo II. As barras horizontais representam os níveis energéticos dos diferentes estados de excitação do FS (barras cheias) e do oxigênio molecular (barras vazias). S0 = estado fundamental singlete; S1 = primeiro estado excitado singlete; S2 = segundo estado excitado singlete; T0 = estado fundamental triplete; T1 = primeiro estado excitado triplete; CIS = cruzamento intersistemas. *Adaptado de Bonett (1995)*.....12
- Figura 2:** Janela óptica de absorção dos tecidos biológicos. A faixa vermelha compreende o intervalo entre 600-1300 nm no espectro de luz.....21
- Figura 3:** Folhas e hastes da planta *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl)Verlot. **Fonte:** Fotografia gentilmente cedida pelo Dr. Igor Degterev.....29
- Figura 4:** Desenho esquemático mostrando o número de quadrantes contados para a determinação do cálculo do número total de células. O fator de diluição utilizado foi de 5 (10 µL da suspensão de células para 40 µL da solução de azul de tripan).....41
- Figura 5:** TFD aplicada aos grupos, em quadruplicata. O laser foi disposto de forma que o “spot” iluminava os quatro poços ao mesmo tempo (quadrado vermelho a direita).....47
- Figura 6:** Distribuição do diâmetro hidrodinâmico da NanoECr (A) e da NanoBr (B) e respectivos valores da média do diâmetro hidrodinâmico, Pdi e potencial zeta.....52
- Figura 7:** Caracterização morfométrica da NanoECr por MET e MEV. (A) Comparação entre as curvas de distribuição do tamanho da NanoECr em MET (curva vermelha), MEV antes da metalização (curva azul) e MEV após metalização (curva preta). (B) Eletromicrografia da NanoECr obtida em MET. (C) Eletromicrografia da NanoECr obtida em MEV após metalização, (D) Eletromicrografia da NanoECr obtida em MEV antes da metalização. Note a presença de algumas nanoestruturas aparentemente rompidas (setas). A NanoBr foi analisada apenas em MET, e apresentou muitas nanogotículas com morfologia amorfa e algumas esféricas e todas com elétrondensidades variadas.....53
- Figura 8:** Eletromicrografia da NanoBr em MET.....54
- Figura 9:** Eletromicrografias em MET da NanoECr submetida a diversos testes de estabilidade. A) Temperatura ambiente por 24h. Note as gotículas bem eletrondensas, B) Estufa a 37°C por 24h, mostrando o aspecto granulado das nanoestruturas, C) Congelada a -20°C. Nessa imagem podemos observar estrutura esférica intumescida (seta), D) Centrifugada a 3070 g, E) Centrifugada a 24100 g, F) Submetida a ciclos de resfriamento e aquecimento. Em D-F observam-se nanoestruturas totalmente desintegradas.....57
- Figura 10:** Sobreposição dos espectros de absorção (A) e emissão de fluorescência (B) das dispersões líquidas de ECr (azul), e NanoECr (vermelho). λ ex: 350 nm..58

Figura 11: Espectros de absorvância (380-730 nm) da mistura de NanoECr + benzofurano com irradiação de laser vermelho em diferentes fluências de energia. No pico de 410 nm, observa-se o decaimento da absorvância do benzofurano (primeira linha azul) na medida em que há o aumento da oferta de energia. As diferentes linhas indicam as fluências de energia aplicadas às dispersões líquidas (7,5 J/cm² a 60 J/cm²).....59

Figura 12: Decaimento percentual da absorvância em 410 nm do benzofurano (BF) em função do aumento de energia aplicada às diferentes dispersões líquidas. Em verde a geração de ERO pela ECr, em azul pela NanoECr e em vermelho a manutenção da absorvância do benzofurano quando irradiado na ausência das dispersões.....60

Figura 13: Percentual de viabilidade celular determinada pelo método de MTT após exposição das células NIH 3T3 (barras azuis) e 4T1 (barras vermelhas) à NanoBr em diferentes concentrações por 24h. *Representa diferença significativa em comparação ao controle ($p < 0,05$).....61

Figura 14: Percentual de viabilidade celular determinada pelo método de MTT após exposição das células NIH 3T3 (barras azuis) e 4T1 (barras vermelhas) à NanoECr em diferentes concentrações por 24h. *Representa diferença significativa em comparação ao controle ($p < 0,05$).....62

Figura 15: Perfil de interiorização, *in vitro*, da NanoECr por células 4T1 e NIH 3T3 em diferentes tempos de exposição (0, 5, 15, 30, 60 e 120 min). A quantificação da interiorização foi realizada por meio da leitura da absorvância da NanoECr no sobrenadante da dispersão.....63

Figura 16: Interiorização da NanoECr na concentração de 54 µg/mL pelas células 4T1 após 15 minutos de exposição *in vitro*. (A) Imagem em contraste de fase, (B) Núcleo celular (azul), (C) NanoECr (vermelho) no citoplasma celular, (D) sobreposição de A, B e C.....64

Figura 17: Percentual de viabilidade celular determinada pelo método de MTT após exposição das células NIH 3T3 (barras azuis) e 4T1 (barras vermelhas) à NanoECr por 15 minutos seguida de irradiação em diferentes fluências de energia. *Representa diferença significativa em comparação ao controle ($p < 0,05$). Tempo: 24 h pós terapia. Controle droga = incubada com a NanoECr na ausência de irradiação.....65

Figura 18: Representação gráfica da recuperação das células 4T1 após TFD em diferentes tempos (6, 12, 24 e 48h) pós-terapia. *Representa diferença significativa ($p < 0,05$).....66

Figura 19: Marcação fluorescente com Laranja de Acridina e Brometo de Etídio em linhagem celular de adenocarcinoma mamário murino (4T1). A e B- Controle negativo, sendo, A) Microscopia de Campo Claro e B) Marcação fluorescente. C e D – Controle NanoECr na ausência de irradiação sendo, C) Microscopia de Campo claro e D) marcação fluorescente. Seta branca indica fragmentação celular sugerindo apoptose.....67

Figura 20: Marcação fluorescente com Laranja de Acridina e Brometo de Etídio em linhagem celular de adenocarcinoma mamário murino (4T1), submetido à TFD. A e B – TFD a 25,7J/cm² sendo A) Sobreposição do campo claro com marcação fluorescente e B) Marcação fluorescente. Notar os “blebs” de membrana representados pela

marcação laranja intensa, indicando morte celular por apoptose (setas brancas). C e D - TFD a $85,7\text{J}/\text{cm}^2$ sendo A) Sobreposição do campo claro com marcação fluorescente e B) Marcação fluorescente. Todas as células foram marcadas com brometo de etídio (vermelho) indicando morte celular por necrose.....68

Figura 21: Porcentagem de células 4T1 vivas (barras azuis), apoptóticas (barras laranjas) ou necróticas (barras vermelhas) nos grupos controle, controle NanoECr (incubada com a NanoECr na ausência de irradiação) e nos tratamentos com TFD a $25,7\text{ J}/\text{cm}^2$ e TFD a $85,7\text{ J}/\text{cm}^2$69

Figura 22: Eletromicrografias em MEV de células 4T1. (A) Controle, (B) Célula incubada com NanoECr na ausência de irradiação. Notar a presença de nanoestruturas difusas aderidas à membrana (setas grossas), (C-D) TFD a $25,7\text{J}/\text{cm}^2$. Note a presença de perfurações em algumas regiões da membrana plasmática (setas finas), vistas em maior magnificação na figura C, (E-F) TFD a $85,7\text{J}/\text{cm}^2$. Observa-se desintegração total da membrana plasmática. (F) Detalhe da desintegração de membrana plasmática.....70

Figura 23: Eletromicrografias em MET de células 4T1. (A-B) Controle, (C) Célula irradiada com laser vermelho com fluência energética de $85,7\text{J}/\text{cm}^2$. Note a presença de vesículas eletron-lucentes (setas brancas finas), (D) Célula incubada com NanoECr na concentração na ausência de irradiação mostrando algumas vesículas com material amorfo (setas brancas grossas).....72

Figura 24: Eletromicrografias em MET de células 4T1 submetidas a tratamento com TFD. (A-C) TFD $25,7\text{J}/\text{cm}^2$. A) Mitocôndrias edemaciadas com aspecto lavado (Md) e discreto intumescimento do retículo endoplasmático rugoso (REi). B) *Blebs* (setas pretas) e núcleo irregular, (C) Evidência de um *bleb* (asterisco), (D) TFD $85,7\text{J}/\text{cm}^2$. Podem ser observados liberação de conteúdos citoplasmáticos, restos celulares e vacúolos intracelulares (estrela).....73

Figura 25: Eletromicrografias em MET de células 4T1 após processamento utilizando a metodologia do ósmio-imidazol. (A) Controle, (B) Célula incubada com NanoECr na concentração de $54\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$ no escuro. Note a presença de vesículas elétron-densas com core elétron-lucente. Nu = núcleo da célula.....74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Medicamentos fotossensibilizantes aprovados pelo FDA para uso clínico em TFD.....**15**

Tabela 2: Diferentes concentrações de NanoBr e NanoECr utilizadas para testes de citotoxicidade na ausência de irradiação em linhagens celulares 4T1 e NIH 3T3.....**42**

Tabela 3: Grupos experimentais utilizados para TFD e respectivos tratamentos**46**

Tabela 4 Parâmetros farmacotécnicos da NanoBr após serem submetidas a diferentes testes de estabilidade descritos no item 5.3.3 do material e métodos.....**55**

Tabela 5 Parâmetros farmacotécnicos da NanoCr após serem submetidas a diferentes testes de estabilidade descritos no item 5.3.3 do material e métodos.....**56**

SÍMBOLOS, UNIDADES E FÓRMULAS

Sigla/Abreviatura	Significado
$^1\text{O}_2$	Oxigênio Singlete
4T1	Linhagem celular de adenocarcinoma mamário murino
Abs	Absorbância
ALA	Ácido-5-aminolevulínico
anti-HER	Anticorpo anti- receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano
ATCC	American Type Cell Culture
BF	Benzofurano
<i>BRCA1</i>	Gene Câncer de mama 1
<i>BRCA2</i>	Gene Câncer de mama 2
CaCl_2	Cloreto de cálcio
CIS	Cruzamento intersistemas
DMEM	Modificação do meio Eagle Dulbecco
Ecr	Extrato clorofórmico de crajiru
ERO	Espécie Reativa de Oxigênio
FIA	Fator indutor de apoptose
FDA	Food and Drug Administration
FS	Fotossensibilizante
Hb	Hemoglobina
HER2	Receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano
HpD	Derivados das hematoporfirinas
HPPH	<i>2-[1-hexyloxyethyl]-2-devinyl pyropheophorbide</i>
J/cm^2	Joule por centímetro quadrado
Laser	Amplificação da luz por emissão estimulada de radiação
LED	Diodo emissor de luz
M	Molar
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão

MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
mM	Milimolar
mTHPC	m-tetra hidroxifenil clorina
MTT	Brometo de 3(4,5 dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil-tetrazólio
mV	Milivolts
mW	Miliwatt
Myc	Mielocitomatose
NanoBr	Nanoemulsão polimérica branca
NanoECr	Nanoemulsão polimérica de ECr
NIH3T3	Fibroblasto murino
OsO ₄	Tetróxido de Ósmio
PBS	Tampão fosfato salina
PdI	Índice de polidispersão
PVM/MA	Poli (metil vinil éter co-anidrido maleico)
S	Estado fundamental
S0	Estado fundamental singlete
S1	Primeiro estado excitado singlete
S2	Segundo estado excitado singlete
SFB	Soro Fetal Bovino
SMAC	Segundo ativador de mitocôndrias derivado de caspases
T0	Estado fundamental triplete
T1	Primeiro estado excitado triplete
TFD	Terapia Fotodinâmica
WHO	Organização Mundial da Saúde

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. Câncer de mama	3
2.2. Terapias anticancerígenas convencionais	5
2.3. A Terapia Fotodinâmica (TFD)	9
3. JUSTIFICATIVA	30
4. OBJETIVOS	32
4.1. Objetivos Gerais	32
4.2. Objetivos específicos	32
5. MATERIAL E MÉTODOS	34
5.1. Obtenção do material vegetal	34
5.2. Preparo das nanoemulsões	35
5.3. Caracterização nanoscópica das nanoemulsões	36
5.4. Caracterização fotoquímica e fotofísica do ECr, NanoECr e NanoBr	38
5.5. Citotoxicidade da NanoECr e da NanoBr na ausência de irradiação contra linhagem tumoral (4T1) e normal (NIH 3T3)	40
5.6. Ensaio de Interação da NanoECr com as linhagens celulares	43
5.7. Aplicação da Terapia Fotodinâmica em linhagem 4T1 e NIH3T3	45
5.8. Caracterização do tipo de morte celular por Microscopia Eletrônica e Confocal	48
5.9. Análise estatística	51
6. RESULTADOS	52
6.1. Caracterização das nanoemulsões	52
6.2. Testes de estabilidade	54
6.3. Espectros de Absorbância e Fluorescência das Suspensões líquidas de ECr, NanoECr e NanoBr	58
6.4. Capacidade de Geração de Oxigênio Singlete pelo método de decaimento de Benzofurano	58
6.5. Citotoxicidade da NanoECr na ausência de irradiação contra 4T1 e NIH 3T3	60
6.6. Interação da NanoECr com as linhagens celulares	62
6.7. Terapia Fotodinâmica in vitro	64

6.8. Indução de morte celular pela Terapia fotodinâmica mediada pela NanoECr	66
7. DISCUSSÃO	75
8. CONCLUSÃO	89
9. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS	91
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	93

1. INTRODUÇÃO

O câncer é hoje um dos principais problemas de saúde mundial, uma vez que é a terceira causa de morte em todo o mundo. O câncer de mama é o segundo tipo mais frequente, atrás apenas dos tumores de pele não melanoma, e o que mais acomete as mulheres, respondendo por 22% dos novos casos de câncer a cada ano [1].

Em geral, as terapias antineoplásicas convencionais como a radioterapia e a quimioterapia são tóxicas para o paciente, pois não diferenciam as células normais das células tumorais. Nesse sentido, a terapia fotodinâmica (TFD) tem se mostrado como uma alternativa menos prejudicial e altamente eficaz para o tratamento de diversos tipos de câncer. É uma terapia que combina o uso de uma molécula fotossensibilizante (FS) com a administração de uma luz em um comprimento de onda específico que ativa o FS para produzir espécies reativas de oxigênio (ERO) resultando em destruição das células de interesse [2].

Porém, esses fármacos FS ainda apresentam alguns entraves para uso clínico. Citam-se a insolubilidade do fármaco em meio aquoso, a degradação prematura após administração e a baixa biodisponibilidade nos tecidos-alvo. Tendo isso em vista, a nanotecnologia, especificamente a que envolve o uso de nanocarreadores, oferece soluções à maioria desses desafios farmacêuticos [3]. Nesse contexto, as nanoemulsões são sistemas cineticamente estáveis e apresentam diversas potencialidades como sistemas carreadores de fármacos, especialmente para aqueles de reduzida hidrossolubilidade [4]. Estudos recentes descrevem a possibilidade de redução de toxicidade, aumento de atividade, janela terapêutica e biodisponibilidade e, em alguns casos, liberação controlada e direcionada de fármacos incorporados nesses sistemas [5].

Recentemente tem-se dado atenção aos medicamentos fitoterápicos. Há séculos, as plantas tem sido fonte primária de fármacos altamente efetivos para o tratamento de diversas doenças, inclusive o câncer [6]. Sendo a biodiversidade vegetal brasileira a maior do mundo, a busca por novas substâncias como potenciais fármacos que sejam mais eficientes e que

possam ser extraídos, ou isolados de plantas comuns a essa biodiversidade se torna atrativa. Dentre essas plantas, uma planta oriunda da Amazônia, a *Arrabidaea chica*, popularmente conhecida como cajiru, vem sendo estudada sobre seus potenciais usos em terapias antineoplásicas. Estudos relataram atividade antitumoral *in vitro* do extrato aquoso das folhas de *Arrabidaea chica* contra células das linhagens Jurkat e HL60 [7], porém o seu potencial fotodinâmico nunca foi verificado.

Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo identificar e avaliar o potencial fotodinâmico de uma nanoemulsão polimérica de extrato de partes aéreas de *Arrabidaea chica* contra células de adenocarcinoma mamário murino (linhagem 4T1) em modelo *in vitro*.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Câncer de mama

Câncer é um termo utilizado para definir doenças em que células alteradas se dividem descontroladamente e são capazes de invadir outros tecidos podendo se espalhar para várias partes do organismo por meio dos sistemas sanguíneo e linfático [8]. É classificado como um conjunto de doenças, sendo mais de 100 os tipos de câncer classificados. Dividindo-se rapidamente, as células cancerosas tendem a ser muito agressivas determinando a formação de neoplasias malignas. Estas propriedades malignas do câncer o diferenciam dos tumores benignos, que são autolimitados em seu crescimento e não invadem tecidos adjacentes, uma vez que se multiplicam lentamente e se assemelham ao seu tecido original, raramente constituindo risco de morte para o paciente [9].

Os fatores de risco que induzem a formação de tumores podem ser encontrados no ambiente físico, ser herdados geneticamente ou representar hábitos ou costumes próprios de um determinado ambiente social. De fato, a exposição frequente a esses fatores, a associação entre eles e a predisposição genética contribuem para o desenvolvimento e progressão descontrolados das células cancerosas [1]. O câncer de mama é uma das formas mais antigas de câncer descritas em humanos e tem sido citado em quase todos os períodos da história. No século XVIII, diferentes teorias sobre a origem do câncer de mama foram desenvolvidas, dentre elas uma importante ligação entre câncer de mama e nódulos linfáticos. A presunção de que o câncer era uma doença localizada levou ao surgimento da abordagem cirúrgica para o seu tratamento. Desde o trabalho de William Halstead em 1882, a mastectomia radical (remoção do tecido mamário, nódulos linfáticos e músculo peitoral) se tornou procedimento padrão durante 100 anos [para revisão veja 10, 11].

Com o avanço da ciência, novas terapias e oportunidades de diagnóstico entraram em uso para o tratamento desse tipo de câncer. A introdução da radiação, no início do século XX, permitiu que o tamanho do tumor fosse reduzido antes da cirurgia e culminou com outro grande avanço na época, o

uso da quimioterapia a partir de 1940 [revisado por 12]. Assim, a combinação dessas duas terapias com a cirurgia forneceu uma poderosa modalidade de tratamento para o câncer de mama.

A descoberta de Betson em 1985 de que a remoção de ovários resultava, em alguns casos, na redução de tumores mamários levou ao conhecimento do papel do estrogênio no crescimento de câncer de mama [para revisão veja 13] e com isso, pesquisas na área farmacêutica para o tratamento baseado nestas informações resultaram no desenvolvimento de inibidores da enzima aromatase e modificadores seletivos de receptores de estrogênio [12]. Um importante passo surgiu em 1988 quando o FDA aprovou o trastuzumabe para o tratamento de um tipo de câncer de mama, o HER2 metastático, tendo um grande impacto na sobrevivência de pacientes com tumores mamários resistentes ou dificilmente tratáveis [14]. ER2/neu (referido como HER2) pertence a uma família de quatro tirosina-quinases receptoras transmembranares que medeiam o crescimento, diferenciação e sobrevivência de células. A superexpressão da proteína HER2, a amplificação do gene HER2, ou ambos ocorrem em aproximadamente 15 a 25% dos cânceres da mama, e estão associados com o comportamento agressivo no tumor [15].

Com a introdução da mamografia, detecções precoces se tornaram possíveis e a combinação dela com as terapias já descritas tem mostrado redução da mortalidade entre 24,9 e 38,3% [16]. Muitos outros métodos de detecção, incluindo ressonância magnética, ultrassom, mamografia digital foram desenvolvidos e estão sendo utilizados para o diagnóstico precoce do câncer de mama [17, 18].

Apesar dessa evolução no diagnóstico, atualmente o câncer de mama é ainda o segundo tipo mais frequente (excluindo os de pele não-melanoma) no mundo e o mais comum entre as mulheres respondendo por 22% dos novos casos de câncer a cada ano. No Brasil, as taxas de mortalidade por câncer de mama continuam elevadas (em torno de 40%) muito provavelmente porque a doença ainda é diagnosticada em estádios avançados. A taxa de sobrevida de 5 anos para câncer de mama localizado é >95%, mas cai para 78% em casos de espalhamento regional e para 23% em casos metastáticos [1].

Na população mundial a sobrevida média após 5 anos é de 61% [9]. Estatísticas indicam aumento de sua incidência tanto nos países desenvolvidos

quanto nos países em desenvolvimento. No Brasil, no ano atual, esperam-se 52.680 casos novos de câncer da mama com um risco estimado de 52 casos a cada 100 mil mulheres [9] e nos Estados Unidos, o Instituto Nacional da saúde (NIH) estimou em 2013, 226.870 novos casos com 39.510 casos resultando em mortes [19].

A idade continua sendo o principal fator de risco para o câncer de mama, sendo que as taxas de incidência aumentam rapidamente até os 50 anos e, posteriormente, sofrem uma diminuição. Contudo, outros fatores de risco já estão bem estabelecidos, entre eles, aqueles relacionados à vida reprodutiva da mulher (menarca precoce, nuliparidade, idade da primeira gestação a termo acima dos 30 anos, uso de anticoncepcionais orais, menopausa tardia e terapia de reposição hormonal), alta densidade do tecido mamário (razão entre o tecido glandular e o tecido adiposo da mama) [20] e histórico familiar/hereditariedade (ex. mutações nos genes supressores de tumor *BRCA1*, *BRCA2* e *p53*) [8].

O câncer de mama não é uma doença única e sim um grupo heterogêneo de doenças com diferentes patologias, características biológicas e comportamentos clínicos [20-23]. Os tumores de distintos subtipos seguem diferentes cursos clínicos e respondem variavelmente aos tratamentos existentes [24]. Por isso, o conhecimento da classificação e principalmente do estágio de desenvolvimento em que o tumor de mama se encontra é fundamental e determinante para a escolha da abordagem terapêutica a ser aplicada.

2.2. Terapias anticancerígenas convencionais

A cirurgia é a abordagem mais utilizada para o tratamento do câncer de mama por meio da remoção do tumor ou do órgão inteiro. Caso a remoção cirúrgica do tumor não seja uma opção possível ou praticável, resta aos oncologistas outras terapias convencionais como radioterapia, quimioterapia, imunoterapia, terapia hormonal ou a combinação entre elas, a fim de eliminar as lesões cancerosas destruindo as células tumorais de forma seletiva. Apesar

de muitos tumores responderem inicialmente a esses tratamentos, recidivas são comuns em células que se tornam resistentes [25] e essa inabilidade em impedir a resistência de células cancerosas ou de evitar o desenvolvimento de metástases que resultam em morte do paciente representa um dos principais problemas clínicos do câncer de mama [12, 26]. Além disso, todas essas terapias apresentam efeitos adversos ao paciente e alguns deles serão discutidos a seguir.

2.2.1. Cirurgia

Desde o final do século XIX, a cirurgia tem sido o tratamento tradicional do câncer de mama, e a mastectomia radical clássica permaneceu como o tratamento de escolha por aproximadamente 100 anos [para revisão veja 10, 27].

A mastectomia possui um caráter agressivo, mutilante e traumatizante para a vida e saúde da mulher já que prejudica sua dimensão bio-psicossocio-espiritual. Ademais, proporciona alterações em sua imagem corporal, identidade e autoestima, podendo repercutir na expressão de sua sexualidade e também despertar sintomas de depressão e ansiedade [28]. Além disso, complicações durante a anestesia, infecções, e imunossupressão também podem ocorrer após a remoção cirúrgica de tumores de mama. Ainda, a remoção do tumor primário pode estimular o desenvolvimento de metástase [29, 30], o que está diretamente associado a uma pior sobrevida do paciente.

2.2.2. Radioterapia

A radioterapia, terapia que utiliza raios-X de alta energia para matar as células cancerosas tem sofrido avanços tecnológicos nos últimos 20 anos, mas sua utilização na terapia contra o câncer de mama era limitado até recentemente. Geralmente ela é aplicada após uma lumpectomia (remoção do tumor com uma quantidade mínima de tecido circundante normal) no intuito de eliminar células de câncer de mama remanescentes, e após mastectomia radical quando as chances de recidivas forem grandes [12]. Estudos clínicos

revelam que a radioterapia adjuvante reduz o risco de recorrência local e o número de mortes de pessoas com tumores de mama menores do que 5 cm e nódulo-positivos. Além disso, a radioterapia associada a fármacos como o tamoxifeno tem melhorado o controle e a sobrevivência de pacientes nódulo-positivos pós-menopausa após mastectomia [31].

Porém, a radioterapia apresenta potenciais desvantagens. Apesar de grandes melhorias alcançadas em reduzir os efeitos adversos graves como queimaduras na pele e cicatrizes, outros efeitos como cansaço, alterações cutâneas locais (prurido, dor, inchaço), náuseas e vômitos são manifestados e permanecem por algumas semanas. Mais recentemente foi relatado que a radioterapia reduz a habilidade do sistema imune em rejeitar a massa tumoral [32] e a sua eficiência terapêutica para tumores sólidos em regiões de baixa oxigenação é limitada devido à resistência das células hipóxicas à radiação ionizante [33].

2.2.3. Quimioterapia

A quimioterapia é um tratamento que se baseia na aplicação sistêmica de fármacos antineoplásicos que podem destruir as células tumorais cancerosas ou inibir o seu crescimento. No geral, ela afeta as células em divisão rápida interferindo na divisão celular de várias maneiras, por exemplo, impedindo a duplicação de DNA [8]. Muitos especialistas recomendam a cirurgia seguida de quimioterapia (terapia adjuvante) para eliminar as células cancerosas que se espalharam além do tecido mamário ou ainda como terapia neoadjuvante antes da cirurgia se o tumor mamário for grande, envolver nódulos linfáticos, estiver aderido aos músculos da parede peitoral ou em casos de câncer de mama inflamatório [12].

Uma grande limitação da utilização desses agentes (ex: doxorrubicina, cisplatina, paclitaxel, entre outros) se resume ao fato de que a rápida eliminação e distribuição ampla em órgãos e tecidos requerem a administração do fármaco em concentrações muito altas, e frequentemente resulta em aumento de toxicidade para o paciente, além de ser oneroso [34]. Ademais, a quimioterapia tem o potencial de ser tóxica para os tecidos saudáveis,

especialmente aqueles com uma taxa de renovação elevada (por exemplo, a mucosa intestinal), uma vez que tem como alvo todas as células que se dividem rapidamente, sem especificidade. Numerosos efeitos adversos incluem dor, diarreia, constipação, feridas na boca, perda de cabelo, náuseas e vômitos e resistência ao fármaco [35].

2.2.4. Imunoterapia e Terapia Hormonal

A imunoterapia para tratamento de câncer de mama se baseia principalmente no tratamento de cânceres HER2+. Essa oncoproteína é um importante alvo terapêutico para câncer de mama invasivo associado com baixa sobrevida e resistência à quimioterapia [12]. Tratamentos envolvendo a associação do anticorpo monoclonal contra HER2 – Trastuzumabe (Herceptin[®], Roche) com os quimioterápicos docetaxel e sais de platina [36] ou com o paclitaxel e a carboplatina [37, 38] tiveram bons resultados, mas recentemente esse tipo de tumor vem criando resistência a esse complexo terapêutico. O Trastuzumabe tem mostrado benefícios a pacientes com câncer de mama HER2+ metastático quando administrado semanalmente ou a cada três semanas apenas ou ainda em combinação com quimioterapia. Além disso, o trastuzumabe não está associado com os efeitos adversos que ocorrem tipicamente com a quimioterapia, tais como alopecia, mielossupressão, náuseas e vômitos, porém apresenta como efeitos adversos hipersensibilidade e cardiotoxicidade (principalmente insuficiência cardíaca congestiva) [citado por 15].

Já na terapia hormonal, um hormônio sintético bastante utilizado no combate ao câncer de mama é o tamoxifeno. O tamoxifeno é um estrógeno sintético com propriedades estrogênicas agonistas e antagonistas. O fármaco foi originalmente desenvolvido como um contraceptivo oral, mas mostrou ser ineficiente. Subsequentemente, foi descoberto que ele possuía efeito benéfico na redução de metástase de câncer de mama em algumas mulheres, e assim, durante 20 anos ele tem sido usado com esse objetivo e também como terapia adjuvante. Apesar de ser utilizado rotineiramente em clínicas oncológicas, há controvérsias no uso do tamoxifeno e é dito que ele não é uma terapia curativa.

Muitas mulheres já experimentaram recorrência de câncer de mama, com metástase após o seu uso [39].

2.2.5. Terapias Alternativas

Além dessas terapias anticancerígenas, existe uma infinidade de outras abordagens. Conceitos físicos e químicos vêm sendo combinados para garantir maior eficácia terapêutica ou para trabalhar em conjunto para fins de diagnóstico. A aplicação desses conceitos culminou com o desenvolvimento da fototerapia, exposição direta à radiação não ionizante, (luz na faixa do visível e infravermelho próximo) para uso terapêutico e da fotoquimioterapia, na qual há combinação de uma substância química fotossensível com radiações eletromagnéticas não ionizantes [12].

Descobriu-se que o uso de um fármaco fotossensibilizante com a luz associada ao oxigênio criava uma associação com resultado terapêutico altamente efetivo, denominado de Terapia Fotodinâmica (TFD). A grande vantagem dessa abordagem é a combinação de três unidades inofensivas que juntas criam um padrão altamente tóxico para as células de interesse e por isso tem sido aplicada como tratamento a uma variedade de neoplasias malignas. Após o trabalho realizado por Allison, Mang [40], que usou a TFD para controlar câncer de mama resistente às terapias convencionais, ela vem sendo utilizada, principalmente como adjuvante no tratamento de câncer de mama recorrente [12].

2.3. A Terapia Fotodinâmica (TFD)

2.3.1. Histórico e Conceito

As propriedades terapêuticas da luz são conhecidas há milhares de anos, porém foi apenas no século passado que a TFD se estabeleceu. A aplicação terapêutica da TFD em pacientes com câncer começou com os

primeiros experimentos realizados por von Tappeiner & Jesionek [41], que aplicaram eosina topicamente aos carcinomas de células basais antes da iluminação. Mais tarde, von Tappeiner & Jesionek definiram a TFD como uma interação dinâmica entre luz, um agente fotossensibilizante e o oxigênio, resultando em destruição tecidual [citado por 42]. Passaram-se mais de 70 anos até que a TFD pudesse ser reconhecida como terapia anticâncer. Em 1972, Diamond e colaboradores postularam que a combinação das propriedades de localização tumoral e fototoxicidade das porfirinas poderiam ser exploradas com intuito de matar células cancerosas. Um avanço significativo ocorreu quando Dougherty, Grindey [44] reportaram que a administração de derivados das hematoporfirinas (HpD) e luz vermelha erradicavam completamente o crescimento do tumor mamário em camundongos. E já em 1976, Kelly e Snell iniciaram os primeiros ensaios em pacientes humanos com câncer de bexiga. [revisado por 46].

Seguindo esses estudos bem sucedidos, inúmeros ensaios foram iniciados envolvendo uma variedade de cânceres e fotossensibilizantes. Isso resultou em aprovação da TFD utilizando porfímero sódico (Photofrin[®]; Axcan Pharma Inc., Mont-Saint-Hilaire, Canada) para o tratamento de câncer de bexiga no Canadá em 1993. Atualmente, outros fotossensibilizantes já foram aprovados para uso clínico: o ácido-5-aminolevulínico (ALA, Levulan[®]; DUSA Pharmaceuticals Inc., Wilmington, MA), o metil ester do ALA (Metvix[®], Photocure ASA, Oslo, Norway), e a meso-tetra (hidroxifenil)clorina (mTHPC, temoporfin, Foscan[®]; Biolitec Pharma Ltd., Dublin, Ireland) e a partir daí a TFD começou a se estabelecer como modalidade terapêutica para cânceres localizados. A TFD tem sido testada clinicamente para tratar câncer de cabeça, pescoço, cérebro, pulmão, pâncreas, cavidade intraperitoneal, mama, próstata e pele [revisado por 46].

A TFD pode ser definida como a administração de um fotossensibilizante (FS), por via sistêmica, local ou tópica, a um paciente que possua uma lesão-alvo [47, 48] seguida de iluminação desse alvo com luz de comprimento de onda específico resultando em danos oxidativos às células e/ou tecidos de interesse [49]. Os FS são as moléculas centrais na transferência e translação

da energia proveniente da luz para as reações químicas oxidativas típicas da TFD [50].

2.3.2. Mecanismo de ação da TFD

A ativação de FS mediante absorção de luz os transforma do seu estado fundamental (S) para um estado singlete excitado (S1). Deste estado o FS pode decair diretamente para seu estado fundamental pela emissão de fluorescência, a qual é uma propriedade que pode ser usada clinicamente para o diagnóstico por fotodeteção [51]. No entanto, para obter um efeito fotodinâmico, o FS pode sofrer conversão para o estado triplete excitado (T1) para estabelecer novamente o equilíbrio. A molécula excitada pode reagir diretamente com o substrato por meio da transferência de prótons ou elétrons para formar radicais ou íons radicais que por sua vez podem interagir com o oxigênio para produzir produtos oxigenados (reação tipo I - Figura 1). Alternativamente, a energia do FS excitado em estado triplete pode ser diretamente transferida para o oxigênio, que naturalmente se encontra no estado triplete, para formar o oxigênio singlete (1O_2) (reação tipo II - Figura 1) que é a espécie reativa mais agressiva gerada durante a TFD [52]. Ambas as reações, tipo I e tipo II, ocorrem simultaneamente e a razão entre esses dois processos depende do tipo de FS utilizado, das concentrações de substrato e de oxigênio e da afinidade do FS pelo substrato. Pela alta reatividade e meia-vida curta das ERO, apenas células próximas às áreas da produção de ERO (área de localização do FS) são diretamente afetadas pela TFD [53].

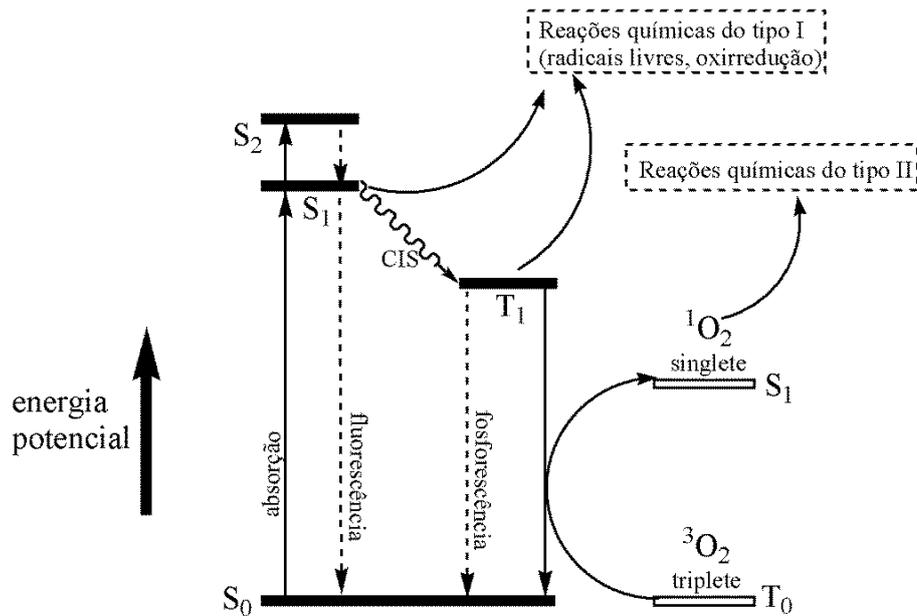


Figura 1: Diagrama de Jablonski representando a excitação e o relaxamento de um fotossensibilizante e os processos fotodinâmicos que levam às reações do tipo I e do tipo II. As barras horizontais representam os níveis energéticos dos diferentes estados de excitação do FS (barras cheias) e do oxigênio molecular (barras vazias). S_0 = estado fundamental singlete; S_1 = primeiro estado excitado singlete; S_2 = segundo estado excitado singlete; T_0 = estado fundamental triplete; T_1 = primeiro estado excitado triplete; CIS = cruzamento intersistemas. *Adaptado de Bonett (1995).*

São três os principais mecanismos pelos quais a TFD medeia a destruição tumoral [54]. No primeiro caso, a ERO que é gerada pode eliminar as células tumorais diretamente por indução de morte celular por necrose, apoptose ou autofagia [46]. Porém, a erradicação do tumor nem sempre é realizada por este mecanismo sozinho, por muitas razões: uma delas é a distribuição não homogênea do FS dentro do tumor. Estudos em animais [55, 56] e dados clínicos em humanos [57] tem demonstrado que a concentração do FS no tumor no momento da iluminação é um bom indicador de sucesso da TFD [56, 58-60]. Seguindo esse raciocínio, a morte do tumor pode ocorrer por dano à vasculatura tumoral e de vasos sadios circundantes, resultando em morte indireta do tumor via indução de hipoxia. Um terceiro mecanismo é que a TFD é capaz de iniciar uma resposta imune contra as células tumorais remanescentes [61].

Um parâmetro que pode limitar a destruição de células tumorais diretamente é a disponibilidade de oxigênio dentro do tecido que é

alvo da TFD, já que o efeito causado por quase todos os fármacos utilizados em TFD é oxigênio-dependente e, portanto a fotossensibilização tipicamente não ocorre em áreas anóxicas do tecido [62]. Essa escassez de oxigênio pode surgir como resultado do consumo fotoquímico de oxigênio durante o processo fotodinâmico, bem como dos efeitos imediatos da TFD na microvasculatura do tecido. Redução rápida e substancial na tensão de oxigênio nos tecidos durante e após a iluminação do tecido fotossensibilizado têm sido relatados [63, 64]. Existem duas maneiras de superar este problema. Uma é reduzir a taxa de fluência da luz para reduzir a taxa de consumo de oxigênio, e a outra é fracionar entrega da luz da TFD para permitir re-oxigenação do tecido [65, 66].

A extensão da fototoxicidade e da citotoxicidade causada pela TFD é multifatorial e depende do tipo de FS utilizado, da sua localização extracelular e intracelular, da dose total administrada, da taxa de fluência da luz, disponibilidade de oxigênio e do intervalo entre a administração do fármaco e a exposição à luz [54].

2.3.3. Fotossensibilizantes

De forma geral, os FS são substâncias capazes de absorver luz de determinado comprimento de onda e convertê-la em energia útil a fotorreações [67], ou seja, são os responsáveis pela transformação de energia luminosa em energia química, fundamental para a produção de ERO, em especial o oxigênio singlete, os agentes causadores dos efeitos citotóxicos relacionados à TFD. Para serem utilizados na TFD, os FS devem apresentar outras características fundamentais [50, 67-69], sejam elas:

- apresentar toxicidade baixa às células saudáveis do paciente;
- ter a capacidade de se acumular no sítio-alvo;

- possuir pico de excitação na faixa do vermelho e infravermelho próximo (600-800 nm);
- ter alta taxa de depuração do organismo após a aplicação da TFD;
- ser efetivo na geração de ERO;
- não provocar fotossensibilização dérmica;
- apresentar custo-efetividade favorável e,
- ser ativo em fluidos biológicos.

Os FS utilizados em TFD são geralmente classificados como porfirínicos ou não porfirínicos. Os compostos não porfirínicos, como as antraciclinas e as cianinas, apresentam aplicação clínica consideravelmente defasada em comparação à dos porfirínicos e, portanto são pouco utilizados [70]. Os derivados da porfirina podem ser classificados como FS de primeira, segunda ou terceira geração. Os de 1º geração incluem os HpD e os porfímeros sódicos [70]. Uma vez que esses compostos apresentam características indesejáveis para TFD como fotossensibilização dérmica prolongada e limitação na absorção de comprimentos de onda longos [49], uma nova classe de FS, denominadas de 2º geração foi desenvolvida nos anos 80 [70].

Essa nova classe, quando comparada à anterior, é quimicamente mais pura, absorve luz em comprimentos de onda maiores e causa menor fotossensibilização dérmica. Como exemplos têm-se as ftalocianinas, as benzoporfirinas (VisudyneTM), clorinas (Temoporfin[®]) e porfínicos [50]. Estes e outros FS já foram aprovados para uso clínico pelo FDA e estão representados na Tabela 1.

Tabela 1: Medicamentos fotossensibilizantes aprovados pelo FDA para uso clínico em TFD.

Família	Precursor Químico	Nome Comercial
Porfirinas	Derivados de hematoporfirina	Photofrin®
	Cloridrato de Aminolevulinato de Metila	Levulan™
	Cloridrato de Aminolevulinato de Metila	Metvix™
	Verteporfirina	Visudyne™
Clorinas	Temoporfina	Foscan™
	Talaprofin	LS11™
	HPPH	Photochlor™
Ftalocianina	Alumínio- -Ftalocianina Sulfonada	Photosens™
Fenotiazinas	Azul de Metileno	Periowave™
	Azul de Toluidina	Helbo™

2.3.4. Fotossensibilizantes de 3º geração: plataformas nanotecnológicas

Apesar dos FS de 2ª geração serem amplamente aceitos e utilizados, eles ainda possuem algumas desvantagens como a fotossensibilização da pele, embora menor que a causada pelos de 1º geração. Porém, esses efeitos adversos podem ser minimizados, quando acoplados a carreadores como anticorpos ou nanoestruturas (lipossomas, nanopartículas poliméricas, nanoemulsões, entre outros). Estes são referidos como FS de 3º geração e atualmente representam uma área ativa de pesquisa no ramo da TFD [70].

Para uma TFD eficaz e segura, é crucial que o FS seja liberado em concentrações terapêuticas para as células alvo, sendo simultaneamente absorvidos apenas em pequenas quantidades por células não-alvo, minimizando assim os efeitos adversos em tecidos saudáveis. Existem alguns obstáculos para se alcançar este objetivo: a maioria dos FS tem uma conformação planar e tendem a ser altamente hidrofóbicos, e, portanto, a maioria forma agregados em ambientes aquosos. Esta agregação diminui a eficácia do FS, que deve estar em sua forma monomérica para ser fotoativo. Em segundo lugar, os FS em geral não tem afinidade específica por células tumorais, o que permite que sejam também difundidos por outros tecidos não afetados [revisado por 71].

Esforços consideráveis têm sido dirigidos à concepção de sistemas de liberação que possam incorporar o FS em sua forma monomérica, sem diminuir a sua atividade e, sem causar quaisquer efeitos nocivos *in vivo*. A nanotecnologia pode superar esses obstáculos promovendo a liberação específica de fármacos ao tecido-alvo. Muitos desses sistemas de liberação são nanoestruturas, como por exemplo, nanoestruturas lipídicas (lipossomas e micelas) que têm sido rotineiramente utilizadas em TFD como veículos carreadores de FS hidrofóbicos antes mesmo da nanotecnologia se tornar uma área especializada [revisado por 71].

Os mecanismos pelos quais essa liberação é realizada são bastante estudados e podem ocorrer de duas maneiras: ativa e passiva. O direcionamento passivo, também conhecido como efeito *EPR* (do inglês, Enhanced permeability and retention effect) se baseia na exploração das características anormais da vasculatura tumoral, como a hipervascularização, arquitetura aberrante, produção extensa de fatores vasculares de permeabilização e drenagem linfática pouco eficaz [72]. A necessidade de uma rápida vascularização para nutrir o rápido crescimento do tecido canceroso, por exemplo, leva a formação de uma arquitetura fraca e defeituosa, com a presença de fenestrações o que, por sua vez, pode ser facilmente acessível aos fármacos quimioterápicos. Alguns fármacos podem ser administrados como pro-fármacos ou fármacos inativos, que, uma vez expostos ao microambiente tumoral, tornam-se ativos. Já o direcionamento ativo, pode ser realizado de duas formas: com aplicação local do FS permitindo que o fármaco

seja administrado diretamente no tecido do tumor, evitando a circulação sistêmica e metabolização por outros sistemas antes de chegar ao alvo pretendido [34] ou na funcionalização de nanoestruturas acopladas a anticorpos contra receptores que sejam específicos ou mais expressados em células tumorais [73].

O emprego de nanocarreadores também permite que os fármacos FS atravessem barreiras biológicas, como as membranas plasmáticas, facilitando a liberação dos fármacos para o interior das células. Ao mesmo tempo, essas nanoformulações garantem estabilidade do fármaco e evitam a sua degradação precoce. Para que esses nanocarreadores sejam candidatos ideais para essas finalidades devem apresentar as seguintes características [revisado por 74]:

- - diâmetro na escala nanométrica (1 a 999 nm);
- - atoxicidade, biodegradabilidade e biocompatibilidade;
- - estabilidade em sistemas biológicos;
- - não ser pró-inflamatório ou recrutar neutrófilos;
- - ser de fácil manuseio e preparo;
- - ter um custo baixo.

Dentre as nanoestruturas utilizadas em TFD, as nanoemulsões poliméricas são promissoras como uma opção terapêutica de liberação de fármacos, pois são fáceis de preparar e termodinamicamente estáveis. A biocompatibilidade das matérias-primas empregadas para a sua obtenção (óleos de origem natural ou semissintética e fosfolipídeos) torna estes sistemas uma alternativa promissora para a administração de diversos tipos de moléculas. Nanoemulsões podem ser definidas como sistemas heterogêneos nos quais um líquido (a fase interna) é disperso em outro (a fase externa) na forma de gotículas, na presença de um agente emulsificante e estabilizado por polímeros. Suas propriedades físico-químicas, influenciadas pela composição quali - e quantitativa e pelas condições de preparação, devem ser estritamente controladas, visando à administração por via parenteral e a estabilidade do

sistema [para revisão veja 4]. Geralmente as nanogotículas em suspensões estáveis exibem tamanhos entre 50 e 500 nm, são opticamente transparentes mesmo em concentrações altas, apresentam bom transporte por difusão, boa elasticidade e estabilidade e podem ser armazenados sem a ocorrência de sedimentação ou coalescência de gotículas. [75]. Essas características são favoráveis para que essas nanoestruturas sejam utilizadas na indústria farmacêutica [76].

O emprego de nanoemulsões poliméricas em TFD é geralmente usado em aplicações tópicas do FS na pele ou em outras superfícies mucosas. Vários métodos para aumentar a absorção e penetração através da pele têm sido intensivamente investigados. Primo, Bentley [77] formularam o FOSCAN (meta-tetrahydroxyphenyl clorina, mTHPC) (Scotia Pharmaceuticals Ltd., Guilford, Surrey, Reino Unido) em uma nanoemulsão composta de fosfatidilcolina de soja Epikuron 170/Tween 80 e surfactantes não iônicos 188/Span Poloxamer® 80 e demonstraram que essa formulação possui um excelente transporte transdérmico após 6 h da aplicação. O mesmo grupo também investigou uma nanoemulsão magnética constituída por tensoativos biodegradáveis e fluidos magnéticos biocompatíveis de cobalto-ferrita cobertos com citrato para encapsular ZnPc com a intenção de combinar TFD e magnetohipertermia para produzir a morte celular sinérgica. Outros estudos usaram nanoemulsão composta de partículas de lecitina de ovo de 30 nm para aumentar a liberação de ALA através de um modelo *ex vivo* de pele de espessura total [revisado por 71].

Estudos têm demonstrado que nanoemulsões poliméricas podem aumentar a liberação preferencial de FS a células tumorais e, conseqüentemente, diminuir os efeitos secundários tóxicos da TFD por diferentes vias de administração [4, 75]. A adição de polímeros hidrofílicos às nanoemulsões pode resultar no prolongamento do tempo de circulação das emulsões na corrente sanguínea e menor biodistribuição, o que pode ser atribuído à barreira estérica formada pelos polímeros em relação às proteínas [5, 78], além de reduzir a tensão interfacial e/ou aumentar a repulsão entre as gotículas [79]. Nanoestruturas compostas de polímeros como o Poli (metil vinil

eter co-anidrido maleico) ou PVM/MA têm demonstrado biocompatibilidade, biodegradabilidade e segurança [80].

2.3.5. Fontes de luz

Os sistemas de luz mais utilizados são o LED (*Light Emitted Diode*) e o Laser (*Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*). O sistema de luz LED é formado por um componente de diodo, que por definição é um dispositivo que permite a passagem de corrente elétrica, e por um composto ativo que quando excitado por corrente elétrica emite luz por meio de um fenômeno conhecido como eletroluminescência. A luz emitida pela fonte LED não é monocromática como na luz laser, porém está contida em uma faixa estreita do espectro luminoso [81].

A luz laser possui algumas características que a diferenciam de outras fontes luminosas, entre elas destacam-se a monocromaticidade (compostos de fótons de mesmo comprimento de onda ou cor), colimação (os feixes de luz são paralelos, permitindo que uma grande quantidade de energia seja transmitida a um alvo preciso) e coerência (sincronização das ondas de luz no espaço e no tempo), além de possuir uma alta potência de saída e compatibilidade com fibras ópticas [82].

Historicamente, os lasers de argônio e os lasers de vapor de metal eram escolhas iniciais para a TFD. Atualmente, além dos lasers, lâmpadas têm sido utilizadas nas clínicas que trabalham com a TFD por possuírem manutenção mais rápida, fácil e barata, como os filamentos de tungstênio, arcos de xenônio e as lâmpadas fluorescentes [83].

As lâmpadas fornecem um amplo espectro de comprimentos de onda podendo assim ser utilizadas com diversos FS com diferentes espectros máximos de absorção. Porém, essas lâmpadas possuem taxas reduzidas de fluência de energia, uma limitação, já que isso resulta em aumento no tempo requerido para o tratamento. No caso de lesões bem superficiais, alguns pesquisadores limitam as taxas de fluência para valores entre 100–300 mW/cm² para evitar efeitos térmicos e dessa forma o uso das lâmpadas não necessariamente se torna limitante nesses casos [83].

A poderosa fonte de luz monocromática fornecida pelos lasers reduz o tempo de entrega de luz necessária para a TFD e por isso ela pode ser utilizada para outros tipos de câncer menos superficiais. Por outro lado, é crucial que seu espectro seja compatível com o do FS a ser utilizado, de forma que um laser pode ser utilizado em combinação com apenas um (ou um número limitado) de FS [83].

Dito isso, os lasers ainda são as escolhas primárias para tratamento da maioria das malignidades, em especial aquelas localizadas em regiões que só podem ser alcançadas com fibras ópticas. A qualidade do feixe de luz, acessórios ópticos de alta qualidade e potência de saída são características que fazem dos lasers a única opção real se a fonte de luz for acoplada a fibras ópticas com núcleos menores que 500 μm de diâmetro. Pela possibilidade de se utilizar difusores de luz com diferentes formatos e microlentes para produzir feixes colimados, os lasers são ideais para iluminação direta em lesões localizadas em sítios acessíveis (pele ou cavidade oral) [83].

Por fim, o avanço tecnológico na fabricação de LED tem permitido que ele seja utilizado como fonte luz na TFD. A potência de saída pode fornecer taxas de fluência um pouco maiores que 150 mW/cm^2 e irradiação de uma área em torno de 20 cm^2 . Apesar dessa potência ainda ser uma limitação, o LED apresenta duas características vantajosas para uso: preço e versatilidade. Das fontes já citadas ele é o mais barato, tem capacidade de irradiar grandes áreas, pode ser ligado a baterias tornando-o portátil e pode ser fabricado em diferentes formas geométricas para irradiação de áreas anatômicas complicadas (câncer de pele não melanômico localizadas em grandes curvaturas) [51, 83].

2.3.6. Princípios ópticos em TFD

A escolha das fontes de luz assim como dos FS é especificamente moldada tanto pelas limitações ópticas dos tecidos biológicos quanto pela energia necessária para a ocorrência das fotorreações. O FS deve sofrer excitação com luz de comprimento de onda entre 600 e 800 nm [67-69]. Essa limitação óptica imposta por tecidos biológicos decorre tanto da dispersão da

luz quanto da presença no organismo de altas concentrações de moléculas como a hemoglobina, a mioglobina, a melanina e os citocromos as quais absorvem intensamente a luz visível com comprimento de onda inferior a 600 nm [84]. O espectro de absorção dessas moléculas define o que chamamos de janela óptica para a TFD [85, 86] (Figura 2).

Além disso, o efeito da profundidade de penetração possui grande relevância no tratamento clínico. Por exemplo, em comprimento de onda de 630 nm, absorvido pelo HpD, a profundidade de penetração da luz é de aproximadamente 3 a 5 mm dependendo do tecido. Em comparação, o uso de FS com pico de absorção >700 nm praticamente dobra o poder da profundidade de penetração da luz permitindo tratamento de tumores mais espessos [87, 88]. Porém, existe um limite de comprimento de onda que pode ser trabalhado na TFD, já que comprimentos de onda muito grandes (acima de 1000 nm), além de serem absorvidos pela água (Figura 2), possuem baixa energia e com isso se tornam ineficazes em produzir ERO [89], conceito denominado de janela fotodinâmica.

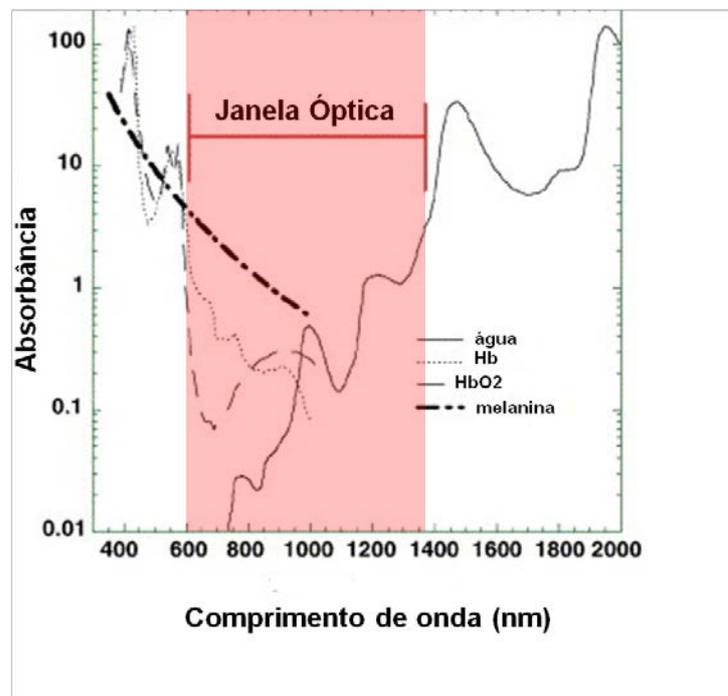


Figura 2: Janela óptica de absorção dos tecidos biológicos. A faixa vermelha compreende o intervalo entre 600-1300 nm no espectro de luz. *Adaptado de Hamblin et al (2006).*

A outra característica gerada a partir dessa iluminação, a fluorescência, é clinicamente valiosa já que o seu emprego permite que regiões do tumor benigno ou maligno sejam detectadas e distinguidas entre si e entre regiões de tecido normal (biopsia óptica ou diagnóstico fotodinâmico) [90] sem necessidade de avaliações histológicas [91, 92]. Além disso, a fluorescência emitida pode ser útil, não apenas para detecção de tumores, como também na estimativa do tamanho do tumor e na determinação da concentração de FS. Como consequência, diferenças na intensidade da fluorescência antes e após o tratamento pode ser utilizado para avaliar o sucesso ou fracasso da terapia aplicada [93]. Mas não se deve esquecer que, quanto mais forte for a intensidade da fluorescência de um FS, menor é o seu efeito como agente fotodinâmico [94].

2.3.7. Vantagens da TFD

Estudos *in vivo* têm demonstrado que a TFD apresenta resultados tão apropriados quanto os obtidos com a cirurgia ou a radioterapia no tratamento contra o câncer, mas ao contrário dessas duas técnicas, a TFD pode ainda levar à ativação do sistema imunitário, gerando respostas específicas para cada tipo de malignidade [61]. Além disso, é um tratamento pouco invasivo e pode ser aplicado antes ou depois da quimioterapia, radiação ionizante ou cirurgia sem comprometer esses tratamentos ou ser comprometido por eles [95]. Ademais, o FS pode ser administrado de maneiras diversas, como injeção intravenosa ou aplicação tópica, podendo a sua ativação ser controlada pelo tempo de exposição do FS à luz [96].

A administração tópica do FS na TFD é bem tolerada e leva a um excelente resultado estético com efeitos adversos mínimos [97]. Por isso ela vem sendo utilizada para diversas condições pré-malignas, tais como a displasia de mucosa e carcinoma *in situ* e o seu excelente resultado cosmético o torna valioso para lesões de pele e para as lesões da cabeça, pescoço e cavidade oral [95]. Isso porque apesar de ulceração da área iluminada

acontecer imediatamente após o tratamento, resulta em fibrose mínima, com recuperação funcional do tecido sem formação de cicatriz. Dessa forma, a TFD permite que haja regeneração da matriz do tecido normal sem prejudicar o colágeno e a elastina subepiteliais com preservação de elementos de suporte não-celulares [98, 99].

Outra vantagem é que esse tratamento pode ser repetido no caso de recorrência ou presença de um novo tumor primário na mesma área já tratada e pode ser realizado em ambulatorios. Esse tipo de procedimento é extremamente difícil tanto para cirurgia quanto para a radioterapia por conta dos riscos de dano severo ao tecido normal [51]. A TFD fornece melhor custo-benefício e aumento da expectativa de vida quando comparada a outros tratamentos para essas condições e, diferentemente das técnicas convencionais, não apresenta efeitos adversos prolongados quando utilizada adequadamente [51].

Há pouco tempo, todas essas vantagens eram comprometidas pela baixa penetração da luz nos tecidos corporais e assim era considerado efetivo apenas para cânceres superficiais localizados na pele ou no tecido subcutâneo [100]. Apesar da penetração limitada da luz não poder ser descartada, o uso recente de cateteres e fibras ópticas permitiu a distribuição da luz no espaço tridimensional culminando com irradiações mais bem disseminadas e em massas tumorais maiores [101].

Com a entrega de luz para órgãos ocultos utilizando um endoscópio, a TFD tem sido bem sucedida no tratamento de cânceres tais como os de esôfago e pulmão. Os seus efeitos superficiais podem ainda ser explorados no tratamento de grandes áreas como a pleura e o peritônio onde as doses de radiação curativas convencionais não são toleradas pelo tecido normal adjacente. Além disso, a TFD é a terapia adjuvante ideal quando a ressecção cirúrgica de tumores sólidos pode deixar para trás doença residual microscópica [95]. Por fim, como já mencionado anteriormente, uma vez que os FS são fluorescentes, eles podem ser utilizados para detecção de tumores via diagnóstico fotodinâmico. A hipericina, por exemplo, vem sendo efetivamente utilizada em cistoscopia fluorescente de câncer de bexiga [102].

Em geral, a TFD tem o potencial de ser uma terapia adjuvante ou uma terapia primária a depender de indicações específicas. Ensaios clínicos bem

concebidos que envolvam FS seletivamente localizados e fontes luminosas adequadas contribuem para a utilização rotineira da TFD no tratamento de câncer e outras doenças. Pesquisadores vêm investigando a capacidade de melhorar a especificidade dos FS aos diversos tumores assim como as suas propriedades fotofísicas e fotoquímicas em meio aquoso, conjugando-os a anticorpos associados a tumores ou a nanocarreadores [46]. Aliado a isso, a descoberta de novos fármacos FS também tem sido alvo dos principais centros de pesquisa, como os compostos oriundos de plantas e extratos vegetais.

2.4. Importância das plantas na medicina

A utilização de plantas com finalidades medicamentosas é milenar. Desde a antiguidade as plantas vêm sendo utilizadas pela humanidade com propósitos terapêuticos, sendo que suas propriedades tóxicas ou curativas foram descobertas pelo homem principalmente enquanto este buscava por alimento. Drogas de origem vegetal apresentam alto valor agregado e demonstram um grande potencial no que concerne ao desenvolvimento de novos medicamentos, uma vez que a diversidade química associada à diversidade biológica encontrada em ecossistemas terrestres e aquáticos é um importante aspecto a ser considerado em processos e diretrizes de desenvolvimento de novos biofármacos [103]. As plantas produzem uma gama de substâncias químicas responsáveis pela execução de todas as suas funções desde a comunicação a defesa. Exemplos dessas substâncias são os terpenos que servem para envenenar o solo para inibir concorrentes, e alcaloides que os tornam desagradáveis a insetos e predadores [104]. Isso as torna importante fonte de inúmeros compostos com utilidade não somente na agricultura como também em aplicações médicas.

Mesmo que a obtenção de alguns compostos a partir de plantas apresente potencial terapêutico limitado, estes podem ainda ser utilizados como matéria-prima inicial para a obtenção de produtos semi-sintéticos com atividade farmacológica mais pronunciada. Como exemplos, podem ser citados o desenvolvimento do atracúrio, um relaxante muscular, a partir dos alcaloides do curare obtidos de *Chondrodendron tomentosum*, dos anestésicos locais desenvolvidos a partir da cocaína, *Erytoxylum coca* [105] e do potente

antimalárico artesunato de sódio, produzido por semi-síntese a partir da artemisinina, isolado da *Artemisia annua* [106].

Assim, o extenso repertório de sistemas tradicionais de conhecimento medicinal de várias partes do mundo vem sendo investigado por suas propriedades curativas, inclusive para a terapia anticancerígena. Segundo a Sociedade Americana do Câncer, em média, 559.312 pessoas morrem da doença a cada ano [107], apesar dos esforços para encontrar métodos de controle e cura. As estatísticas divulgadas pela OMS em 2007 e GLOBOCAN indicam que há uma alta probabilidade dos países em desenvolvimento se aproximarem dessas mesmas taxas de incidência do câncer, por causa de mudanças no estilo de vida, do aumento da idade média da população, do uso do tabaco, entre outros [OMS, 108]. Portanto, em um cenário onde a medicina convencional ainda não conseguiu desenvolver técnicas que possam reduzir a incidência de morte por câncer, a medicina complementar e alternativa se torna uma opção [109-111]. Sistemas medicinais como o Unani, a Ayurveda e o sistema chinês de medicina que tiveram origem na Grécia, Índia e China, respectivamente, têm identificado mais de 700 extratos de plantas, assim como preparações farmacêuticas diversas para tratamento ou prevenção de várias doenças, incluindo o câncer [OMS, 112].

Vários desses produtos que ocorrem naturalmente em plantas têm mostrado propriedades quimiopreventivas contra carcinogênese utilizando modelos *in vitro* e animais. Os mecanismos para os efeitos quimiopreventivos de preparações à base de plantas não estão completamente esclarecidos, mas a inibição da ativação de enzimas e outros sistemas enzimáticos, os efeitos protetores de xenobióticos tóxicos, a regulação benéfica de ciclos celulares e vias de sinalização celular têm sido sugeridos [113]. Os exemplos clássicos desses compostos anticancerígenos são os alcaloides vimblastina e vincristina, isolados de *Cataranthus roseus* (Apocynaceae) [114] e, mais recentemente, o taxol. Estes compostos alcançam preços elevados no mercado mundial evidenciando o potencial econômico que uma espécie medicinal pode ter. A descoberta dos taxanos (extraído da casca do *Taxus brevifolia* Taxaceae, *T. canadensis*, *T. baccata*) [115] e as camptotecinas (derivado da casca da madeira da *Camptotheca acuminata* Nyssaceae) [116] na década de 90

representou um marco na pesquisa sobre o câncer por causa de sua eficácia significativa contra tumor sólido. O paclitaxel é aprovado em muitos países para o tratamento de carcinoma da mama e do ovário e tem importante atividade contra câncer de células pulmonares não pequenas [117]. Irinotecano e topotecano são semi-sintéticos da camptotecina, aprovados respectivamente para o tratamento de câncer colo-retal avançado e como quimioterapia de segunda linha em carcinoma de ovário [118]. Outros estudos revelam novos princípios ativos vegetais com atividade antiproliferativa como, por exemplo, substâncias isoladas da *Cephalotaxus harringtonia* e de espécies da família Apocynaceae que têm apresentado eficácia contra leucemias e câncer de mama, respectivamente [119, 120]. Estas formulações trabalham em múltiplas vias bioquímicas e são capazes de influenciar simultaneamente vários órgãos. Mais importante, por não serem sintéticas, a probabilidade de provocar efeito adverso é pequena [121].

À medida que esses princípios ativos são identificados, são isolados e refinados de modo a eliminar agentes tóxicos e contaminações, e as doses terapêutica e tóxica são bem estabelecidas, de modo a determinar de forma precisa a faixa terapêutica e as interações desse fármaco com outros. No entanto, o isolamento e refino de princípios ativos também não são isentos de riscos. Primeiro porque pretende substituir o conhecimento popular tradicional e livre, testado há milênios, por resultados provindos de algumas pesquisas analítico-científicas que muitas vezes são antagônicas. Segundo, porque a simples ideia de extrair princípios ativos despreza os muitos outros elementos existentes na planta que, em estado natural, mantêm suas exatas proporções. Isso poderia introduzir novos efeitos colaterais ou adversos inesperados, devidos à ausência de sinergismo ou antagonismo parcial entre mais de um princípio ativo que apenas seriam encontrados na planta [122]. Por exemplo, o fitoterápico Ginkgo biloba tem cerca de 20 substâncias ativas que respondem juntas pelo efeito terapêutico, sem a totalidade simultânea das quais, o mesmo efeito não se alcança na plenitude [123]. Alguns fitoterápicos são liberados pela ANVISA para uso rotineiro como agentes terapêuticos para as mais diversas enfermidades e já são ofertados pelo Sistema Único de Saúde (SUS) (Anexo 1). Há a perspectiva de que fitoterápicos sejam liberados pela ANVISA para uso em terapias contra o câncer.

2.4.1. Extratos naturais na TFD

O primeiro componente originário de plantas com atividade fotodinâmica descrito foi a clorofila e seus derivados - os feoforbideos, que estão presentes nas folhas verdes, e as filoeritrinas, que se formam no tubo digestivo dos herbívoros [citado por 124]. Outros FS de plantas conhecidos incluem os derivados de antraquinonas vermelhas, a hipericina e a pseudo-hipericina, que são encontrados nas glândulas de folhas, flores e caules do gênero *Hypericum perforatum* (Guttiferae) e muitas outras espécies do mesmo gênero [125]. Entre os metabólitos secundários de plantas, as antraquinonas têm sido extensivamente estudadas no que diz respeito às suas características de absorção de UV/visível e às suas propriedades nas reações de fotossensibilização fotodinâmica [126, 127]. *Heterophyllaea pustulata* Gancho f. (Rubiaceae), uma planta nativa da região montanhosa do noroeste da Argentina e da Bolívia, é uma espécie vegetal fototóxica popularmente conhecida como "cegadera" [128], que tem sido objeto de vários estudos. Dela, já foram identificados nove derivados antraquinônicos [129] com propriedades fotossensibilizantes pela geração 1O_2 [129, 130]. Mais compostos com propriedades fotossensíveis já descritos incluem taninos, glicosídeos, rutina, hiperina, ocatecol peflavite, flavonoides, xantonas, ácidos carboxílicos fenólicos, óleos essenciais, carotenoides, alcanos, derivados de floroglucinol, fitosteróis, ácidos antranílicos, porfirinas (precursores e produtos de degradação de clorofila), entre outros.

A maioria dos FS, inclusive aqueles que estão sendo investigados em ensaios clínicos, compartilha uma estrutura cíclica tetrapirrólica comum [131]. Em adição aos compostos tetrapirrólicos cíclicos que são abundantes na natureza devido à presença da clorofila, outros cromóforos que ocorrem naturalmente, tais como derivados de quinonas, cumarinas, poliacetilenos e tiofenos também considerados FS ativos [132]. A razão para a presença de FS em plantas não é totalmente compreendida. O seu significado ou função na planta podem estar relacionados com mecanismos de defesa contra as pragas e insetos [133].

Alguns desses FS constituintes das plantas têm sido investigados clinicamente para a TFD anticâncer. Uma análise do número de agentes

quimioterápicos e as suas fontes indica que mais de 60% dos FS quimioterápicos aprovados são derivados de compostos naturais [134]. A hipericina, que foi isolada pela primeira vez a partir das flores do gênero *Hypericum*, vem sendo investigada como um potente FS para o tratamento de câncer da nasofaringe e da bexiga via TFD [135]. Um estudo realizado por Ong, Ling [136], avaliou 155 extratos brutos de plantas terrestres da Malásia quanto ao seu potencial fotodinâmico em ensaios celulares *in vitro* e encontrou 30 apresentando potencial fotoatividade e 21 apresentando citotoxicidade apenas após irradiação com luz de comprimento de onda específico e mínima citotoxicidade na ausência de luz – uma importante característica para serem considerados FS propícios para TFD. Outro exemplo é a planta *Hedyotis corymbosa* (Rubiaceae) amplamente utilizada na medicina tradicional chinesa para o tratamento de doenças de pele, hepatite e câncer. Já foi relatado que extratos de *H. corymbosa* apresentaram fototoxicidade significativa em células M21 (linhagem celular humana de câncer de pele) em uma série de testes. Esse estudo demonstrou que os extratos de *H. corymbosa* associados a uma dose pequena luz causa morte por apoptose na linhagem celular M21 [137].

Nesse contexto, a *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) Verlot (Figura 3) é uma planta da família Bignoniaceae que compreende 78 gêneros e 832 espécies [138] que estão distribuídos na América tropical e África [139, 140]. No Brasil, é conhecida também como crajiru, carajurú, capiranga, cipó-cruz, grajirú, crajurú, guarajurupiranga, pariri, piranga, calajouru, karajura, krawiru, sendo comum na Amazônia [141]. As folhas da espécie são utilizadas popularmente na forma de chás para o tratamento de cólicas intestinais, diarreias, anemias, inflamações uterinas, hemorragias, leucemia, icterícia, albuminúria, impingens, micoses e lavagem de ferimentos na pele [142]. Além disso, a propriedade antitumoral do *Arrabidaea chica* vem sendo investigada. Recentemente foi demonstrado *in vitro* que o extrato etanólico do *Arrabidaea chica* possui efeito tóxico em células cancerosas das linhagens Jurkat e HL60 [143]. Já em um estudo *in vivo* (Ribeiro, Melo M [144] foi demonstrado que extratos aquosos e etanólicos de espécies do gênero *Arrabidaea* reduziu o crescimento do tumor sólido de Erlich em camundongos Swiss. A presença destes compostos com ações farmacológicas diversas (antiinflamatórias, antioxidantes, antibacterianas, antiparasitárias, antifúngicas, cosméticas e

antineoplásicas) na composição do *Arrabidaea chica* promoveu o desenvolvimento de trabalhos com o intuito de isolar e estudar esses compostos. Algumas classes de metabólitos secundários oriundos do *Arrabidaea chica* já foram detectadas: antocianidinas, antocianinas, antraquinonas, catequinas, ácidos orgânicos, açúcares redutores, esteróides, xantonas, taninos, flavonoides e flavanonas [145]. Na composição química dos flavonoides são encontrados dois pigmentos de estrutura quinônica, denominados carajurina e carajurona [146]. Porém, até o presente momento, não foi relatado o uso de extratos de espécies do gênero *Arrabidaea* como FS para TFD.



Figura 3: Folhas e hastes da planta *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) Verlot.
Fonte: Fotografia gentilmente cedida pelo Dr. Igor Degterev

Grande parte das moléculas com propriedades FS oriundas de extratos de origem vegetal é insolúvel em meio aquoso e, portanto não viáveis em meios biológicos. A utilização do extrato vegetal de *Arrabidaea chica* sob a forma de nano e/ou macroestruturas pode torná-las compatível com meios aquosos e lhes conferir propriedades farmacocinéticas importantes, melhorando sua aplicação terapêutica. Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi testar a atividade fotodinâmica de uma nanoemulsão polimérica de extratos de crajiru (*Arrabidaea chica*), e verificar *in vitro* a sua atividade anticancerígena contra uma linhagem celular de adenocarcinoma mamário murino.

3. JUSTIFICATIVA

Como mencionado anteriormente, alguns dos agentes utilizados na terapia contra o câncer tem baixa especificidade para as células cancerosas não diferenciando as células normais das células tumorais, o que acarreta em intensa toxicidade sistêmica e efeitos adversos para o organismo. Visto que a TFD baseia-se na destruição localizada do tecido vivo anormal, esses efeitos adversos deixam de ser um agravante. Porém, muitos fármacos utilizados em TFD são solúveis apenas em solventes orgânicos, possuem baixa disponibilidade nos tecidos-alvo, degradação prematura após administração tornando-os fracamente biocompatíveis. Assim, o uso da nanotecnologia, em especial de sistemas nanocarreadores de fármacos, além de os tornarem biocompatíveis, ainda apresentam como uma de suas características o direcionamento de fármacos ao alvo de ação, e por isso seu uso tem crescido largamente. Uma vez que a busca por fármacos anticancerígenos efetivos é um campo de pesquisa muito ativo e sendo o reino vegetal uma rica fonte de substâncias químicas com efeitos tumorais e citotóxicos [147], novos fármacos oriundos de plantas representam uma fonte alternativa para agentes antitumorais e que frequentemente aparentam ser mais efetivos e/ou menos tóxicos [148]. Com isso, a nanoestruturação de extratos medicinais com efeitos fotodinâmicos é uma alternativa para o tratamento de câncer via TFD, entre eles o câncer de mama. Além disso, a continuidade e diversificação de iniciativas e investimentos na bioprospecção dos ativos da biodiversidade vegetal brasileira constituem um instrumento indispensável para que haja utilização sustentável dos diferentes ecossistemas encontrados no território nacional, permitindo a renovação dos recursos naturais para as próximas gerações [149], além de permitir o avanço científico do país, diminuindo a dependência externa na produção de fármacos. Vale ressaltar que o uso de extratos vegetais como fitoterápico além de ser de fabricação simples, a um menor custo, ainda garante que haja sinergismo ou antagonismo parcial entre mais de um princípio ativo encontrado na planta que são os responsáveis pelos efeitos terapêuticos benéficos da formulação. Dessa forma, a utilização de novos fármacos oriundos de plantas da flora brasileira com potencial

fotodinâmico e otimizados por meio da nanotecnologia é uma alternativa para o tratamento de câncer. Além disso, essa iniciativa é de fundamental importância para o desenvolvimento da ciência, tecnologia e inovação do país aliando saúde à sustentabilidade e ao desenvolvimento socioeconômico nacional.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivos Gerais

Identificar e avaliar as possíveis propriedades fotoquímicas e fotofísicas do extrato de partes aéreas de cajuru (*Arrabidaea chica*) livre e incorporado em nanoemulsão e testar os efeitos da nanoemulsão na terapia fotodinâmica contra células de adenocarcinoma mamário murino (4T1) *in vitro*.

4.2. Objetivos específicos

- Avaliar as propriedades fotoquímicas e fotofísicas do extrato clorofórmico de partes aéreas de cajuru livre quanto ao seu potencial fotodinâmico;
- Avaliar as propriedades fotoquímicas e fotofísicas do extrato de partes aéreas de cajuru incorporado em nanoemulsão polimérica quanto ao seu potencial fotodinâmico;
- Verificar a estabilidade das nanoemulsões poliméricas de extrato de partes aéreas de cajuru sob diferentes condições;
- Caracterizar a morfometria de nanoemulsões poliméricas do extrato de partes aéreas de cajuru;
- Avaliar a citotoxicidade da nanoemulsão polimérica de extrato de partes aéreas de cajuru na ausência de irradiação com laser em linhagens celulares cancerosas de adenocarcinoma mamário murino (4T1) e em linhagens celulares normais de fibroblasto murino (NIH3T3);
- Avaliar a citotoxicidade da nanoemulsão polimérica de extrato de partes aéreas de cajuru após irradiação com laser em linhagens celulares cancerosas de

adenocarcinoma mamário murino (4T1) e de fibroblasto murino (NIH3T3) por meio da TFD;

- Qualificar e quantificar o tipo de morte celular induzida pelo tratamento com a TFD.

5. MATERIAL E MÉTODOS

Em um estudo piloto, as propriedades fotodinâmicas de diferentes extratos de partes aéreas de plantas oriundas da Amazônia foram analisadas com o objetivo de encontrar novos compostos FS para uso em TFD.

Para a determinação da atividade fotodinâmica, 15 extratos foram submetidos a análises de absorvância e fluorescência no espectrofotômetro. Aqueles que apresentaram espectros no intervalo da janela óptica (600 a 800 nm) foram processados para o teste de decaimento do benzofurano, que detecta a produção de ERO pela amostra. Dos 15 extratos, 5 apresentaram espectros desejados e apenas 3 a capacidade de produzir ERO. Por fim, o extrato de partes aéreas de *Arrabidaea chica*, vulgarmente conhecida como cajuru apresentou grande poder de produção de ERO e os maiores picos de absorvância e fluorescência (670 nm e 690 nm, respectivamente) no intervalo da janela óptica de absorção. Vale ressaltar que foram testadas três extrações diferentes de partes aéreas de cajuru: extração clorofórmica, metanólica e aquosa, e a clorofórmica apresentou os melhores índices de absorvância, fluorescência e a única com boa capacidade de produção de ERO *in vitro*.

Uma vez que o extrato clorofórmico tem característica hidrofóbica, não foi possível avaliar a sua toxicidade em meios biológicos e para contornar esse obstáculo, o extrato foi incorporado em nanoemulsão polimérica. Com esses dados, estudos *in vitro* utilizando linhagens celulares de adenocarcinoma mamário murino (4T1) e fibroblasto murino (NIH3T3) foram conduzidos com objetivo de determinar características citotóxicas e fotodinâmicas do extrato de partes aéreas de cajuru. Todas as etapas, desde a obtenção do extrato de cajuru, passando pela preparação das nanoemulsões poliméricas e testes *in vitro* serão detalhados a seguir.

5.1. Obtenção do material vegetal

O material vegetal foi obtido por pesquisadores da Universidade Federal do Acre (UFAC) os quais colaboram dentro do projeto INCT em

Nanobiotecnologia e para a coleta foi obtido registro de protocolo nº **2070/09-83** no IBAMA Rio Branco Acre de 20 de maio de 2009 o registro da solicitação de autorização para acesso ao patrimônio genético, a qual recebeu o protocolo número 010156/2012-7.

A planta (*Arrabidaea chica*) foi coletada em janeiro de 2011 pelo prático em taxonomia botânica Edilson Consuelo de Oliveira na Reserva Florestal Humaitá, coordenadas: 9°45'18"S 67°36'50"W, localizada a 33 km de Rio Branco, no município de Porto Acre, Estado do Acre. A exsicata está armazenada junto à coleção botânica do laboratório de botânica e ecologia vegetal - LABEV – identificada pelo nome de ECO 322. O laboratório LABEV é um apêndice do Herbário do Parque Zoobotânico das Ciências Fisiológicas da UFAC no qual o Prof. Dr. Marcos Silveira é o Curador.

As amostras foram processadas na Unidade de Tecnologia de Alimentos (UTAL) da UFAC seguindo a metodologia descrita por Graebner, Mostardeiro [150]. A partir de 4.650 g da planta verde (partes aéreas incluindo folhas e haste), as amostras foram secas em estufa a 50 °C obtendo-se 2.300 g de material vegetal seco. Destas, 800 gramas foram triturados e postos em infusão em Etanol 98^oGL. O material foi filtrado e o líquido extraído foi evaporado em rotaevaporador com pressão reduzida, retendo o extrato etanólico bruto no balão de evaporação. O etanol recuperado na evaporação foi reaproveitado para nova extração, repetindo-se a extração etanólica até não mais observar coloração no líquido de extração, obtendo-se assim o extrato etanólico bruto, pesando 68 g e denominado extrato etanólico seco. Com estes 68 g foi realizada a extração com clorofórmio PA obtendo-se 1,80 g de produto final, denominado de extrato clorofórmico de cajuru (ECr).

5.2. Preparo das nanoemulsões

Nanoemulsões poliméricas de PVM/MA foram produzidas com o ECr dissolvido em óleos vegetais pelo processo de emulsificação espontânea. Esse procedimento foi realizado pelo Doutor Luis Alexandre Muehlmann da empresa Nanodynamics (incubada no CDT – UnB). Para o preparo da composição, foram dissolvidos 275 mg do extrato de cajuru, 350 mg de Cremophor[®] ELP,

325 mg de óleo de Patauá e 250 mg do PVM/MA em 30 mL de acetona, sob aquecimento (40 °C) por 30 min. Em seguida, o volume foi completado com acetona para 30 mL (procedimento necessário devido à perda de acetona por evaporação). Sob agitação branda, foram adicionados 60 mL de etanol e depois 60 mL de água. Os solventes foram rotaevaporados sob pressão reduzida (100 mbar) e a 45 °C. Por fim, após a destilação, completou-se o volume da suspensão com água até atingir 50 mL. As nanoestruturas foram ressuspendidas em solução salina tamponada por fosfato de sódio (PBS, pH 7,4) para torná-las biocompatíveis e refrigeradas a 7 °C. Vale ressaltar que o procedimento descrito acima foi utilizado para produzir duas nanoemulsões, a nanoemulsão polimérica do extrato de cajuru, denominada **NanoECr** e uma nanoemulsão polimérica branca denominada **NanoBr**. Esta última seguiu os mesmos passos descritos, porém sem adição do extrato de cajuru. A NanoECr foi estocada a uma concentração de 2,7 mg/mL (ou 2700 µg/mL) de ECr. A NanoBr foi diluída de forma equivalente à NanoECr.

5.3. Caracterização nanoscópica das nanoemulsões

Para as caracterizações por Espalhamento Dinâmico de Luz, Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), as amostras foram diluídas 10x tanto em água nanopura (Milli-Q) quanto em PBS (concentração final de NanoECr de 270 µg/mL).

5.3.1 Diâmetro hidrodinâmico e Potencial Zeta

As medidas de distribuição de diâmetro das nanoemulsões poliméricas (NanoBr e NanoECr) e a carga de superfície existente entre a superfície das partículas e o dispersante (Potencial Zeta) foram determinadas utilizando o ZetaSizer Nano-ZS90/Malvern, pela avaliação das partículas suspensas em água Milli-Q e PBS por Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) e pela mobilidade eletroforética das partículas quando aplicada um campo elétrico

(NanoSight Malvern, Worcestershire WR14 1XZ, Reino Unido). Foram realizadas três medidas de cada amostra nos dois parâmetros analisados, com ângulo de 45°, a temperatura de 25 °C.

5.3.2. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) e Varredura (MEV)

Todos os reagentes de microscopia eletrônica foram adquiridos da Electron Microscopy Sciences (Hatfield, PA, EUA).

Para Microscopia Eletrônica de Transmissão, 5µL das suspensões de NanoECr e NanoBr diluídas em água destilada foram depositadas em telas de cobre cobertas com película de Formvar® a 0,6 %, fixadas em vapor de OsO₄ 2% por 20 minutos protegidas da luz e em seguida secas, *overnight*, em temperatura ambiente dentro de uma placa de Petri.

Para Microscopia Eletrônica de Varredura, 30µL das suspensões de NanoECr e NanoBr diluídas em água foram depositadas em *stub* de ferro de superfície lisa e polida e fixadas *overnight* em vapor de OsO₄ 2%. Após secagem completa da gota, o *stub* foi metalizado com ouro em um *Sputter Coater* (Balzers SCD 50, EUA). A análise dos *stubs* contendo as nanoemulsões foi realizada antes e após a metalização com ouro.

As nanoemulsões poliméricas foram analisadas ao microscópio eletrônico de transmissão (Jeol 1011) e ao microscópio eletrônico de varredura (Jeol, JSM 7001F), e apenas as NanoEcr foram medidas utilizando um programa de morfometria (Image Pro-Plus 5.1, Media Cybernetics, Bethesda, MD, EUA).

5.3.3. Testes de estabilidade das nanoemulsões

As nanoemulsões poliméricas, NanoBr e NanoECr foram submetidas a alguns testes de estabilidade, sempre protegidas da luz, para avaliação dos

parâmetros farmacotécnicos após passagem por diferentes tipos de estresse, sendo eles:

- 1- **Temperatura:** as amostras foram submetidas à temperatura ambiente, 37 °C, 7 °C (geladeira) e congeladas a -20 °C por 24h;
- 2- **Ciclos de resfriamento e aquecimento:** foram realizados 8 ciclos de resfriamento (0 °C) e aquecimento (à temperatura ambiente) das nanoemulsões poliméricas;
- 3- **Centrifugação:** as alíquotas de nanoemulsões poliméricas foram centrifugadas a 3070 g e a 24100 g por 5min
- 4- **Tempo:** a cada 30 dias, durante 8 meses, apenas as nanoemulsões poliméricas que se mantiveram estáveis após as condições acima descritas foram analisadas.

A integridade/estabilidade das nanoemulsões poliméricas foi avaliada quanto ao diâmetro hidrodinâmico e carga de superfície pela análise de espalhamento dinâmico da luz e quanto à ultraestrutura utilizando microscopia eletrônica de transmissão.

5.4. Caracterização fotoquímica e fotofísica do ECr, NanoECr e NanoBr

Para este experimento, o ECr foi diluído em etanol absoluto e as nanoemulsões novamente diluídas 10x em água Milli-Q e PBS a uma concentração final de 270 µg/mL.

5.4.1. Espectros de Absorbância e Fluorescência

Os espectros de absorbância e fluorescência das amostras de Ecr, NanoECr e NanoBr foram obtidos em leitora de placa SpectraMax M2 (Molecular Devices, EUA), segundo metodologia adaptada de Nunes, Sguilla [151]. As leituras de espectros foram realizadas em cubetas de quartzo com um

volume final de 700 μL nas concentrações já especificadas de cada amostra. O equipamento foi configurado para realizar a leitura dos espectros entre 380 e 700 nm, com um intervalo de 5 nm entre um ponto e outro.

5.4.2 Capacidade de Geração de Oxigênio Singlete - $^1\text{O}_2$ pelo método de decaimento de Benzofurano

O protocolo para detecção do $^1\text{O}_2$ foi realizado pela técnica de degradação $^1\text{O}_2$ -dependente do benzofurano segundo metodologia adaptada de He, Wu [152]. O benzofurano é um reagente que tem um pico de absorção em 410 nm; na medida em que há geração de $^1\text{O}_2$, esta absorção (410 nm) decai em relação diretamente proporcional à geração desta espécie reativa.

A capacidade de geração de $^1\text{O}_2$ das dispersões foi medida pela irradiação da cubeta com laser vermelho (660 nm), em diferentes doses de energia (7,5 J/cm^2 a 60 J/cm^2 , por 10 segundos cada), após a adição de 5 μL de solução (1,5 mg/mL, em álcool) de benzofurano (Sigma-Aldrich, EUA) em 700 μL de ECr, NanoECr ou NanoBr. Antes e após o procedimento de irradiação, a absorbância em 410 nm foi avaliada em leitora de placas Spectramax M2 para detectar a possível geração de espécies reativas. A geração de $^1\text{O}_2$ foi expressa como porcentagem de decaimento da absorbância do benzofurano em relação ao valor de absorbância da suspensão (extrato livre ou nanoemulsão polimérica + solução de benzofurano) antes das irradiações. O controle utilizado consistiu na irradiação apenas da suspensão de extrato livre ou da nanoemulsão polimérica sem benzofurano

5.5. Citotoxicidade da NanoECr e da NanoBr na ausência de irradiação contra linhagem tumoral (4T1) e normal (NIH 3T3)

5.5.1. Linhagens Celulares

As linhagens celulares NIH 3T3 de fibroblasto murino (ATCC - CRL-1658™) e 4T1 de adenocarcinoma mamário murino (ATCC - CRL-2539™) foram adquiridas do Banco de células da Universidade Federal do Rio de Janeiro (<http://www.nce.ufrj.br/bcrj>). Para o presente trabalho foram utilizadas linhagens celulares já estocadas em Nitrogênio líquido, pertencentes ao estoque de células do Laboratório de Nanobiotecnologia do Departamento de Genética e Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília (GEM-IB-UnB).

5.5.2. Meio de Cultivo

Foi utilizado o meio Dulbecco Modificado (DMEM ou Dulbecco's Modified Eagles Medium, HyClone, Logan, Utah, EUA), tamponado com bicarbonato de sódio, pH 7,2, estéril, acrescido de 10% de Soro Fetal Bovino (SFB - Gibco, EUA) e 100 UI/mL de Penicilina e 100 µg/mL de Estreptomicina (Gibco, EUA).

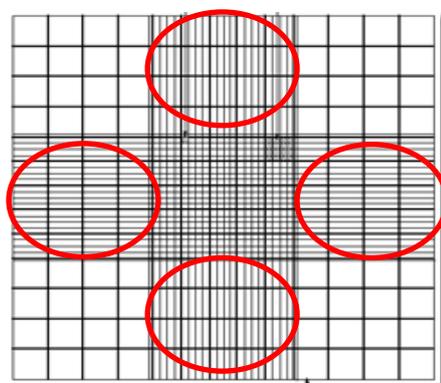
5.5.3. Manutenção das células em cultivo

Alíquotas de células em concentração de 2×10^6 células/mL foram retiradas de estoque de nitrogênio líquido e descongeladas a 37 °C. Após o descongelamento, 500 µL das alíquotas de células foram adicionados a 3 mL de meio de cultivo e submetidos a centrifugação à 750 g por 3 min. O *pellet* foi ressuspensionado em 1 mL de meio de cultivo, transferido para frascos de cultivo (garrafa de 25 cm²) de células com mais 4 mL de meio de cultivo e mantidas

em estufa a 37°C, em atmosfera contendo 5% de CO₂ em ar e umidade saturada.

O estabelecimento de subcultivos foi realizado pela remoção de uma monocamada de células confluentes em frasco de 25 cm² de cultivo inicial e transferência de menor densidade celular para um novo frasco a cada 48h (tempo necessário para que a confluência atingisse 80%). Para isso, o meio de cultivo foi substituído por 3 mL de Tripsina 0,25% e a garrafa foi incubada por 3 min na estufa para que as células se desprendessem do fundo. Em seguida, 3 mL de meio foram adicionados à garrafa para neutralizar o efeito da tripsina. A solução foi colocada para centrifugar a 750 g por 2 min. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em meio de cultivo e diluídas em solução de azul de tripan a 0,4% para contagem em câmara de Neubauer (Figura 4). Para o cálculo do número de células/mL foi utilizada a seguinte fórmula [153]:

$$\text{n}^\circ \text{ de células/mL} = \frac{\text{n}^\circ \text{ total de células contadas} \times \text{fator de diluição} \times 10^4}{\text{n}^\circ \text{ de quadrantes contados}}$$



 **Quadrantes contados**

Figura 4: Desenho esquemático mostrando o número de quadrantes contados para a determinação do cálculo do número total de células. O fator de diluição utilizado foi de 5 (10 µL da suspensão de células para 40 µL da solução de azul de tripan).

Todas as linhagens celulares utilizadas neste estudo foram empregadas respeitando o limite máximo de dez passagens para a formação de subcultivos. Após este limite, as células eram descartadas. Para a realização dos experimentos, após a contagem celular, as linhagens eram transferidas para microplacas de cultivo de acordo com o experimento a ser realizado.

5.5.4. Citotoxicidade na ausência de irradiação

Para a realização deste experimento, 5×10^3 células das 2 linhagens (4T1 e NIH 3T3) foram semeadas em diferentes poços de placas de 96 poços. Após 24h, as células foram expostas a diferentes concentrações de NanoBr e de NanoECr (Tabela 2) por mais 24h e incubadas em estufa a 37 °C.

Tabela 2: Diferentes concentrações de NanoBr e NanoECr utilizadas para testes de citotoxicidade na ausência de irradiação em linhagens celulares 4T1 e NIH3T3.

Concentração final de ECr ($\mu\text{g/mL}$)	Meio de cultivo (μL)	PBS (μL)	Suspensão de nanoemulsões (μL)	Volume Total (μL)
0 (Controle)	100	50	0	150
8,9	100	49,5	0,5	150
17	100	49	1	150
31	100	48	2	150
54	100	47	3	150
71	100	46	4	150
90	100	45	5	150
180	100	40	10	150
270	100	35	15	150
360	100	30	20	150
450	100	25	25	150
540	100	20	30	150
630	100	15	35	150
720	100	10	40	150
810	100	5	45	150
900	100	0	50	150

5.5.5. Viabilidade Celular por meio do ensaio de MTT

Este ensaio de citotoxicidade é um teste colorimétrico que quantifica a redução do reagente MTT (brometo de 3(4,5 dimetiltiazol-2il)-2,5-difeniltetrazólio - Invitrogen, EUA) em um composto conhecido como formazan pela ação de desidrogenases mitocondriais. A presença de desidrogenases mitocondriais ativas é um indicativo de viabilidade celular. Os cristais do corante roxo formazan formados pela redução do MTT foram quantificados por espectrofotometria.

Decorrido o tempo do tratamento das células em cultivo, o meio foi substituído por uma solução de MTT (5 mg/mL) a 10% em DMEM e a placa foi coberta com papel alumínio e incubada em estufa a 37°C. Após 2 h de incubação, esta solução foi removida e aos poços foram adicionados 150 µL de DMSO para a solubilização dos cristais de formazan. Após 3 minutos, os cristais de formazan foram dissolvidos e a quantificação deste produto foi realizada em leitora de placa Espectramax M2 em comprimento de onda 600 nm. Foram realizados, para cada experimento, três repetições em triplicatas.

5.6. Ensaio de Interação da NanoECr com as linhagens celulares

A partir desse experimento, apenas a NanoECr foi utilizada, já que a NanoBr não apresentou características fotoquímicas e fotofísicas para uso em TFD. Ademais, uma substância para ser considerado um bom FS não pode ser citotóxica na ausência de irradiação. Dessa forma, para a TFD, baseado nos resultados de citotoxicidade no escuro após 24h de exposição determinada pelo teste de MTT, foi escolhida a maior concentração não tóxica da NanoECr para a linhagem controle (NIH 3T3) e tumoral (4T1) do presente experimento, que equivale a 54 µg/mL.. Entende-se por interação, a associação das nanoemulsões poliméricas à membrana plasmática ou a internalização destas pelas células.

5.6.1. Espectrofotômetro

Para os estudos de interação as células NIH3T3 e 4T1 foram semeadas em placas de cultivo de 24 poços 24h antes do início do experimento em uma concentração de 2×10^4 células por poço. Para a determinação do perfil de interação da NanoECr, o meio de cultivo foi removido e as amostras da NanoECr (300 μ L) na concentração de 54 μ g/mL foram aplicadas aos poços de cultivo. Para a avaliação da cinética de interação, foram preparados 6 grupos experimentais em triplicata. Os grupos foram preparados para a quantificação da NanoECr por meio da absorbância em seu máximo de absorção (670 nm). Nos tempos de 0, 5, 15, 30, 60 e 120 min, amostras do sobrenadante (200 μ L) foram coletadas e quantificadas em leitora de placa em placas de 96 poços. A porcentagem de interação foi calculada tendo como padrão 100% os valores de absorbância da NanoECr.

5.6.2. Microscopia Confocal

As células 4T1 e NIH3T3 foram semeadas na concentração de 2×10^4 células/poço em 2 placas de 24 poços contendo lamínulas previamente autoclavadas. Após 24h, as células foram incubadas com a NanoECr na concentração de 54 μ g/mL com o melhor tempo de interação obtido pela análise por espectrofotometria (15 min). Decorrido esse tempo, as células foram lavadas 2x com PBS, incubadas com o fluorocromo Hoechst 33342 (10 μ g/mL) para a marcação do núcleo, por 15 min, novamente lavadas em PBS, fixadas em paraformaldeído 4% e lavadas em PBS para retirada do excesso de fixador. As lamínulas foram montadas em lâminas de vidro e divididas nos seguintes grupos em duplicata: controle (somente a célula sem marcação), controle 1 (célula marcada somente com o Hoechst), tratamento 1 (célula incubada com a NanoECr) e tratamento 2 (célula incubada com a NanoECr e marcada com Hoechst). As lâminas foram analisadas em Microscópio Confocal (Leica, TCS SP5, São Paulo, Brasil) utilizando comprimentos de onda de

excitação e emissão do Hoechst em 405 – 458 nm e do ECr em 350 nm e 690 nm, respectivamente.

5.7. Aplicação da Terapia Fotodinâmica em linhagem 4T1 e NIH3T3

5.7.1. Fotossensibilizante

Como já mencionado, para este experimento foi utilizada a NanoECr na concentração de 54 µg/mL - maior concentração não tóxica às duas linhagens celulares após exposição por 24 h no escuro.

5.7.2. Fonte de luz

Foi utilizado um equipamento emissor de laser vermelho (MMoptics, São Carlos, Brasil) com comprimento de onda de emissão de 670 nm e potência máxima de saída de 50 mW. A dosimetria da energia aplicada para os cultivos celulares foi realizada tomando por base a área superficial de um poço de uma placa de cultivo de 96 poços (~0,35 cm²) sendo a variação da energia determinada pelo tempo de exposição à irradiação. O cálculo utilizado para medir as fluências energéticas utilizadas para o tratamento das linhagens tumorais com a TFD está representado abaixo:

$$\text{Dose (Fluência): } \frac{P(W) \times t(s)}{\text{área do poço}} = \text{p. ex. } \frac{0,05 (W) \times 60(s)}{0,35 (cm^2)} = 8,57 J/cm^2$$

Onde:

Dose: energia necessária para excitação dos fótons dada por J/cm².

P - Potência: intensidade da fonte de luz a uma determinada distância, medida em watts.

t - Tempo: período em segundos de exposição à fonte de luz necessária para a excitação dos fótons.

Área: espaço da amostra a ser irradiada pela fonte de luz medida pela área do fundo da placa.

5.7.3. Terapia Fotodinâmica *in vitro*

Os experimentos *in vitro* foram planejados com nove grupos para cada linhagem celular (4T1 e NIH3T3) e estão representados na Tabela 3. As linhagens celulares foram semeadas em placas de 96 poços na densidade de 5×10^3 células/poço.

Tabela 3: Grupos experimentais utilizados para TFD e respectivos tratamentos.

Grupo experimental	Tratamento
Controle	sem incubação com a NanoECr e sem irradiação
Controle NanoECr	Incubação com o extrato sem irradiação
Controle irradiação	10 min de Irradiação sem Incubação com o extrato
TFD 1,42 J/cm ²	Irradiação por 10 segundos
TFD 4,2 J/cm ²	Irradiação por 30 segundos
TFD 8,57 J/cm ²	Irradiação por 60 segundos
TFD 25,7 J/cm ²	Irradiação por 3 minutos
TFD 42,8 J/cm ²	Irradiação por 5 minutos
TFD 85,7 J/cm ²	Irradiação por 10 minutos

Os grupos experimentais da TFD e controle NanoECr consistiram no tratamento dos cultivos celulares com a suspensão de NanoECr na concentração de 54 µg/mL . Após 15 minutos de incubação em estufa a 37 °C, a suspensão contendo NanoECr foi descartada e uma solução de PBS estéril foi adicionada aos poços. Os grupos controle e controle irradiação foram

incubados nas mesmas condições, porém com meio de cultivo sem extrato ou nanoemulsão que posteriormente foi substituído por PBS. Para que fosse procedida a aplicação do laser, as diferentes doses de energia foram calculadas segundo a fórmula do item 5.7.2. Apenas os poços dos grupos TFD e controle irradiação foram irradiados como demonstrado na Figura 5. Vale ressaltar que o controle irradiação foi irradiado com a maior dose de energia utilizada neste experimento. Os grupos foram tratados em quadruplicatas como demonstra a Figura 5.

O feixe de laser foi dirigido até uma lente de ampliação (lupa). A lente ampliou o diâmetro do feixe para 2 cm, de modo a ajustar-se perfeitamente para atingir, de forma homogênea todas as células dos quatro poços da placa de 96 poços (Figura 5).

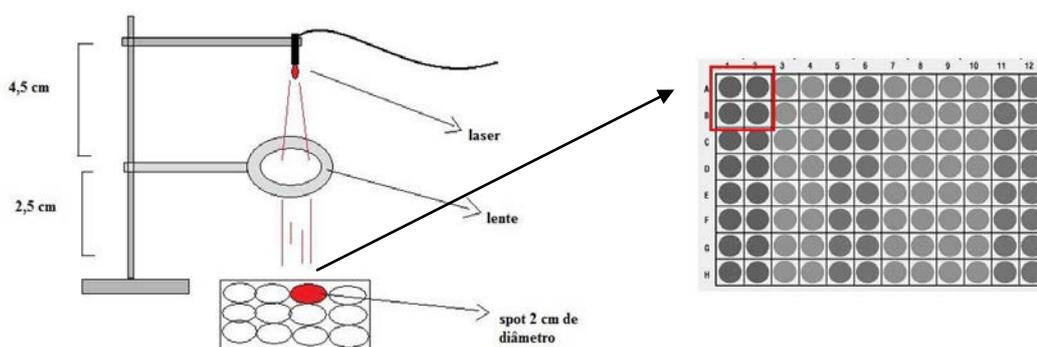


Figura 5: TFD aplicada aos grupos em quadruplicata. O laser foi disposto de forma que o “spot” iluminasse os quatro poços ao mesmo tempo (quadrado vermelho a direita).

Ao término dos experimentos, as soluções de PBS foram substituídas por meio de cultivo sem tratamento. Após 24h da execução destes procedimentos as placas de cultivo das linhagens 4T1 e NIH 3T3 foram processadas para a avaliação da viabilidade celular pelo método de MTT. Uma vez que os efeitos da TFD são agudos devido à curta duração de ERO, optou-se por avaliação da viabilidade celular após 24 h em vez de um período maior ou igual a 48 horas o que é típico para os ensaios de citotoxicidade.

Porém, para a linhagem tumoral de adenocarcinoma mamário (4T1), que

replica sua população a cada 12 h, o experimento foi repetido e a avaliação da viabilidade celular foi conduzida em diferentes tempos: 6, 12, 24 e 48 h. Os tempos de 24 e 48 h foram utilizados para avaliar se, após a terapia aplicada, as células remanescentes eram capazes de se replicar gerando uma nova população de células cancerosas. Para isso foram semeadas 4 placas de 96 poços, cada uma contendo os grupos supracitados e recebendo os mesmos tratamentos já descritos. Cada grupo experimental foi trabalhado em quadruplicata e de cada experimento foram realizados três ensaios independentes.

5.8. Caracterização do tipo de morte celular por Microscopia Eletrônica e Confocal

Para a realização deste teste, foi utilizada apenas a linhagem celular 4T1 e foram formados 5 grupos em duplicata: controle, controle irradiação, controle NanoECr, TFD 25,7J/cm² e TFD 85,7J/cm².

Segundo Comini, Núñez Montoya [130], para ser considerado fotoativo, um extrato deve diminuir a viabilidade celular das células tumorais em 50% ou mais após a irradiação e deve haver uma diferença de pelo menos duas vezes a porcentagem de viabilidade das células após irradiação com luz, em comparação com controle escuro. Atenderam a esse critério quatro doses de energia: 8,57J/cm², 25,7J/cm², 42,8 J/cm² e 85,7 J/cm²). Criou-se uma hipótese de que haveria diferenças no tipo de morte celular dose de energia-dependente e por isso foram escolhidas duas doses de energia com intervalos distantes (25,7 J/cm² como sendo a intermediária e a maior energia utilizada no experimento, 85,7 J/cm²). A concentração do extrato usada na TFD foi a mesma para todas as doses de energia, e esta manteve a diferença de no mínimo duas vezes na porcentagem de viabilidade celular comparando citotoxicidade no escuro e TFD nas doses de energia supracitadas.

Foram semeadas 2x10⁴ células/poço da linhagem 4T1 em quatro placas de 24 poços cada uma contendo os 5 grupos supracitados. Cada placa foi destinada a um dos seguintes testes para análise das vias de morte celular:

análise por microscopia eletrônica de varredura, microscopia eletrônica de transmissão e ensaio de laranja de acridina e brometo de etídio após 24 h, os grupos controle NanoECr e os grupos da TFD foram incubados com suspensão contendo 54 µg/mL de NanoECr por 15 minutos em estufa. Os grupos controle e controle irradiação foram incubados nas mesmas condições, porém com meio de cultivo puro. Após esse período, todos os grupos foram incubados em PBS e apenas o controle irradiação e os grupos TFD foram irradiados de acordo com protocolo descrito no item 5.7.2. Após o período de irradiação, o PBS de todos os poços foi substituído por meio de cultivo e a placa foi colocada em estufa por 24 h antes de serem processadas para técnicas de análise das vias de morte celular.

5.8.1. Microscopia Eletrônica de Varredura

As células aderidas às lamínulas foram fixadas em Karnovsky (2% paraformaldeído, 2% glutaraldeído, 5 mM de CaCl₂ e 3% sacarose em tampão cacodilato de sódio 0,1 M) por 1 hora, pós-fixadas em OsO₄ (1%) por 30 min no escuro, desidratados em concentrações crescentes de acetona (30%, 50%, 70%, 90% e 100%) e secas ao ponto crítico. As lamínulas foram então montadas em *stubs*, metalizadas com ouro e analisadas no microscópio eletrônico de varredura (Jeol, JSM 7001F).

5.8.2. Microscopia Eletrônica de Transmissão

5.8.2.1. Convencional

As células foram tripsinizadas, sendo cada duplicata unida em um mesmo microtubo de polipropileno e em seguida centrifugada por 2 min a 750 g. O sobrenadante foi retirado e as células foram fixadas em Karnovsky por 1h, pós-fixadas em OsO₄ (1%) e ferricianeto de potássio (0,8%) por mais 1h no escuro, desidratados em concentrações crescentes de acetona (30%, 50%,

70%, 90% e 100%), infiltrados e incluídos em resina Spurr. Cortes semifinos (3 µm) foram corados com azul de toluidina e observados em microscópio de luz para localização das células com núcleo. Os cortes ultrafinos (70 nm) foram coletados em telinhas de cobre de 200 *mesh*, colocados para secar *overnight* em uma placa de petri e observados em microscópio eletrônico de transmissão (Jeol 1011, Japão).

5.8.2.2. Método do ósmio-Imidazol

O ósmio tem afinidade apenas pelas insaturações dos ácidos graxos. O complexo ósmio-imidazol além de penetrar rapidamente nas células e tecidos, facilita a interação da molécula de tetróxido de ósmio com lipídeos insaturados, contrastando fortemente as inclusões lipídicas. A rápida penetração e aumento do contraste são devido ao imidazol, uma molécula semi-aromática com forte capacidade de se ligar a metais formando um composto de coordenação com o ósmio. Além disso, o imidazol possui um grupo amino terciário formando uma base livre que penetra rapidamente nos tecidos e membranas celulares e tem capacidade de se ligar a ácidos graxos saturados presentes principalmente em fosfolipídeos [154]. Com intuito de confirmar o componente lipídico das nanoemulsões e a presença destas no interior das células, estas foram processadas utilizando a metodologia do ósmio-imidazol. Para isso, as células foram fixadas em Karnovisky, lavadas em tampão cacodilato e em seguida em tampão imidazol. Na pós-fixação elas foram incubadas por 30 minutos em solução de O_5O_4 2% em tampão imidazol (0,1M; pH 7,5), novamente lavadas em tampão imidazol e por fim o processamento seguiu o padrão descrito no item 5.8.2.1.

5.8.3 Ensaio de Laranja de Acridina e Brometo de Etídio

As células foram incubadas com Laranja de Acridina e Brometo de Etídio (proporção 1:1) na concentração de 100 µg/mL por 15 min, no escuro, à

temperatura ambiente. Em seguida os poços foram lavados 2x com PBS, as células fixadas com Paraformaldeído 4% por 30 min, lavadas novamente com PBS e as lâminas foram retiradas e montadas em lâminas de vidro para visualização em Microscópio Confocal. Comprimentos de onda de excitação e emissão da acridina quando se liga ao DNA é de 505 nm e 530 nm, quando se liga ao RNA é de 405 nm e 580 nm, e do brometo de etídio: 405 nm e 670 nm, respectivamente. O controle negativo deve apresentar marcação do núcleo celular em verde e do citoplasma levemente alaranjado. Já as células com membrana plasmática rompida devem apresentar marcação fluorescente típica do brometo de etídio (vermelho) caracterizando morte celular por necrose. As células com membrana plasmática íntegra, porém com presença de corpos apoptóticos marcadas com fluorescência típica do laranja de acridina (alaranjado) caracterizam morte celular por apoptose [155].

A determinação da porcentagem de células vivas, em necrose ou apoptóticas em cada grupo foi determinada por análises semi-quantitativas. Para isso, 100 a 300 células de cada grupo foram analisadas nas lâminas em microscopia confocal, em triplicata, quanto ao padrão de morte celular, contadas e a porcentagem de cada tipo de célula (viva, em necrose ou apoptótica) foram calculadas.

5.9. Análise estatística

Comparações entre os grupos foram tratadas por análise de variância (ANOVA) e pós-teste de Tukey. Os resultados foram considerados significativos quando $P < 0,05$. Todas as análises estatísticas foram conduzidas no programa Graphpad Prism para PC™.

6. RESULTADOS

6.1. Caracterização das nanoemulsões

O diâmetro hidrodinâmico médio determinado pelo cálculo do espalhamento dinâmico da luz no Zeta Sizer, o índice de polidispersão (Pdl) e o potencial zeta da NanoECr foram de 370,5 nm, 0,133 e -36,1mV, respectivamente (Figura 6 A). Para a NanoBr os valores foram de 148,9 nm com Pdl de 0,059 e potencial zeta de -8,8 mV (Figura 6 B). Esse diâmetro hidrodinâmico médio e Pdl abaixo de 0,25 revelam que essas nanoemulsões são monodispersas e com baixa tendência de agregação devido à presença de carga na superfície.

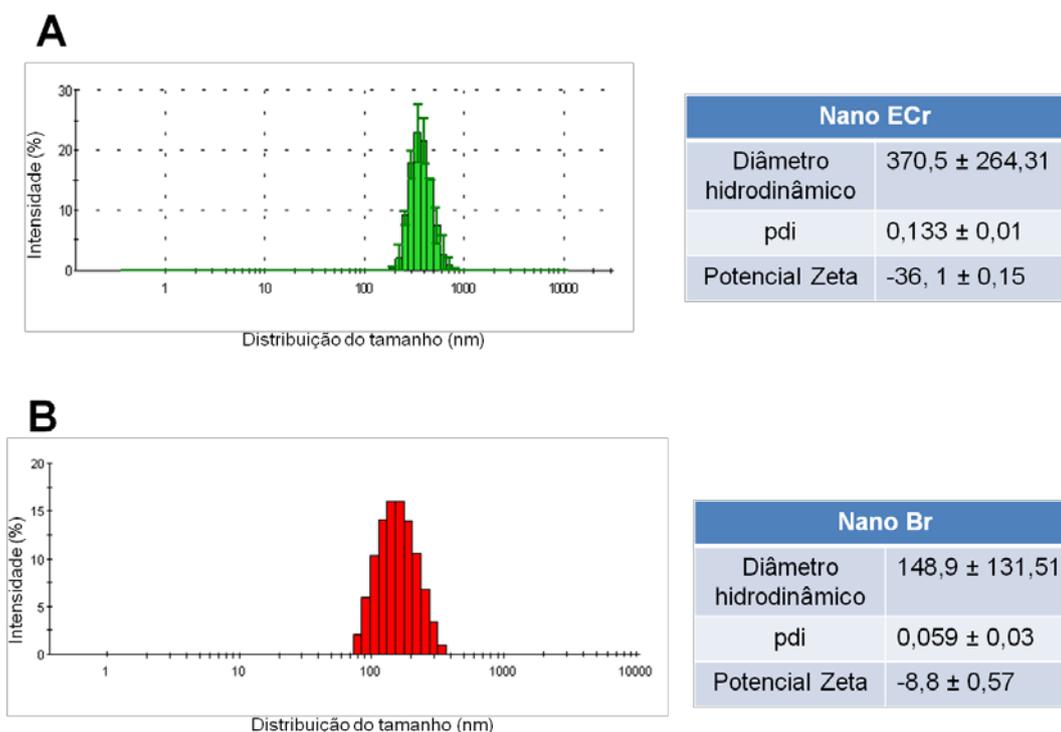


Figura 6: Distribuição do diâmetro hidrodinâmico da NanoECr (A) e da NanoBr (B) e respectivos valores da média do diâmetro hidrodinâmico, Pdi e potencial zeta.

A NanoECr e NanoBr foram analisadas quanto a morfologia e apenas a NanoECr teve sua morfometria analisada. Na análise por MET, o diâmetro médio de 420 partículas de NanoECr foi de 374 ± 117 nm; em MEV antes da metalização, 250 partículas apresentaram diâmetro médio de 367 ± 69 nm e as mesmas 250 partículas após metalização com ouro apresentaram diâmetro médio de 448 ± 70 nm. A Figura 7 A mostra a curva de distribuição de diâmetro das partículas pelas três técnicas supracitadas. Morfologicamente, as NanoECr mostraram-se na MET, esféricas, com eletron-densidades variadas, algumas apresentando núcleo bastante elétron-denso e outras, superfície elétron-densa e núcleo eletron-lucente (Figura 7 B). Na MEV, elas apresentaram-se esféricas, com superfície rugosa e algumas aparentavam estar rompidas (Figura 7 C e D). Não houve diferença significativa no tamanho das partículas quando estas foram diluídas em água ou PBS.

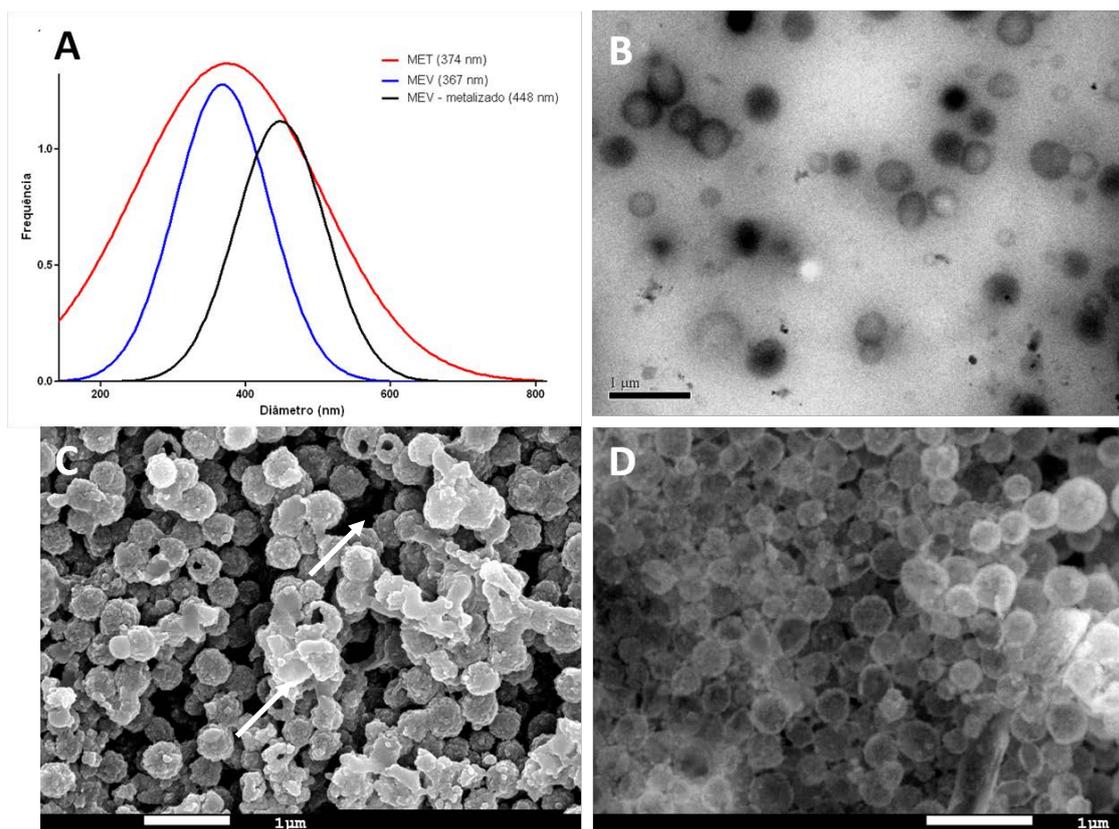


Figura 7: Caracterização morfométrica da NanoECr por MET e MEV. (A) Comparação entre as curvas de distribuição do tamanho da NanoECr em MET (curva vermelha), MEV antes da metalização (curva azul) e MEV após metalização (curva preta). (B) Eletromicrografia da NanoECr obtida em MET. (C) Eletromicrografia da NanoECr obtida em MEV após metalização, (D) Eletromicrografia da NanoECr obtida em MEV antes da metalização. Note a presença de algumas nanoestruturas aparentemente rompidas (setas).

Na análise por MET, a NanoBr apresentou muitas nanogotículas com morfologia amorfa e algumas esféricas e todas com eletron-densidades variadas (Figura 8).

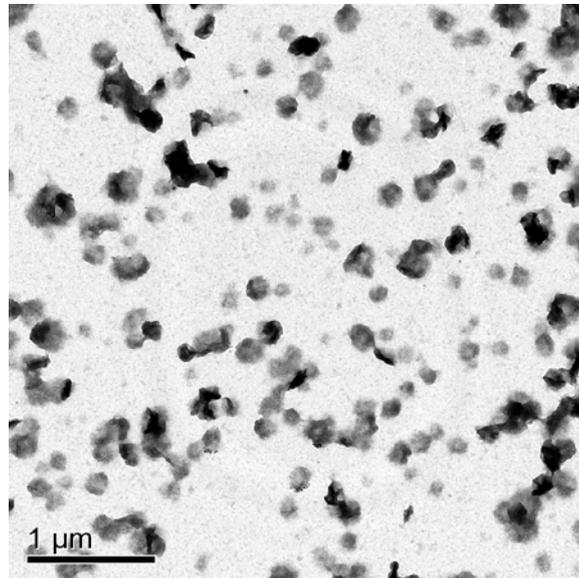


Figura 8: Eletromicrografia da NanoBr em MET.

6.2. Testes de estabilidade

De acordo com os parâmetros analisados no Zeta Sizer, a NanoBr e a NanoECr mantidas em temperatura ambiente, a 37°C, centrifugadas a 3070 g (apenas a NanoECr) ou submetidas a ciclos de resfriamento e aquecimento apresentaram diâmetros hidrodinâmicos médios menores quando comparado com as nanoemulsões frescas e Pdl's com valores maiores. Quando foram submetidas a congelamento a -20°C ou centrifugadas a 24100 g (apenas NanoECr), os diâmetros hidrodinâmicos foram maiores. O Pdl da NanoECr após centrifugação a 24100 g chegou a 1, mostrando uma população muito polidispersa. A NanoBr não resistiu às centrifugações, formando duas fases na solução e portanto não foram avaliadas no Zetasizer após esses procedimentos.

Segundo imagens adquiridas em MET, apenas as nanoemulsões que ficaram estocadas em geladeira apresentaram morfologia semelhante à da nanoemulsão fresca. Levando em consideração tanto os dados do Zeta Sizer quanto os dados oriundos da microscopia eletrônica, somente as

nanoemulsões que apresentaram resultados semelhantes à nanoemulsão fresca foram submetidos a análises por tempo. Atenderam a esse critério as estocadas em geladeira a 7°C e, portanto estas foram mantidas a essa temperatura e analisadas a cada 30 dias, durante oito meses quanto ao diâmetro hidrodinâmico, carga de superfície e morfologia. As nanoemulsões se mantiveram estáveis em geladeira (7°C) por oito meses, momento em que começaram a precipitar (NanoECr) ou a formar fases (NanoBr) em suspensão. Todos esses dados foram comparados com as amostras frescas e estão representados nas tabelas 4 e 5 e mostrados na Figura 9. Em relação às várias análises realizadas durante oito meses, apenas os dados do primeiro e do oitavo mês estão sendo mostrados nas tabelas 4 e 5.

Tabela 4: Parâmetros farmacotécnicos da NanoBr após serem submetidas a diferentes testes de estabilidade descritos no item 5.3.3 do material e métodos.

Tratamento	D.H (nm)	Pdl	Potencial zeta (mV)	*Ultraestrutura
Temperatura ambiente	151,6±11,99	0,302±0,037	-54,9±0,85	*Não analisado
37°C	146,5±2,402	0,274±0,018	-48±1,5	*Não analisado
Congelada a -20°C	367,3±20,49	0,264±0,03	-57,3±0,52	*Não analisado
Ciclos de resfriamento e aquecimento	147,1±1,55	0,335±0,012	-52,8±0,56	*Não analisado
1º mês em Geladeira 7°C	135,8±0,266	0,27±0,005	-32,2±0,24	Semelhante à fresca
8º mês em Geladeira 7°C	162,9±9,496	0,278±0,025	-34,9±1,43	Degradada

*Ultraestrutura indefinida

Tabela 5: Parâmetros farmacotécnicos da NanoECr após serem submetidas a diferentes testes de estabilidade descritos no item 5.3.3 do material e métodos.

Tratamento	D.H (nm)	Pdl	Potencial zeta (mV)	Ultraestrutura
Temperatura ambiente	255,9±11,09	0,152±0,01	-49,1±0,265	Semelhante a fresca, porém mais eletrondensa
37 °C	274,1±7,969	0,187±0,04	-47,5±0,32	Aspecto granulado
Congelada a -20°C	1342±128,8	1	-45,8±2,31	Pequeno core elétron-denso com grande halo elétron-lucente, maioria degradada
Ciclos de resfriamento e congelamento	300,8±2,778	0,383±0,06	-49,4±1,06	Amorfa, Degradada
Centrifugada a 24100 g	454,7 ± 8,944	0,278±0,103	-31,8 ±0,954	Heterogênea, amorfa degradada
Centrifugada a 3070 g	300±4,453	0,286±0,025	-49,1±0,416	Heterogênea, amorfa degradada
1º mês em Geladeira 7°C	371,43±9,9	0,29±0,031	-34,3±1,36	Semelhante à fresca
8º mês em Geladeira 7°C	297,1±24,37	0,34±0,041	-32,4±2,66	Semelhante à fresca

Como descrito nas tabelas 4 e 5, na MET foi possível observar os danos causados pelos diferentes testes de estabilidade a que as nanoemulsões foram submetidas. Com exceção dos testes em que a NanoECr foi deixada em temperatura ambiente por 24 h ou em geladeira a 7 °C por até oito meses nos quais praticamente não houve alteração morfológica quando comparado à NanoECr fresca, em todos as outras condições a NanoECr apresentou as mais diversas alterações ultraestruturais. As nanoestruturas submetidas a temperatura ambiente apresentaram morfologia esférica porém com gotículas mais elétron-densas quando comparado às nanoestruturas frescas (Figura 9 A). As mantidas em temperatura ambiente apresentaram aspecto granulado como observado na Figura 9 B. Já as nanoestruturas submetidas ao congelamento a – 20°C sofreram intumescimento após descongelamento, provavelmente com perda de conteúdo como observado na Figura 9 C. As nanoestruturas centrifugadas a 3070 g (Figura 9 D), centrifugadas a 24100 g

(Figura 9 E) e submetidas a ciclos de resfriamento e congelamento (Figura 9 F) perderam sua morfologia e apresentaram aspecto degradado, desintegrado.

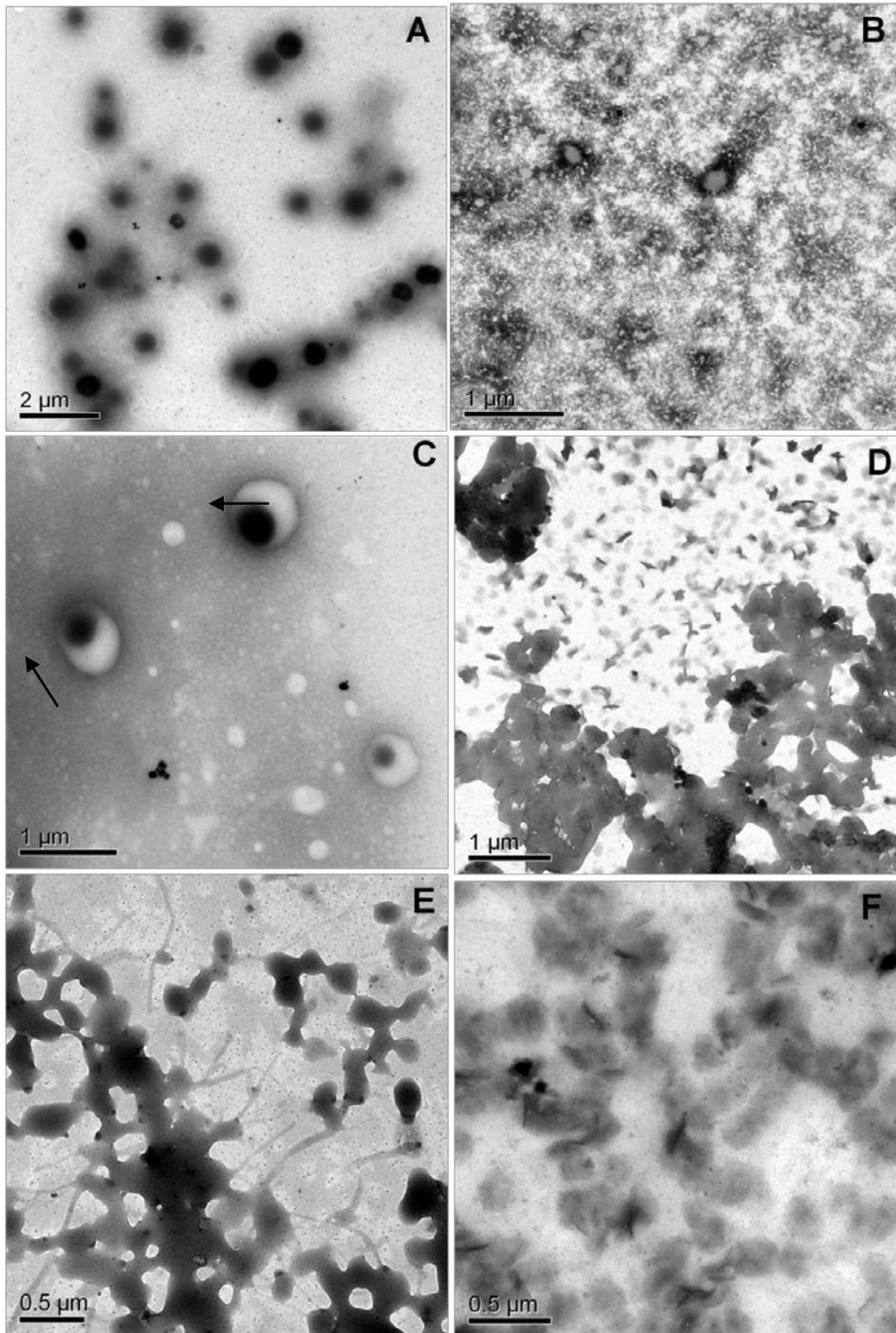


Figura 9: Eletromicrografias em MET da NanoECr submetida a diversos testes de estabilidade. A) Temperatura ambiente por 24h. Note as gotículas bem eletrondensas, B) Estufa a 37°C por 24h, mostrando o aspecto granulado das nanoestruturas, C) Congelada a -20°C. Nessa imagem podemos observar estrutura esférica intumescida (seta), D) Centrifugada a 3070 g, E) Centrifugada a 24100 g, F) Submetida a ciclos de resfriamento e aquecimento. Em D-F observam-se nanoestruturas totalmente desintegradas.

6.3. Espectros de Absorbância e Fluorescência das Suspensões Líquidas de ECr, NanoECr e NanoBr

A análise das características fotofísicas das dispersões líquidas (ECr e NanoECr) demonstrou que elas exibem as propriedades necessárias para o seu uso em TFD. Ambas apresentaram pico máximo de absorção de luz na janela terapêutica para terapia fotodinâmica (600-1000 nm) (Figura 10 A), sendo seu pico máximo de absorção entre 660-670 nm, conforme verificado com espectrofotômetro. De acordo com a Figura 10 B, as duas dispersões apresentaram uma banda de emissão de fluorescência com valor máximo próximo a 690 nm quando excitadas com luz em comprimento de onda de 350 nm. Pôde ser observado que as características fotofísicas do extrato foram mantidas mesmo após a incorporação do ECr em nanoemulsão polimérica (Figura 10). O padrão de absorção da NanoBr apresentou-se irregular e não foi detectada fluorescência empregando os mesmos parâmetros utilizados para NanoECr.

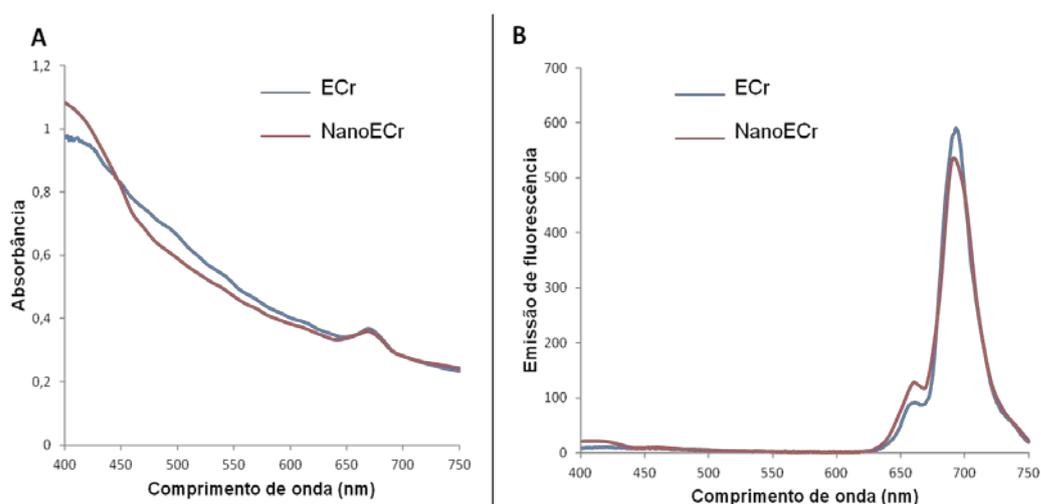


Figura 10: Sobreposição dos espectros de absorção (A) e emissão de fluorescência (B) das dispersões líquidas de ECr (azul), e NanoECr (vermelho). λ ex: 350 nm.

6.4. Capacidade de Geração de Oxigênio Singlete pelo método de decaimento de Benzofurano

A capacidade de geração 1O_2 pelas suspensões de ECr e NanoECr foi avaliada pelo método de degradação 1O_2 -dependente do benzofurano. Esse método avalia o decaimento da absorbância típica do benzofurano em 410 nm. A Figura 11 apresenta o espectro de absorbância (380-730 nm) da suspensão de NanoECr + benzofurano com irradiação de laser vermelho em diferentes fluências de energia. Na Figura pode-se observar o pico de absorção em 410 nm e o decaimento da absorbância do benzofurano com o aumento da oferta de energia à suspensão de NanoECr. Esse resultado mostra que a composição é dotada de alta capacidade de geração de espécies reativas de oxigênio, em especial do oxigênio singlete, após a irradiação com laser vermelho. Essa característica indica que a composição pode ser promissora como FS para TFD.

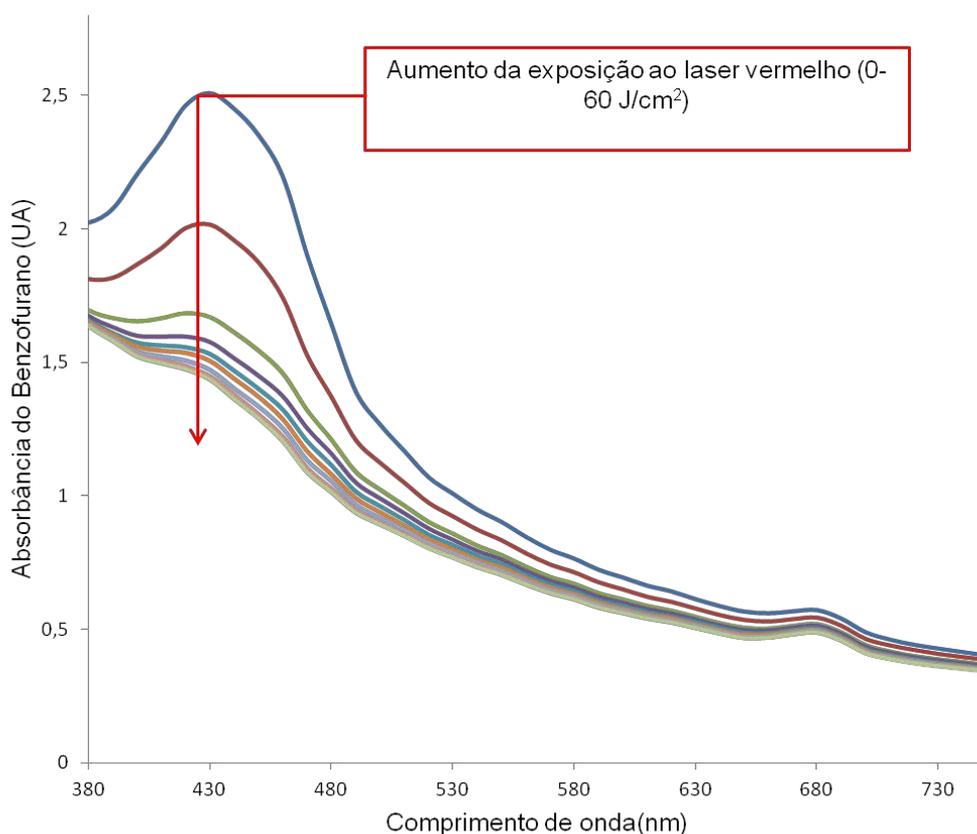


Figura 11: Espectros de absorbância (380-730 nm) da mistura de NanoECr + benzofurano com irradiação de laser vermelho em diferentes fluências de energia. No pico de 410 nm, observa-se o decaimento da absorbância do benzofurano (primeira linha azul) na medida em que há o aumento da oferta de energia. As diferentes linhas indicam as fluências de energia aplicadas às dispersões líquidas (7,5 J/cm² a 60 J/cm²).

Como controle, o benzofurano foi irradiado na ausência das dispersões de NanoECr ou do ECr para verificar se havia a presença de formação de ERO. A Figura 12 mostra que não houve decaimento do benzofurano nesta condição e apenas quando associado às dispersões de NanoECr e ECr o decaimento da absorbância do benzofurano foi visível.

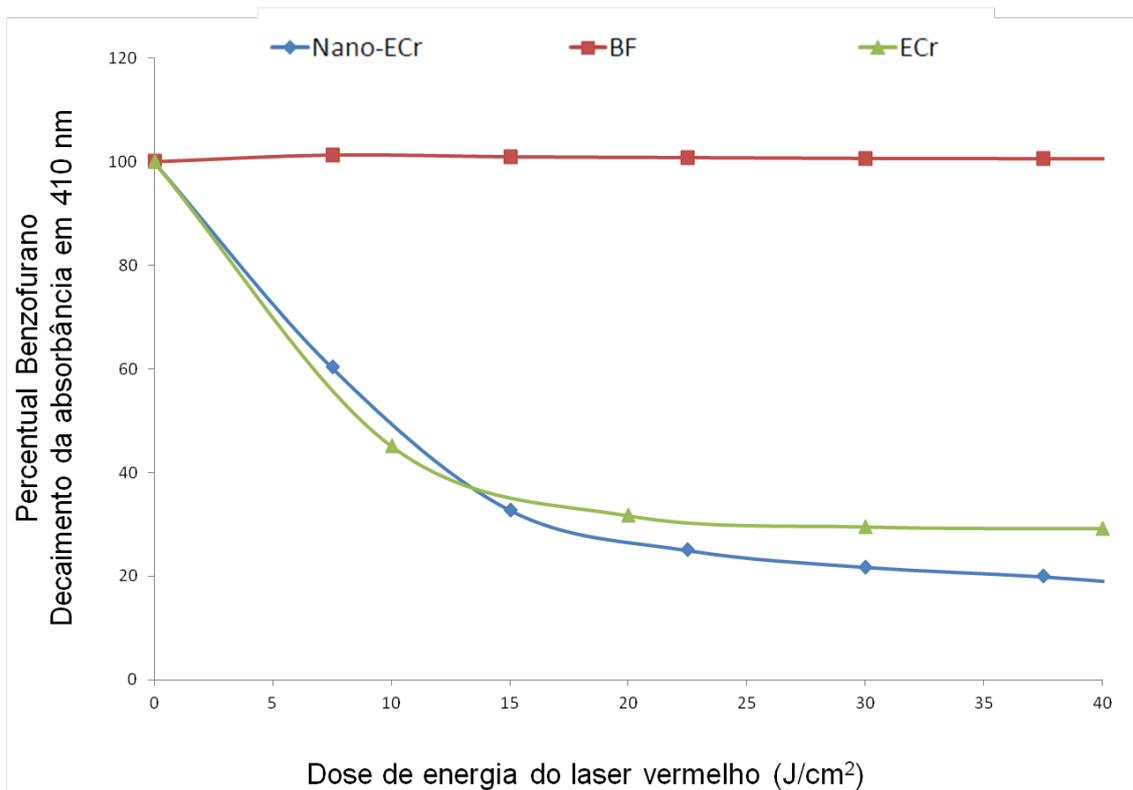


Figura 12: Decaimento percentual da absorbância em 410 nm do benzofurano (BF) em função do aumento de energia aplicada às diferentes dispersões líquidas. Em verde a geração de ERO pela ECr, em azul pela NanoECr e em vermelho a manutenção da absorbância do benzofurano quando irradiado na ausência das dispersões.

6.5. Citotoxicidade da NanoECr na ausência de irradiação contra 4T1 e NIH 3T3

Uma das premissas fundamentais para a utilização de uma composição como agente FS para TFD é a sua baixa toxicidade no escuro. Desta maneira, a toxicidade da NanoECr e da NanoBr foram avaliadas nas células na ausência

de luz. As Figuras 13 e 14 apresentam os dados de citotoxicidade no escuro contra 4T1 e NIH-3T3, em diferentes concentrações após 24h de exposição à NanoBr e à NanoECr. A concentração de NanoECr necessária para causar toxicidade de 50% das células tumorais (IC_{50}) foi de $\sim 200 \mu\text{g/mL}$, ao passo que para a linhagem NIH3T3 foi de $\sim 360 \mu\text{g/mL}$, mostrando uma maior vulnerabilidade das células tumorais em relação aos fibroblastos. Além disso, para a NanoBr as concentrações equivalentes a $360 \mu\text{g/mL}$ e $\sim 450 \mu\text{g/mL}$ foram tóxicas apenas para a linhagem tumoral (4T1) (Figura 13).

A Figura 13 mostra também que apenas as 4 maiores concentrações da NanoBr foram tóxicas para ambas as linhagens celulares. A Figura 14 mostra que as concentrações de NanoECr iguais ou menores a $54 \mu\text{g/mL}$ não apresentaram potencial citotóxico às células NIH 3T3 e à 4T1 após 24 h de exposição, sendo esta a concentração escolhida para os testes envolvendo a TFD *in vitro*.

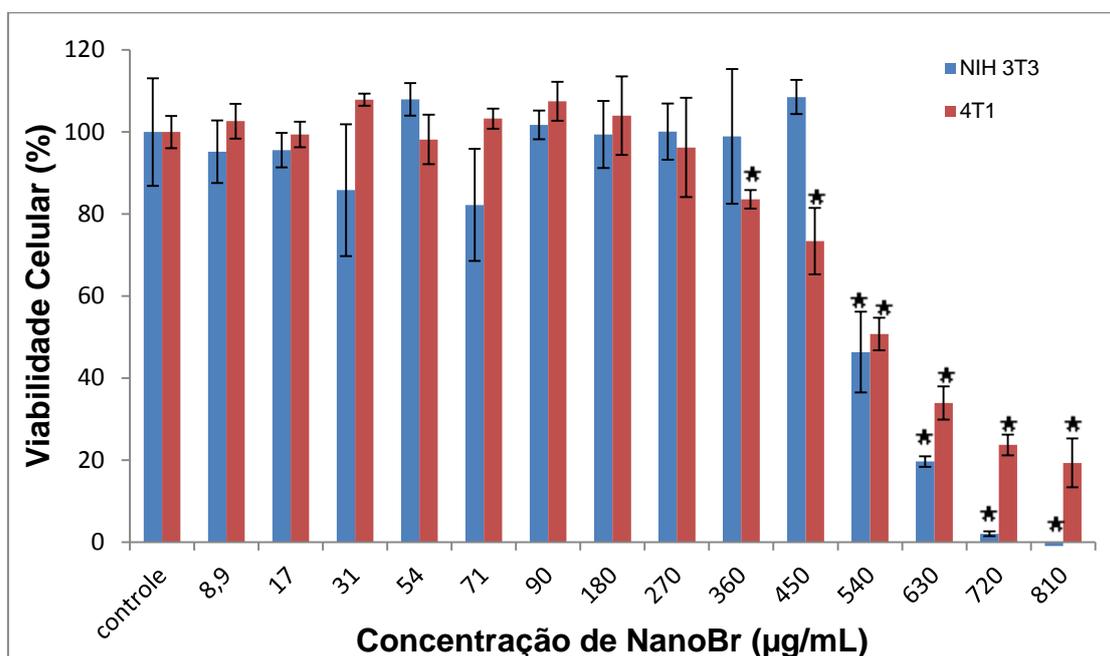


Figura 13: Percentual de viabilidade celular determinada pelo método de MTT após exposição das células NIH 3T3 (barras azuis) e 4T1 (barras vermelhas) à NanoBr por 24h em diferentes concentrações.

*Representa diferença significativa em comparação ao controle ($p < 0,05$).

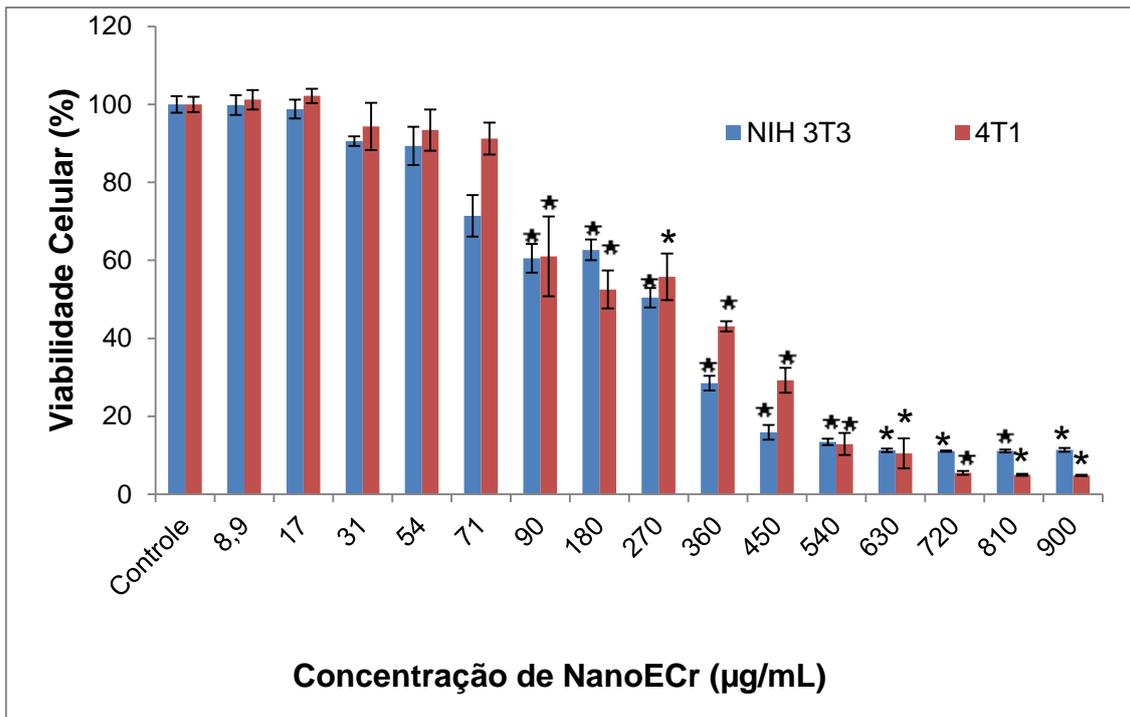


Figura 14: Percentual de viabilidade celular determinada pelo método de MTT após exposição das células NIH 3T3 (barras azuis) e 4T1 (barras vermelhas) à NanoECr por 24h em diferentes concentrações.

*Representa diferença significativa em comparação ao controle ($p < 0,05$).

6.6. Interação da NanoECr com as linhagens celulares

As células neoplásicas 4T1 captam ou se associam com maior avidéz a NanoECr em relação aos fibroblastos NIH 3T3 (Figura 15). Para a 4T1, o pico de incorporação de NanoECr foi observado entre 15 e 60 minutos de exposição, com pico máximo de interação após 15 minutos, começando a decair após 60 min. Para a NIH 3T3, o pico máximo de incorporação foi observado aos 60 min de exposição.

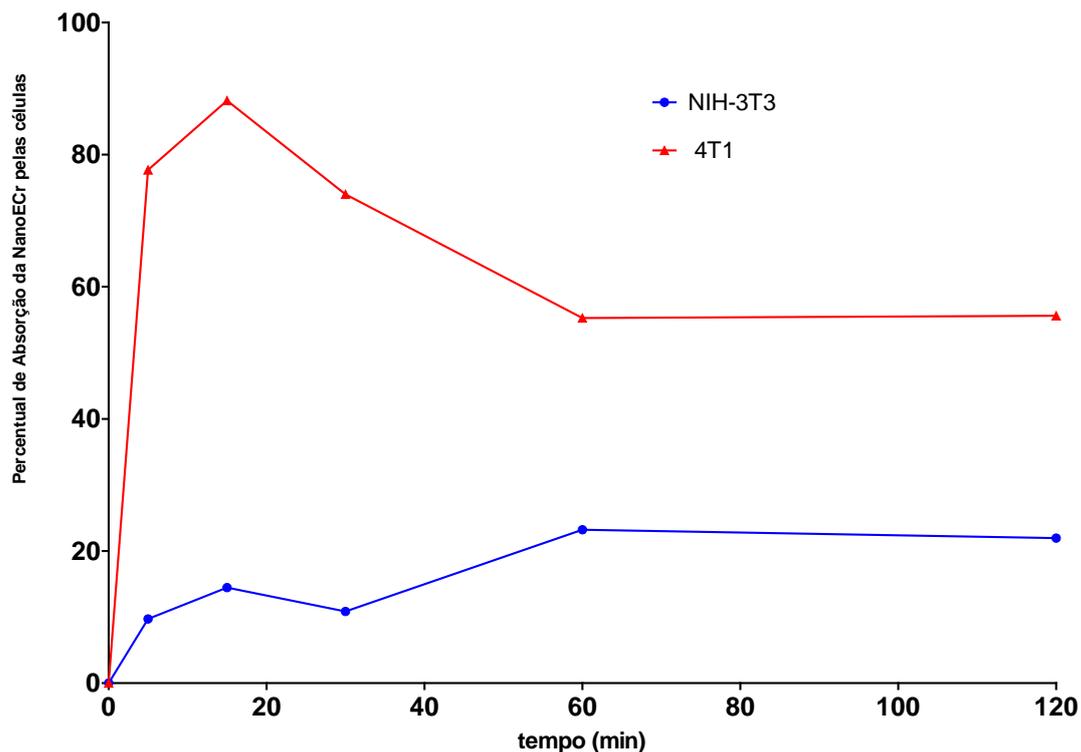


Figura 15: Perfil de interação, *in vitro*, da NanoECr com células 4T1 e NIH 3T3 em diferentes tempos de exposição (0, 5, 15, 30, 60 e 120 min). A quantificação da interação foi calculada a partir da leitura da absorbância restante da NanoECr no sobrenadante.

A NanoECr internalizada pelas células neoplásicas 4T1 concentra-se no citoplasma, o que pode ser observado em Microscopia Confocal após incubação por 15 minutos (Figura 16). A intensa marcação fluorescente da NanoECr no citoplasma dessas células confirma os resultados ilustrados na Figura 15. Para a linhagem NIH3T3, a distribuição da NanoECr no mesmo tempo de 15 minutos foi semelhante à encontrada na linhagem 4T1, porém com uma menor intensidade de fluorescência, utilizando os mesmos parâmetros técnicos de aquisição de imagens em fluorescência (dados não mostrados). Para garantir que as nanogotículas também foram internalizadas pelas células, cortes virtuais, com espessura de 10 nm em todo diâmetro celular foram realizados no microscópio confocal.

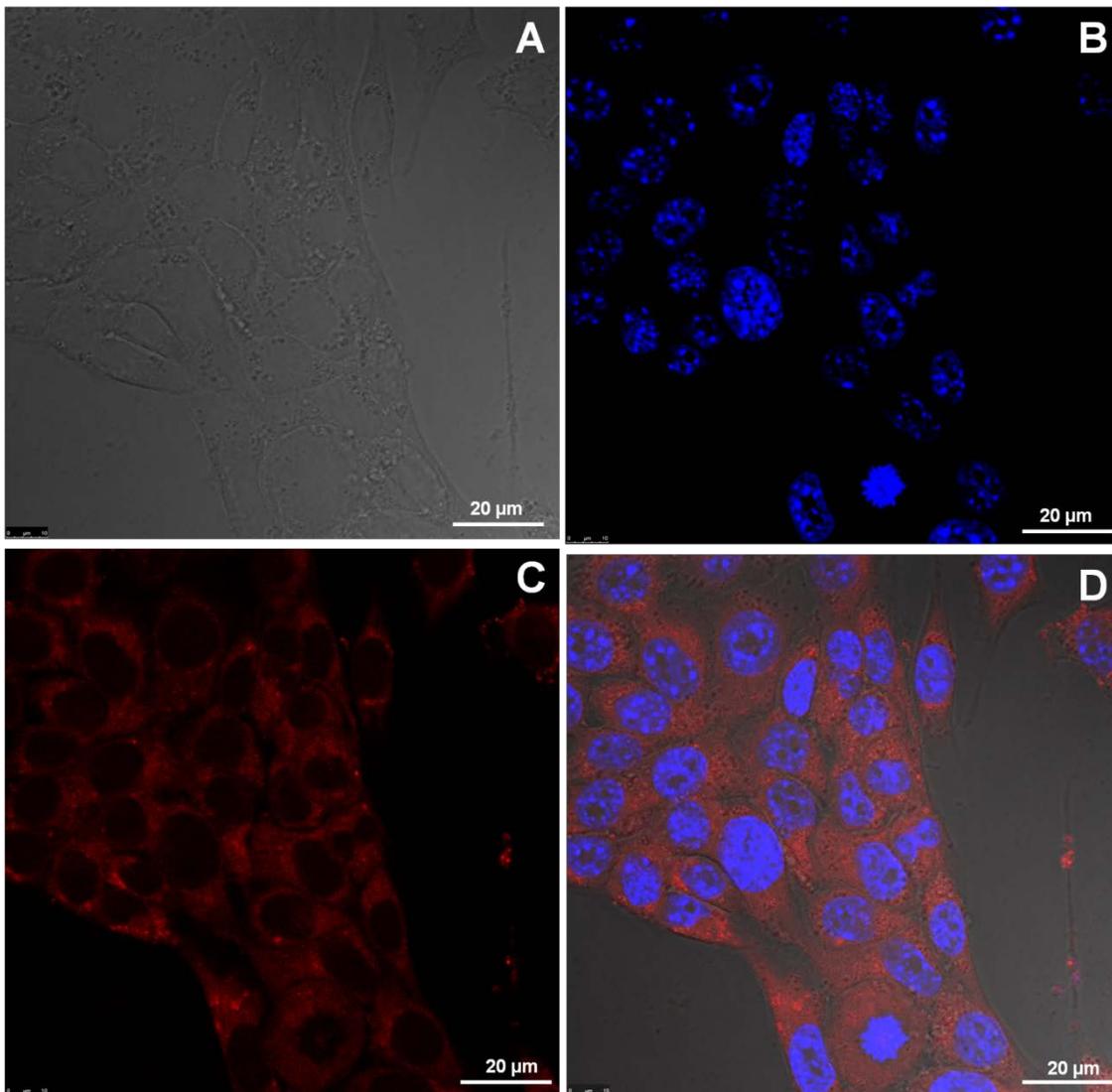


Figura 16: Interiorização da NanoECr na concentração de 54 µg/mL pelas células 4T1 após 15 minutos de exposição *in vitro*. (A) Imagem em contraste de fase, (B) Núcleo celular (azul), (C) NanoECr (vermelho) no citoplasma celular, (D) sobreposição de A, B e C.

6.7. Terapia Fotodinâmica *in vitro*

A Figura 17 mostra que na concentração testada da NanoECr (54 µg/mL), assim como a irradiação com luz vermelha com densidade de energia máxima de 85,7 J/cm², quando isoladas, não afetam a viabilidade celular. Porém, quando o tratamento fotodinâmico foi aplicado, isto é, quando as células foram expostas à NanoECr e irradiadas na sequência com luz vermelha (densidades de energia variando entre 1,42J/ cm² e 85,7J/ cm²), houve intensa redução na viabilidade celular, sendo eventos dados estatisticamente significante ($p < 0,05$) em relação aos controles. A dose de energia capaz de matar 50 % das células

foi $> 4,2 \text{ J/cm}^2$ para ambas as linhagens, sendo que, à medida que a dose de energia aumentava, aumentava também a morte das células tumorais em comparação a linhagem normal de fibroblasto.

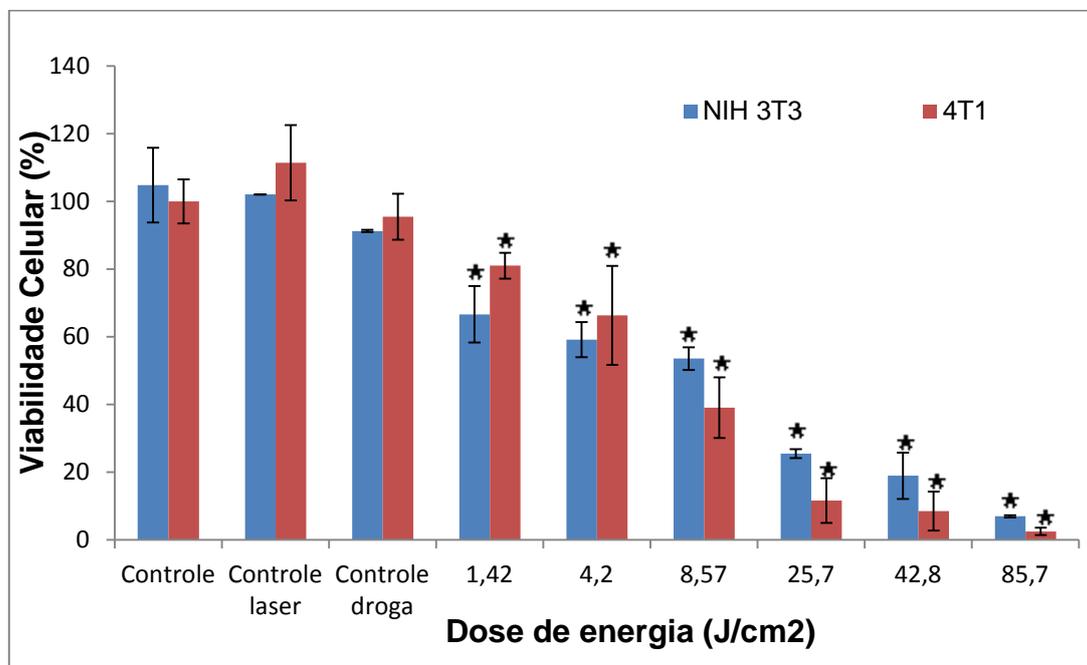


Figura 17: Percentual de viabilidade celular determinada pelo método de MTT após exposição das células NIH 3T3 (barras azuis) e 4T1 (barras vermelhas) à NanoECr por 15 minutos seguida de irradiação em diferentes fluências de energia. *Representa diferença significativa em comparação ao controle ($p < 0,05$). Tempo: 24 h pós terapia. Controle droga = incubada com a NanoECr na ausência de irradiação.

Uma vez que as células da linhagem 4T1, por ser uma linhagem tumoral, duplicam a sua população em intervalos menores (geralmente a cada 12 h) quando comparado com a linhagem normal de fibroblasto, foi investigada a recuperação das células que resistiram à TFD nos tempos de 6, 12, 24 e 48 h. Nos tratamentos com até $42,8 \text{ J/cm}^2$, as células conseguiram proliferar em um período de 48h pós TFD. A Figura 18 mostra proliferação celular nas doses de energia equivalentes a $8,57 \text{ J/cm}^2$ e $25,7 \text{ J/cm}^2$ em um período de 48h após o tratamento em oposição ao tratamento com a maior dose de energia utilizada neste experimento ($85,7 \text{ J/cm}^2$) em que todas as células morreram.

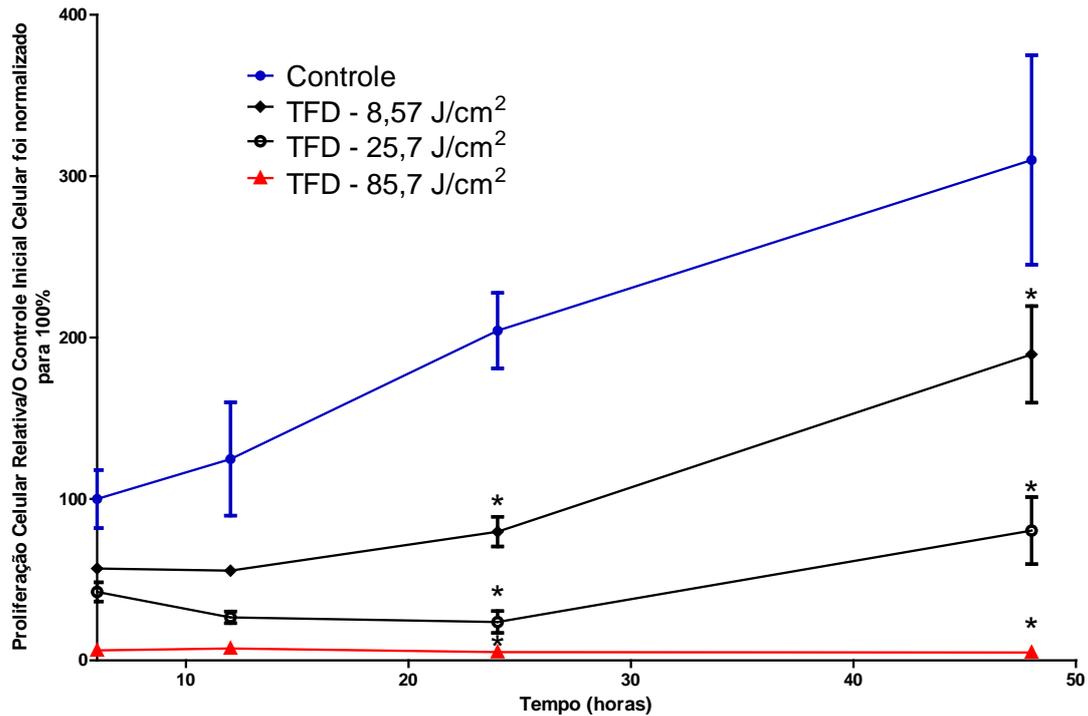


Figura 18: Representação gráfica da recuperação das células 4T1 após TFD em diferentes tempos (6, 12, 24 e 48h) pós-terapia. *Representa diferença significativa em relação ao controle ($p < 0,05$).

6.8. Indução de morte celular pela Terapia fotodinâmica mediada pela NanoECr

Como já mencionado no item 5.8 do Material e Métodos, apenas as células tratadas nas doses de energia 25,7 J/cm² e 85,7 J/cm² foram processadas para os testes de morte celular.

6.8.1 Microscopia Confocal – Laranja de Acridina e Brometo de Etídio

Por meio do teste de Laranja de Acridina e Brometo de Etídio, as células vivas (controle negativo) apresentam núcleo corado em verde e citoplasma alaranjado sem a evidência de vesículas acidófilas como pode ser observado. O controle incubado com a NanoECr obteve o mesmo padrão de marcação, porém com menor diferença de marcação entre núcleo e citoplasma (Figura 19 D) por interferência da fluorescência da NanoECr.

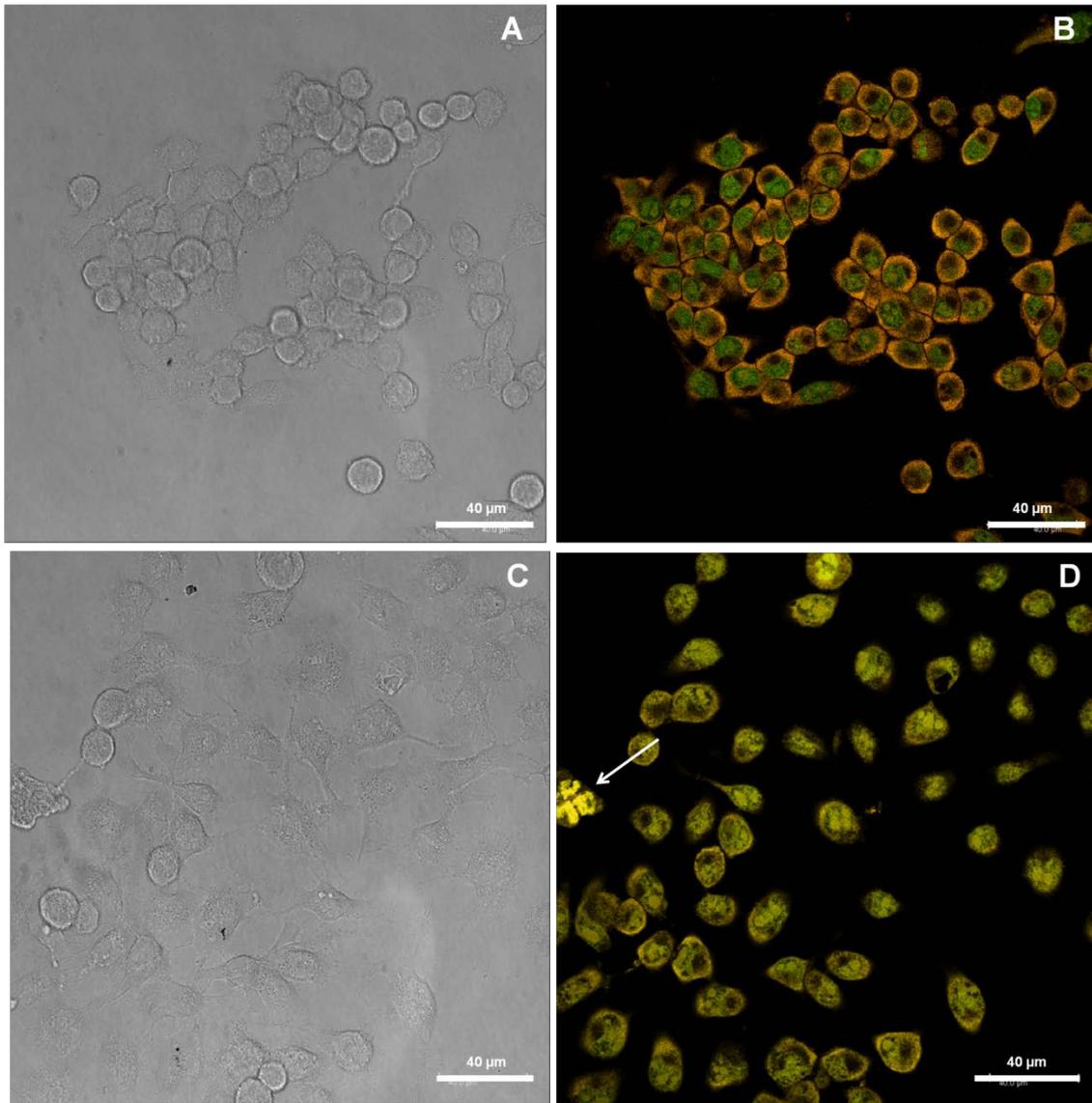


Figura 19: Marcação fluorescente com Laranja de Acridina e Brometo de Etídio em linhagem celular de adenocarcinoma mamário murino (4T1). A e B- Controle negativo, sendo, A) Microscopia de Campo Claro e B) Marcação fluorescente. C e D – Controle NanoECr na ausência de irradiação sendo, C) Microscopia de Campo claro e D) marcação fluorescente. Seta branca indica fragmentação celular sugerindo apoptose.

Já na dose de energia equivalente a $25,7 \text{ J/cm}^2$ (Figuras 20 A e B) a morte celular predominante foi a apoptose, ao passo que com $85,7 \text{ J/cm}^2$ todas as células morreram via necrose (Figuras 20 C e D).

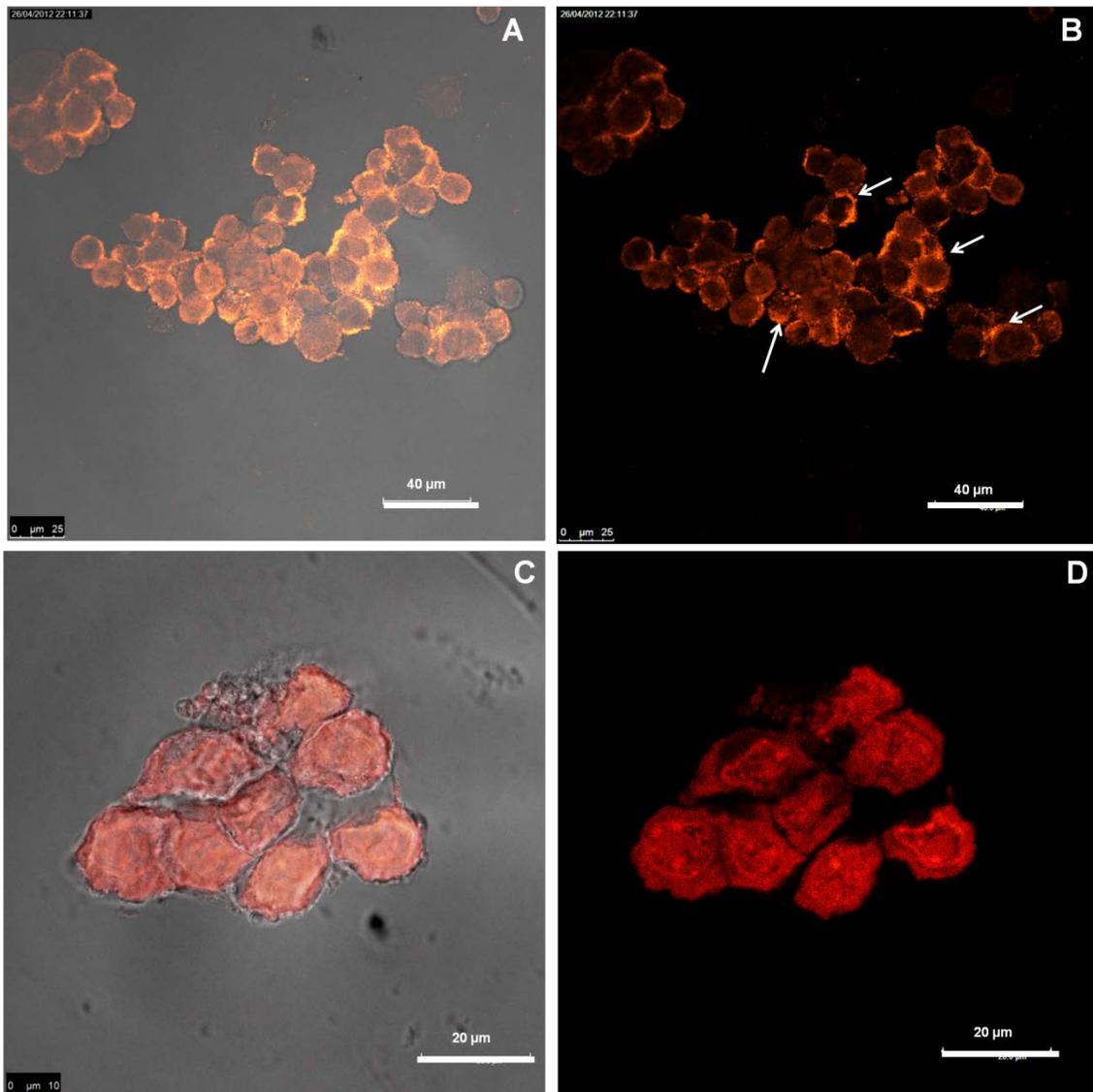


Figura 20: Marcação fluorescente com Laranja de Acridina e Brometo de Etídio em linhagem celular de adenocarcinoma mamário murino (4T1), submetido à TFD. A e B – TFD a $25,7\text{J}/\text{cm}^2$ sendo A) Sobreposição do campo claro com marcação fluorescente e B) Marcação fluorescente. Notar os “blebs” de membrana representados pela marcação laranja intensa, indicando morte celular por apoptose (setas brancas). C e D - TFD a $85,7\text{J}/\text{cm}^2$ sendo A) Sobreposição do campo claro com marcação fluorescente e B) Marcação fluorescente. Todas as células foram marcadas com brometo de etídio (vermelho) indicando morte celular por necrose.

Pelas análises semi-quantitativas, entre 100 e 300 células 4T1 de cada grupo foram contadas e a morte celular foi classificada (Figura 21). O controle e controle NanoECr (controle droga) apresentaram viabilidade celular próximos a 100% (~98%). Na dose de energia $25,7\text{ J}/\text{cm}^2$ foram encontradas cerca de 66% de células com marcação típica de célula viável, núcleo verde com citoplasma alaranjado e cerca de 34% de células com padrão de marcação para apoptose

(Figura 21). Já na dose de energia equivalente a $85,7 \text{ J/cm}^2$, não foram encontradas células viáveis, todas apresentaram padrão de marcação do brometo de etídio (vermelho) totalizando 100% de morte induzida por necrose.

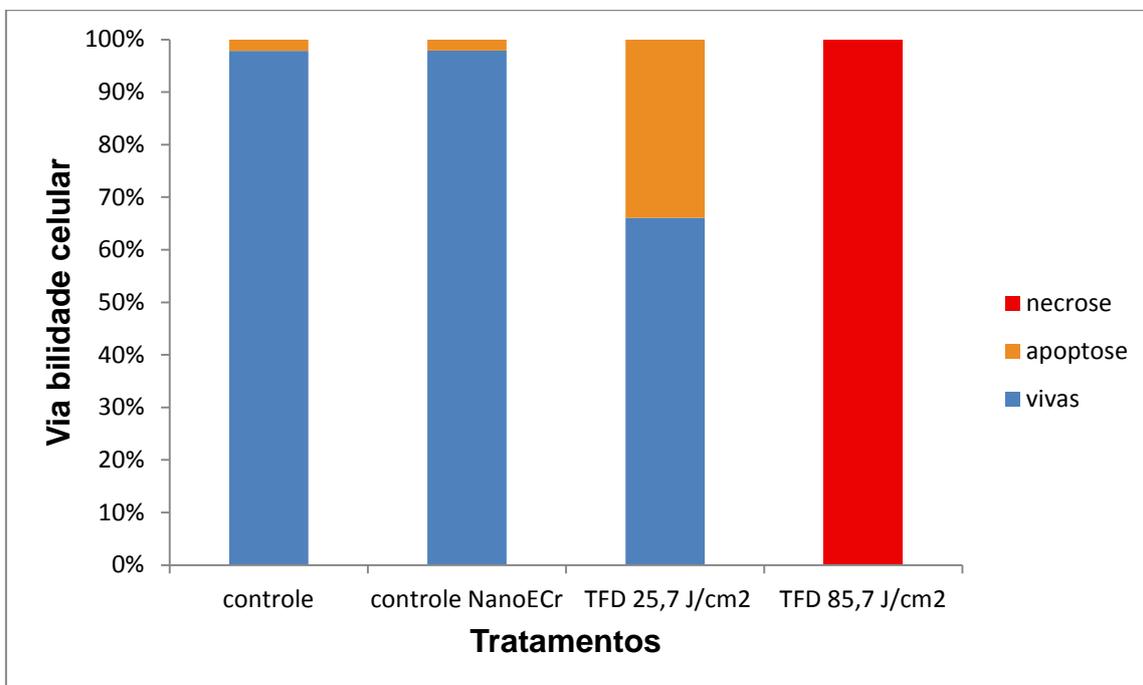


Figura 21: Porcentagem de células 4T1 vivas (barras azuis), apoptóticas (barras laranjas) ou necróticas (barras vermelhas) nos grupos controle, controle NanoECr (incubada com a NanoECr na ausência de irradiação) e nos tratamentos com TFD a $25,7 \text{ J/cm}^2$ e TFD a $85,7 \text{ J/cm}^2$.

6.8.2. Microscopia Eletrônica de Varredura

Por meio da MEV foi avaliada a integridade da membrana plasmática das células após os diferentes tratamentos. Não houve diferença morfológica entre as células controle (Figura 22 A), incubadas com a NanoECr na ausência de irradiação (Figura 22 B) ou submetidas apenas a irradiação com laser vermelho na dose de $85,7 \text{ J/cm}^2$ (padrão semelhante ao controle, dado não mostrado). Nas células incubadas com a NanoECr, porém na ausência de irradiação puderam ser observadas nanoestruturas aderidas por toda extensão da membrana plasmática. Quando as células foram submetidas à TFD, tanto com dose de energia de $25,7 \text{ J/cm}^2$ (Figuras 22 C-D), quanto de $85,7 \text{ J/cm}^2$

(Figuras 22 E-F) danos à membrana plasmática foram observados, como desorganização/desintegração da membrana plasmática com presença de inúmeras perfurações em sua estrutura. Descolamento das células do substrato também foram observações frequentes nos tratamentos com a TFD em ambas as doses de energia.

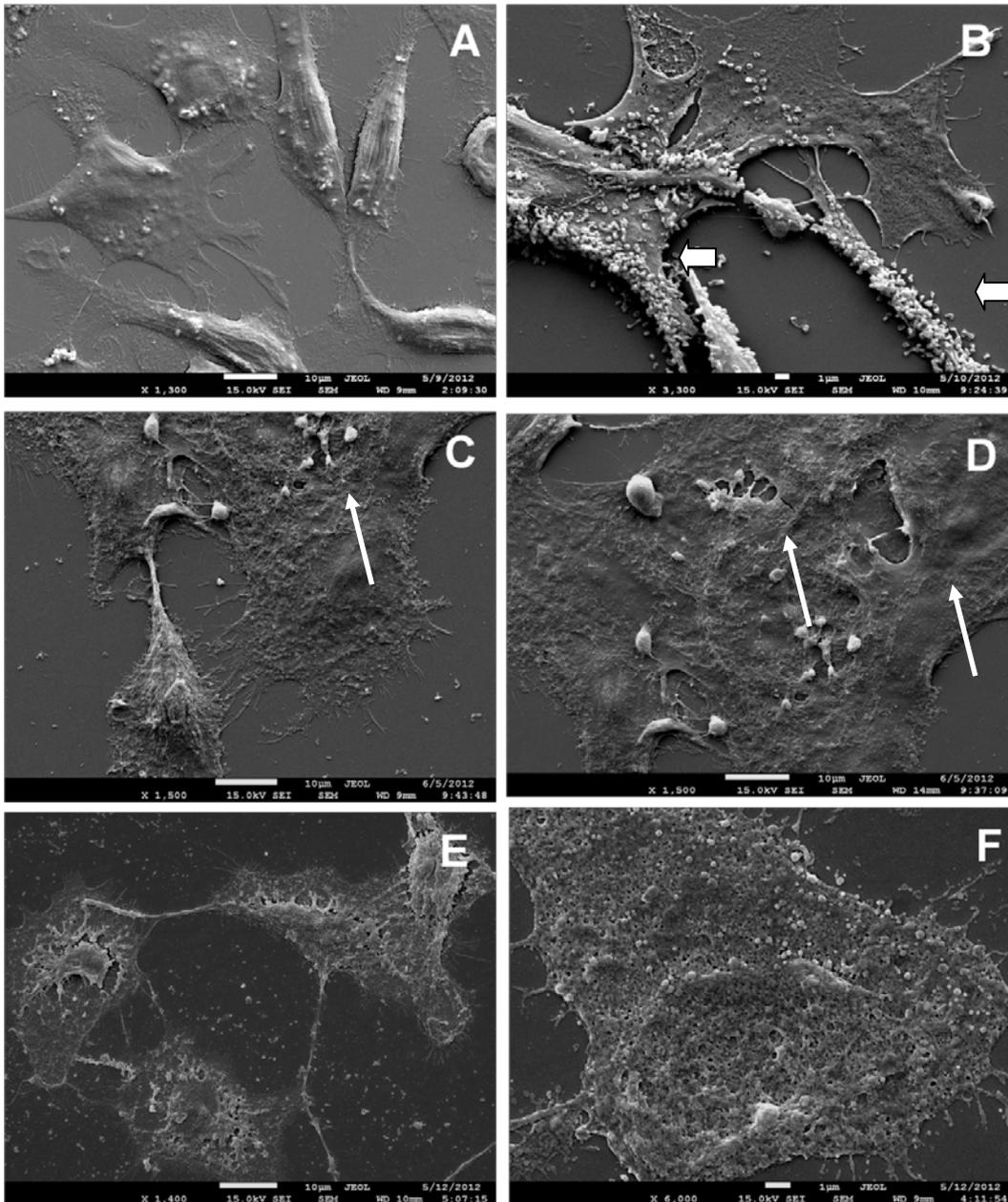


Figura 22: Eletromicrografias em MEV de células 4T1. (A) Controle, (B) Célula incubada com NanoECr na ausência de irradiação. Notar a presença de nanoestruturas difusas aderidas à membrana (setas grossas), (C-D) TFD a 25,7J/cm². Note a presença de perfurações em algumas regiões da membrana plasmática (setas finas), vistas em maior magnificação na figura C, (E-F) TFD a 85,7J/cm². Observa-se desintegração total da membrana plasmática. (F) Detalhe da desintegração de membrana plasmática.

6.8.3. Microscopia Eletrônica de Transmissão

As análises por MET demonstraram que as células incubadas com a NanoECr a 54 µg/mL na ausência de irradiação ou apenas irradiadas com laser vermelho na maior dose de energia utilizada nesse experimento (85,7 J/cm²) apresentaram morfologia semelhante à do controle (Figura 23 A-C). A célula tumoral 4T1 controle (Figura 23 A-B) é caracterizada por possuir núcleo grande, irregularmente oval com predominância de eucromatina (típico de células em divisão rápida) com citoplasma repleto de mitocôndrias alongadas e algumas redondas com cristas transversais, retículo endoplasmático liso geralmente associado às mitocôndrias e retículo endoplasmático rugoso com morfologia cilíndrica (Figura 23 B), alguns ribossomos livres e, raramente, algumas vesículas elétron-lucentes também são identificadas. São observadas ainda inúmeras microvilosidades na superfície das células, e conexões entre as células vizinhas.

A única diferença encontrada entre as células 4T1 controle (Figura 23 A-B) e irradiadas com laser vermelho na ausência da NanoECr (Figura 23 C) ou incubadas com a NanoECr sem irradiação (Figura 23 D) foi uma maior quantidade de vesículas eletron-lucentes nesses dois grupos de células comparando com as células controle. As vesículas das células que sofreram apenas irradiação (Figura 23 C) se apresentavam totalmente eletron-lucentes diferentemente das vesículas presentes nas células incubadas com a NanoECr, as quais possuíam conteúdo amorfo e eletron-denso em seu interior (Figura 23 D), provavelmente conteúdo proveniente da nanoemulsão internalizada pela célula.

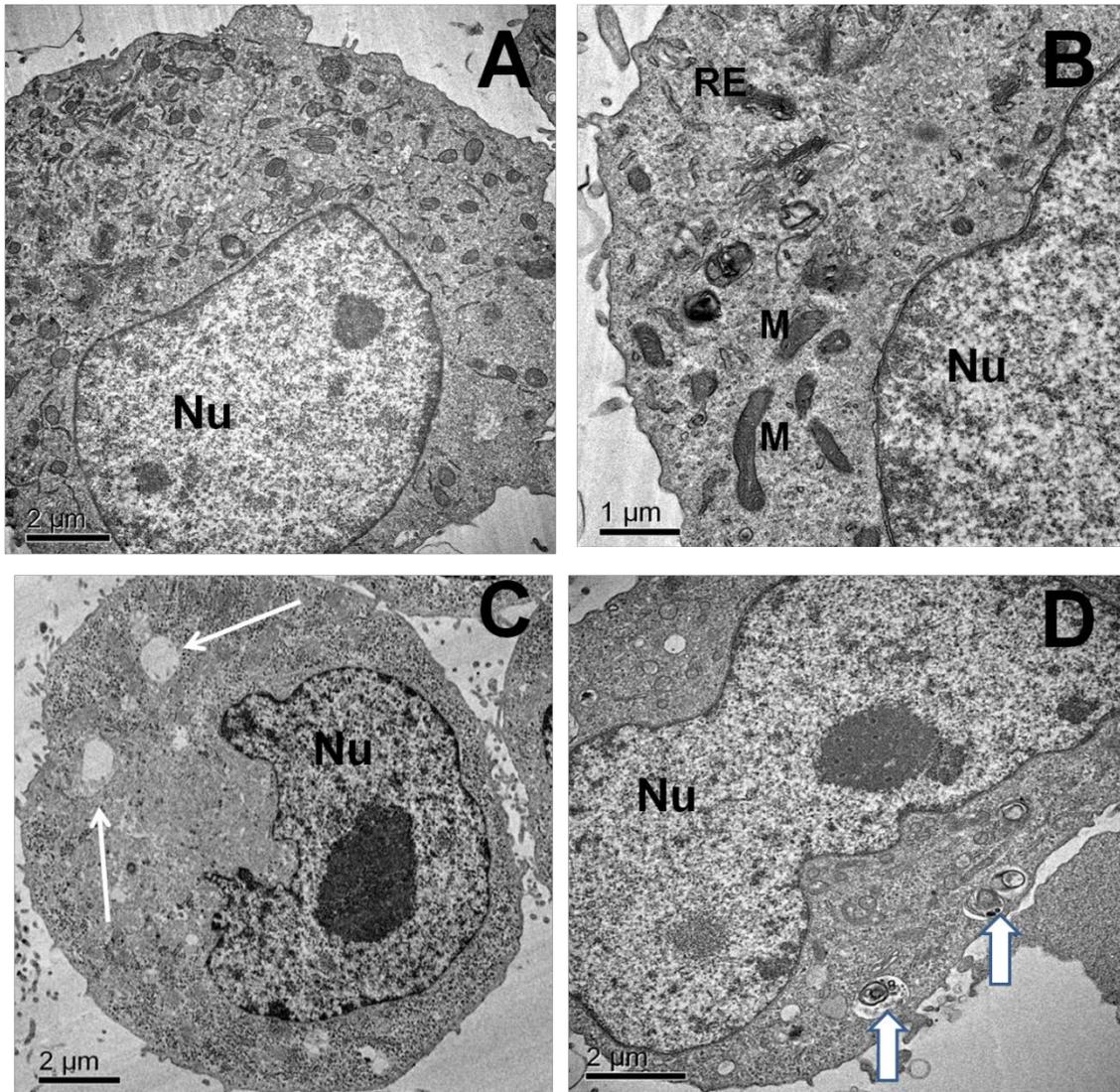


Figura 23: Eletromicrografias em MET de células 4T1. (A-B) Controle, (C) Célula irradiada com laser vermelho com fluência energética de $85,7\text{J}/\text{cm}^2$. Note a presença de vesículas eletron-lucentes (setas brancas finas), (D) Célula incubada com NanoECr na concentração na ausência de irradiação mostrando algumas vesículas com material amorfo (setas brancas grossas).

Após TFD com energia de $25,7\text{ J}/\text{cm}^2$ algumas células tumorais apresentaram discreto intumescimento do reticulo endoplasmático rugoso e das mitocôndrias, algumas apresentando aspecto “lavado” (Figura 24 A). Além disso, pode ser observada uma redução na densidade citoplasmática, núcleo da célula bastante irregular (Figura 24 B), condensação da cromatina e fragmentação nuclear (dados não mostrados). A maioria das células apresentou estruturas denominadas de *blebs* que por definição são protuberâncias irregulares na membrana plasmática de uma célula causada por

dissociação localizada do citoesqueleto, típico de células que entraram em apoptose (Figura 24 B). A Figura 24 C apresenta detalhe de um *bleb*, Já as células submetidas à TFD com a maior dose de energia ($85,7 \text{ J/cm}^2$) apresentaram características típicas de necrose, sejam elas colapso da membrana plasmática com liberação de componentes intracelulares perda da densidade citoplasmática com a presença de grandes vacúolos no interior das células (Figuras 24 A-C). Na maior parte das células tratadas com $85,7 \text{ J/cm}^2$ analisadas foram observados edemas e perda total da integridade celular (Figura 24 D).

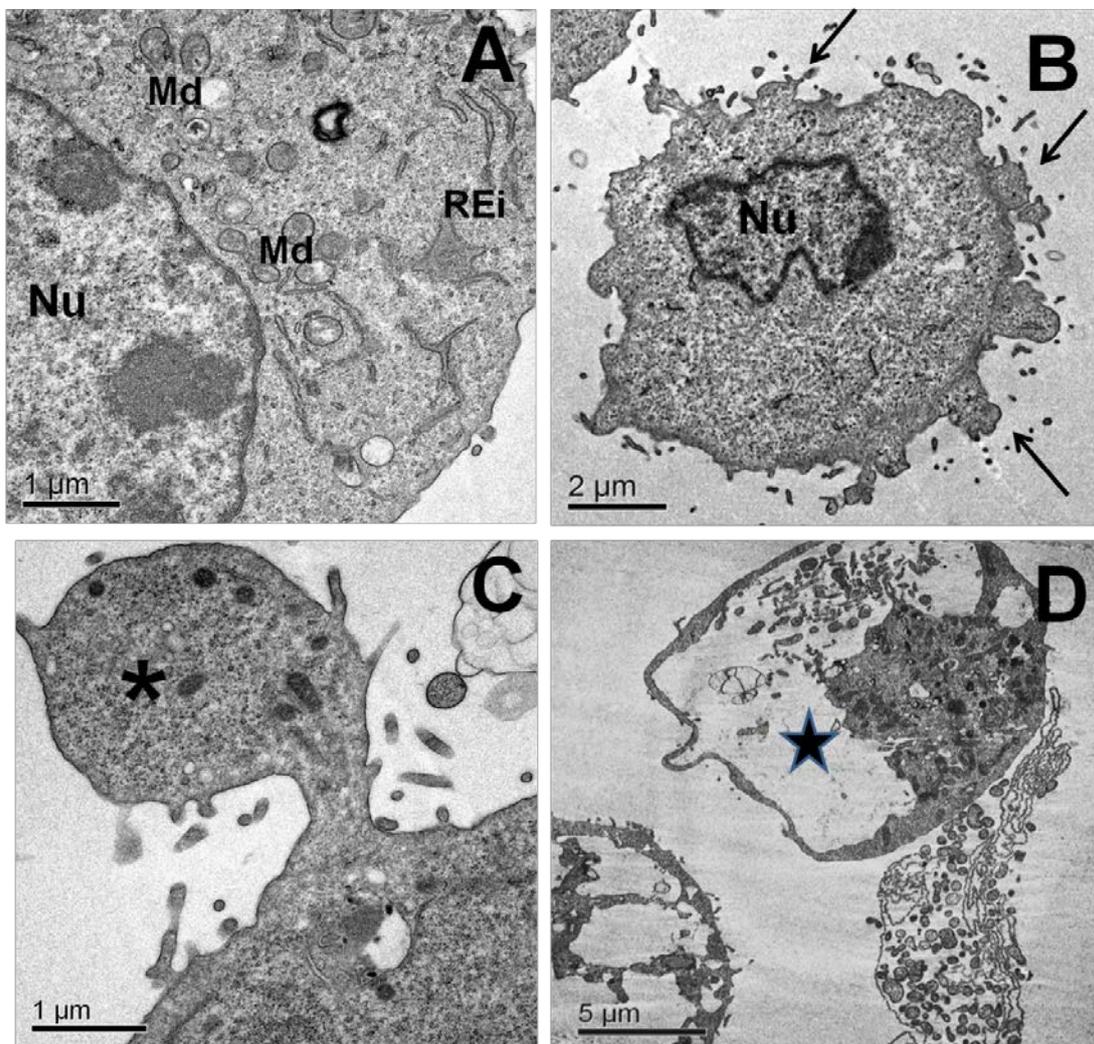


Figura 24: Eletromicrografias em MET de células 4T1 submetidas a tratamento com TFD. (A-C) TFD $25,7 \text{ J/cm}^2$. A) Mitocôndrias edemaciadas com aspecto lavado (Md) e discreto intumescimento do retículo endoplasmático rugoso (REi). B) *Blebs* (setas pretas) e núcleo irregular, (C) Evidência de um *bleb* (asterisco), (D) TFD $85,7 \text{ J/cm}^2$. Podem ser observados liberação de conteúdos citoplasmáticos, restos celulares e vacúolos intracelulares (estrela).

Uma vez que compostos presentes na NanoECr têm caráter lipofílico, as células controle (Figura 25 A) e incubadas com a NanoECr (Figura 25 B) foram processadas para MET utilizando o protocolo de marcação lipídica, pelo método do ósmio-imidazol. A Figura 25 B mostra que, após a utilização dessa metodologia as vesículas das células incubadas com a NanoECr apresentaram um núcleo na maioria das vezes elétron-lucente, porém com um halo bastante elétron-denso, sugerindo que seja conteúdo proveniente da nanoemulsão.

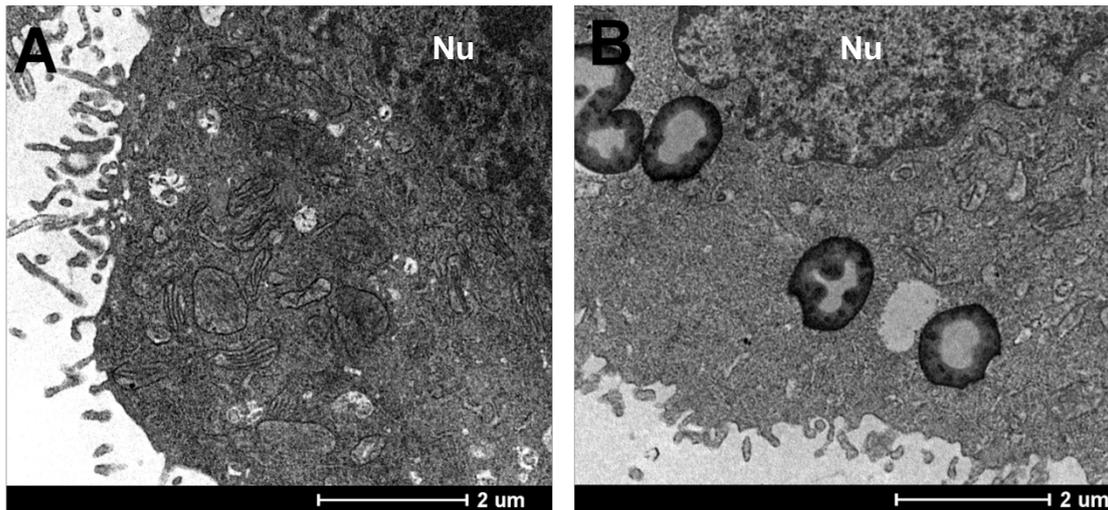


Figura 25: Eletromicrografias em MET de células 4T1 após processamento utilizando a metodologia do ósmio-imidazol. (A) Controle, (B) Célula incubada com NanoECr na ausência de irradiação. Note a presença de vesículas eletron-densas com core eletron-lucente. Nu = núcleo da célula.

7. DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou o potencial terapêutico de nanoemulsões de extratos de partes aéreas de *Arrabidaea chica* (crajiuru) no tratamento de câncer em modelo de adenocarcinoma mamário murino *in vitro*, via TFD. Além disso, a presente Tese descreve a formulação de um extrato natural, ou seja, um conjunto de substâncias que, em sinergismo ou antagonismo atuam em prol da eficácia terapêutica. É razoável atribuir os efeitos farmacológicos não a compostos específicos, mas a ações combinadas de uma variedade de constituintes. Portanto, o extrato total, deve ser considerado como o princípio ativo da planta medicinal em questão [156].

O modelo celular escolhido para a avaliação da eficácia terapêutica do extrato de *Arrabidaea chica* como FS foi a linhagem celular 4T1 de adenocarcinoma mamário murino. Este modelo, além de manter várias características do epitélio glandular mamário e ser bastante utilizado em estudos *in vitro* de câncer de mama que envolvem a avaliação dos efeitos antitumorais de diversos fármacos, equivale, em graus de invasividade e resistência a quimioterápicos, a um tumor de mama humano grau IV (ATCC® CRL02539™).

Vale ressaltar que até o presente momento, o potencial fotossensibilizante de extratos de espécies do gênero *Arrabidaea* não foi relatado na literatura. Tampouco foi descrito o emprego de quaisquer derivados destas plantas em TFD. Assim, as propriedades farmacêuticas do extrato de espécies do gênero *Arrabidaea* descritas nesta Tese são relacionadas à geração de uma série de espécies reativas de oxigênio, em especial o oxigênio singlete, com alto poder de oxidação de estruturas biológicas. Portanto, a descrição da produção de espécies reativas oxidantes após a ativação por luz dos extratos de crajiuru, bem como a atividade fotodinâmica antineoplásica decorrente deste fenômeno, trata-se de um dos diferenciais do trabalho, sendo que esta atividade farmacológica não é apresentada na literatura. Essa inovação descrita na presente Tese gerou o pedido de depósito de patente de Invenção “Composição à Base de Extratos Vegetais Derivados de Espécie do Gênero *Arrabidaea*, Seu Processo de Obtenção e suas Aplicações em Terapias

Fotodinâmicas”, de titularidade da Fundação Universidade de Brasília – FUB, da Fundação Universidade Federal do Acre – FUFAC e da Empresa Incubada NanoDynamics Consultoria e Inovação, sob o nº BR 10 2012 028363-8.

A nanoemulsão polimérica desenvolvida em nosso laboratório utilizou um polímero bioadesivo (PVM/MA) e um óleo natural (óleo de Patauá), combinação nunca utilizada antes. O polímero PVM/MA, particularmente, é um material útil para o preparo de nano e/ou microestruturas com a importante propriedade de bioadesividade – capaz de interagir fortemente com células e/ou tecidos biológicos – para liberação de fármacos. A bioadesividade é uma característica conferida pelo PVM/MA, visto que quando os seus grupamentos anidrido são hidrolisados em meio aquoso, os grupamentos carboxila resultantes aumentam a capacidade do polímero de formar ligações de hidrogênio com estruturas biológicas [80]. Além disso, o uso de óleos vegetais, tais como o de patauá (*Oenocarpus bataua*), auxilia na manutenção da atividade fotodinâmica de FS hidrofóbicos, visto que serve como uma matriz oleosa na qual o FS é dissolvido. Polímeros, como o PVM/MA, com ou sem surfactantes adicionais, conferem à composição estabilidade em meios aquosos, já que o sistema nanoestruturado assim formado possui as características de uma emulsão estável. Já foi demonstrado que nanoemulsões com gotículas com tamanhos entre 200 e 400 nm, carga de superfície negativa e estabilizadas por polímeros anfifílicos são adequadas para administração por diversas vias, entre elas a tópica e a parenteral [157], além de serem sistemas de liberação controlada [158].

A utilização de extratos de cajuru como FS, o desenvolvimento de uma nanoemulsão contendo óleo natural de patauá e a associação do extrato a essa emulsão tornam o presente trabalho inovador. Primeiramente, foram testados diferentes extratos oriundos da Amazônia quanto ao seu potencial fotodinâmico e como resultado obtivemos o extrato clorofórmico de cajuru com promissoras características para uso em TFD. O pico de absorção em 670 nm e pico de fluorescência em 690 nm somados à capacidade de geração de espécies reativas de oxigênio são características compartilhadas com outros FS já aprovados para uso em TFD como as ftalocianinas, por exemplo. Porém, a insolubilidade em meio aquoso desse extrato, por apresentar características

lipofílicas, o tornava inviável para testes *in vitro* em cultivos celulares que utilizam como meio para crescimento das linhagens celulares, soluções aquosas (DMEM). Outros compostos FS com características lipofílicas já foram descritos, como a hipericina, caracterizada por possuir baixa solubilidade e baixa estabilidade em solução [159].

Esse problema foi resolvido com o desenvolvimento de uma nanoemulsão estável em soluções aquosas, tornando o extrato biocompatível e adequado ao uso em cultivos celulares. Tanto a nanoemulsão branca (sem o extrato) quanto a nanoemulsão com o extrato apresentaram características compatíveis com um sistema estável, ou seja, índice de polidispersão abaixo de 0,25, indicando um sistema monodisperso e com baixo poder de agregação e presença de carga negativa na superfície (Mason et al., 2006). Para confirmar que as características úteis à TFD não tivessem sido perdidas, os mesmos testes de absorvância, fluorescência e geração de ERO foram repetidos com as nanoemulsões. Os resultados demonstraram que essas características foram mantidas.

É sabido que não apenas a constituição química como o tamanho e a morfologia de nanoestruturas estão relacionados a uma série de efeitos de toxicidade. As conclusões que permitam avaliar a toxicidade *in vitro* de nanoestruturas em linhagens celulares, por vezes, não alcançam concordâncias na literatura. Tais diferenças entre os estudos relatados podem ser devido aos diferentes métodos utilizados para determinar as características morfométricas das diferentes nanoestruturas [160]. No presente trabalho houve a preocupação em se determinar um protocolo adequado para a caracterização das nanoemulsões poliméricas de crajiru. Os dados mostram que esse protocolo para caracterização morfométrica de nanoestruturas com as referidas distribuições de diâmetro é a MEV sem metalização, pois é possível estabelecer limites claros das bordas das nanoestruturas no momento da contagem. Isso foi possível observar pela distribuição mais homogênea da curva representada na Figura 7 A. Na MET pode-se observar que a curva de distribuição é mais ampla e heterogênea, provavelmente em consequência de erros nas medidas, uma vez que a visualização dos limites das bordas das estruturas é menos precisa. Na MEV com metalização, o ouro altera o tamanho

das partículas e assim essa técnica se restringe à caracterização morfológica da superfície dessas nanoestruturas. A aparência rompida das nanoestruturas provavelmente foi resultado de artefatos produzidos durante a preparação da amostra.

Com uma formulação estável e morfológicamente caracterizada, o próximo passo foi testá-la em cultivos celulares. Uma das premissas fundamentais para a utilização de uma composição como agente fotossensibilizante para terapia fotodinâmica é a sua baixa toxicidade na ausência de irradiação. Desta maneira, a toxicidade da nanoemulsão do extrato de partes aéreas de cajuru foi avaliada em células 4T1 e NIH3T3 na ausência de luz. O teste de viabilidade mitocondrial (MTT) mostrou que concentrações iguais ou menores a 54 µg/mL não apresentaram potencial citotóxico às células normais de fibroblasto (linhagem celular NIH 3T3) após 24 horas de exposição, sendo esta a concentração escolhida para os testes envolvendo a TFD *in vitro*. As concentrações IC₅₀ do extrato de cajuru (~200 µg/mL) são comparáveis com os utilizados em outros trabalhos de citotoxicidade de extratos de plantas nativas [161, 162]. Um estudo realizado com extratos de plantas da Argentina revelou a presença de quatro compostos altamente citotóxicos contra as células de adenocarcinoma mamário (LM2) (Battle *et al.*, 2010). Os extratos ativos induziram 50% de morte celular nas seguintes concentrações: extratos metanólicos da flor de *Lochroma australe* (10 µg/mL) folhas de *Collaea argentina* (80 µg/mL), flores de *Jacaranda mimosifolia* (25 µg/ml) e extrato aquoso da flor de *Solanum verbascifolium* (100 µg/mL). Depois da confirmação da atividade citotóxica dos quatro extratos em células LM2, eles foram investigados em outras linhagens tumorais para avaliar a seletividade da sua citotoxicidade, mostrando resultados um pouco diferentes. A IC₅₀ obtida para *Lochroma australe* foi de 80 µg/mL em células HB4a-Ras. Para *Solanum verbascifolium* em células HB4a-Ras (célula de epitélio mamário humano transfectada com o oncogene Ras), foi obtido um IC₅₀ de 50 µg/mL usando a fração de metanol e 80 µg/mL, utilizando a fração aquosa [163]. O presente estudo utilizou a fração clorofórmica do extrato de partes aéreas de cajuru. Esses resultados demonstram que um mesmo extrato oriundo de determinadas plantas pode ter efeitos diferentes em diversas linhagens tumorais a depender

do tipo de substância contida em cada fração e da parte da planta da qual a extração é realizada e, portanto, o *screening* de vários fármacos em várias linhagens celulares se torna muito importante.

Existem alguns agentes antineoplásicos derivados de compostos de planta, entre eles, os taxanos, alcaloides de vinca e as campotecinas [132, 163]. Uma vez que plantas do gênero *Arrabidaea chica* contém esses compostos, é provável que a atividade citotóxica seja decorrente da ação desses componentes nas linhagens celulares [144]. A toxicidade não pode ser atribuída ao polímero PVM/MA, pois em um trabalho realizado pelo nosso grupo, foram testadas *in vitro*, concentrações altas (acima das utilizadas nesse experimento) desse composto tanto em NIH 3T3 quanto em 4T1 e este não se mostrou tóxico às células em nenhuma concentração utilizada [164]. A alta toxicidade, em ambas as linhagens celulares, observada apenas nas 4 maiores concentrações da NanoBr provavelmente são devido à presença do surfactante (Cremophor[®] EL) e/ou do óleo de patauá na formulação. Estudos prévios demonstraram que os derivados do óleo de rícino polioxetilado (Cremophor[®] EL) têm merecido considerável atenção para uso parenteral, mas a ocorrência de hemólise e toxicidade tem sido descrita para alguns destes compostos [165]. A composição química do patauá e suas prováveis características tóxicas ainda não são completamente conhecidas. Um estudo recente demonstrou a presença de substâncias antioxidantes em sua estrutura, entre elas antocianinas, taninos e ácidos fenólicos, conhecidos por suas atividades biológicas [166].

Para que a composição seja ativada pela luz e conseqüentemente cause dano celular, ela precisa ser captada ou adsorvida pelas células. Dois testes, um em espectrofotômetro e outro em microscopia confocal foram conduzidos no intuito de determinar o tempo necessário para interação das nanogotículas contendo o extrato de cajuru pelas linhagens celulares. A espectrofotometria mostrou que em 15 min as células 4T1 captam a maior parte dessas nanogotículas ao passo que as células NIH3T3 levam 30 minutos, mostrando maior avidéz das células tumorais em interagir com essas nanoestruturas. A microscopia confocal foi capaz de mostrar a localização das nanogotículas nas células após 15 min de exposição, pela forte marcação em vermelho,

decorrente da emissão de fluorescência da NanoECr no comprimento de onda de 690 nm. Grande parte se encontrava dispersa pelo citoplasma em ambas as linhagens. A fluorescência menos intensa na linhagem NIH3T3 é provavelmente resultado de uma menor captação de NanoECr, por essas células. O efeito da carga de nanoestruturas tem sido estudado por avaliar a sua captação celular, a localização intracelular e fototoxicidade associada. Um estudo da localização, utilizando a microscopia de fluorescência indicou que conjugados catiônicos foram encontrados na forma de agregados ligados à membrana plasmática, enquanto as formas neutras e aniônicas foram internalizadas nas organelas celulares, bem como incorporadas nas membranas [167]. Isso corrobora os resultados encontrados no presente estudo, em que as nanogotículas com carga negativa, portanto aniônicas, tiveram acúmulo intracitoplasmático. A fração metanólica polar de outros extratos naturais, como os oriundos de *Hypericum perforatum* têm propriedades físicas ótimas para uso biológico assim como o extrato do presente estudo, pois contêm vários componentes de fotossensibilização como a hipericina, que possuem picos de absorção (k_{max} 590 nm), e de fluorescência (595 nm) adequados para utilização em TFD e no diagnóstico fotodinâmico (PDD) [168].

A maior captação da NanoECr pelas células tumorais em detrimento das células normais pode ser explicado de diferentes formas. A TFD é frequentemente considerada como um tratamento de dupla especificidade. *In vivo*, essa especificidade é evidente. Ela é conseguida por um aumento do acúmulo do FS no interior do tumor, em comparação com tecidos normais e pelo fato de que a iluminação é limitada a uma localização específica. Vários mecanismos possíveis de retenção seletiva do FS em tumores incluem maiores taxas de proliferação de células neoplásicas, a falta ou reduzida drenagem linfática, alta expressão de receptores de LDL nas células tumorais (muitas FS ligam-se ao LDL), baixo pH (que facilita a absorção celular), aumento da permeabilidade vascular devido à estrutura vascular anormal do estroma tumoral caracterizados por grande espaço intersticial e aumento da produção de colágeno que se liga a porfirinas ou infiltração do tumor por macrófagos que são as armadilhas eficazes para FS hidrofóbicos [169]. Já *in vitro*, em nível celular, fatores como a carga de superfície, a morfologia e o tamanho das

nanoestruturas influenciam a interiorização pelas células. Uma vez que células neoplásicas tem metabolismo acelerado e se proliferam com maior rapidez, a internalização dessas nanoestruturas é favorecida. Muitos estudos relatam que a via endocítica (processo pelo qual as células vivas ativamente absorvem materiais através da membrana celular) seja um dos processos de internalização pelas células tumorais, seja por fagocitose, pinocitose ou endocitose mediada por receptor [170].

Um dado interessante que corrobora os dados de internalização da NanoECr pelo citoplasma das células visualizado pela microscopia confocal foi também observado na MET. A MET é capaz de mostrar danos ultraestruturais aos principais componentes intracelulares como será discutido posteriormente. No presente estudo, células incubadas com a NanoECr e não irradiadas ou irradiadas na ausência de incubação com a NanoECr não apresentaram alterações ultraestruturais indicadoras de morte celular. Um achado interessante foi a presença de vesículas elétron-densas no citoplasma das células incubadas com a NanoECr sem irradiação, sugerindo que seja conteúdo lipídico oriundo da nanoemulsão. Após o uso da pós-fixação com ósmio-imidazol, essas vesículas tornaram-se mais elétron-densas, afirmando o conteúdo lipídico das mesmas, o que sugere conteúdo oriundo da NanoECr. Imidazol é uma base orgânica fraca solúvel em água, álcool e lipídeos. O complexo ósmio-imidazol é eficiente para contrastar ácidos graxos saturados [171]. Ele ainda facilita a entrada do ósmio nas células, aumentando o contraste dos lipídeos insaturados [172]. Já na MEV, foram observadas algumas nanoestruturas associadas à membrana, bem visível nas células tratadas com a NanoECr sem irradiação (controle droga). Esse dado sugere que a NanoECr difunde-se pelo citoplasma, mas também pode ficar agregada à membrana plasmática. Nessas duas localizações, o fármaco FS é capaz de induzir morte celular [54].

Uma vez estabelecidos a concentração não tóxica na ausência de luz e o tempo ótimo de incubação da NanoECr com as células, estas foram submetidas ao tratamento fotodinâmico propriamente dito. Os resultados da TFD mediada por NanoECr sobre as células das linhagens murinas 4T1 e NIH3T3 mostraram que essa formulação quando irradiada foi capaz de induzir

toxicidade em células dessas duas linhagens em todas as densidades de energia empregadas. Esse resultado mostra a importância do direcionamento do fármaco FS ao alvo celular específico (no caso, células da linhagem 4T1), o que reforça o uso de FS de 3^o geração, em especial de nanocarreadores. Para este experimento foi utilizado um equipamento emissor de laser vermelho com comprimento de onda de emissão de 670 nm e potência máxima de saída de 50 mW. Outros estudos utilizaram fontes de luz semelhantes: laser de diodo 685 nm com potência de saída 35 mW com feixe de laser iluminando uma área de 0,38 cm², o tempo de irradiação foi de 5 minutos, resultando numa dose de energia de 28 J/cm² para cada amostra [173]. No presente trabalho, 5 minutos de irradiação foram equivalentes a 42,8 J/cm².

Vários estudos utilizando plantas como FS para TFD reportaram que a fototoxicidade às diferentes linhagens celulares é dose de energia-dependente. A TFD com nanoemulsão de crajiru em densidades de energia variando entre 1,42 J/cm² e 85,7 J/cm², levou a uma intensa redução na viabilidade celular em comparação ao controle, mostrando o potencial que essa planta tem em ser um FS. Um trabalho realizado por outros pesquisadores [174] também utilizou um componente natural denominado feoforbídeo-alfa extraído de *Scutellaria barbata* como FS para matar células de adenocarcinoma mamário (linhagem celular MDA-MB-231) a uma dose de energia alta de 84 J/cm², com um tempo de irradiação de 20 min. A irradiação sem administração do FS manteve a viabilidade celular acima de 90%. Com isso, pode-se ajustar a área a ser irradiada pelo laser com uma margem significativa, sem danificar o tecido normal que não contém o fármaco. De acordo com Kapsokalyvas, Dimitriou [175], extratos metanólicos de *Hypericum perforatum L* exercem um efeito citotóxico em linhagem de células leucêmicas HL-60, concentração e energia dependente. A morte celular acima de 90 % foi conseguida quando a hipericina foi administrada na concentração de 50 µg/mL e a duração da irradiação de 3 min, o que correspondeu à dose de energia de 74,87 J/cm². No presente estudo, morte das células de adenocarcinoma mamário próxima de 100% foi alcançada com dose de energia equivalente a 85,7 J/cm² a uma concentração de FS de 54 µg/mL após 24h da terapia, sendo esse dado observado tanto no teste de viabilidade mitocondrial (MTT) quanto na microscopia confocal pela

marcação com laranja de acridina e brometo de etídio. Nesse teste, foi observado que apenas 2% de células continuam viáveis após TFD com essa alta dose de energia, e morrem quando deixadas por mais de 24h em cultivo, mostrando que as alterações manifestadas pelas células após a terapia são também tempo-dependente. Isso foi demonstrado em outro estudo em que os danos ultraestruturais aumentaram progressivamente - 1h a 24h - após a aplicação da TFD [176].

Como observado na Figura 18, as células cancerosas conseguiram se proliferar após 24h de incubação quando irradiadas com energias inferiores a $85,7\text{J}/\text{cm}^2$. Isso pode ser explicado pelo acúmulo de erros no material genético da geração de células resultantes da duplicação da geração inicial de células sobreviventes ao tratamento. Possivelmente, as células das linhagens 4T1 que inicialmente sobreviveram à TFD mediada pela NanoECr, reuniram alterações no material genético que foram transferidas para as células-filhas subsequentes. Essa segunda geração de células pode ter apresentado um excesso de erros genéticos com possibilidade de reparação e de proliferação, o que resultou na “esquiva” do processo de morte celular por apoptose, típico de células tumorais [177].

A dose de energia necessária para a DL_{50} da NanoECr em células de adenocarcinoma mamário foi alta ($>4,2\text{ J}/\text{cm}^2$) em comparação com outros já reportados. Battle, Mamone [163] utilizando a fração metanólica da *Collaea argentina* teve uma $DL_{50} = 0,43\text{ J}/\text{cm}^2$ e da *Macfadyena unguis cati* de $DL_{50} = 0,53\text{ J}/\text{cm}^2$ células LM3 (tumor metastático de fígado), doses de energia muito inferiores aos utilizados no presente estudo. Uma vez que o espectro dos FS disponíveis até hoje é diferente no que diz respeito às características químicas, estas propriedades e a eficácia da TFD resultante dependem de características biológicas tais como a arquitetura vascular do tumor, mecanismos de captação do FS, e acúmulo específico do FS no sítio tumoral, fatores que estão intimamente ligados a características tanto dos FS como a tendência em formar agregados, a ligar-se a macromoléculas (por exemplo, LDL, lipoproteínas de baixa densidade), ou a mudarem a sua lipofilia num microambiente tumoral mais ácido como das células tumorais [178, 179]. Dessa forma, uma mesma substância sendo aplicada em um tipo tumoral, não necessariamente terá o

mesmo efeito em outro tipo qualquer. Em particular, depois de escolher uma fonte de luz e um FS, o resultado do processo é adicionalmente influenciado pela concentração de FS, a presença de oxigênio molecular, o intervalo entre a administração do FS e da luz, e a correta dosimetria desta. Assim, é necessário descobrir qual FS é a melhor escolha para determinado tipo de tumor em particular [180] e formular protocolos validados para obter resultados eficazes e confiáveis.

Na maioria das aplicações, a função principal da TFD é matar células indesejadas, porém não apenas a citotoxicidade é importante, mas também os mecanismos envolvidos na morte dessas células [181]. Por muito tempo, a medicina tradicional para o tratamento de doenças com extratos vegetais se baseou na experiência prática. Portanto, o esclarecimento dos mecanismos de ação dos componentes desses extratos é de suma importância para o desenvolvimento de suas aplicações. Componentes isolados e extraídos do cajuru vêm sendo investigados quanto à atividade biológica [145, 182]. Os mecanismos de ação de outras plantas como, por exemplo, *Lonicera japonica* na atividade anti-inflamatória e anti-tumoral também tem sido relatados [183-185].

Tem sido mostrado em alguns trabalhos que a apoptose é a forma mais rápida e dominante de morte celular que ocorre após a TFD [186]. No entanto, a maior parte destes trabalhos investigou apenas a apoptose e é possível que células também sofram necrose após a terapia. De fato, a TFD inibe o crescimento tumoral por diferentes vias de morte e sua eficácia é dependente do tipo de linhagem celular e dos FS utilizados. A apoptose é um processo ativo fisiológico e quase ausente em células cancerosas. É caracterizada por alterações morfológicas distintas, incluindo encolhimento da célula, formação de *blebs*, condensação de cromatina, fragmentação do DNA e a formação de corpos apoptóticos [187]. A aplicação terapêutica da indução da apoptose está sendo considerada como um modelo para o desenvolvimento de fármacos antitumorais [188]. Uma vez que a literatura descreve que há diferenças no tipo de morte celular a depender, entre outros fatores, da dose de energia utilizada para irradiar as células, o presente estudo verificou essa informação e investigou o tipo de morte celular que ocorria quando as células foram irradiadas com as seguintes doses de energia: 25,7 J/cm² e 85,7 J/cm². As

alterações celulares em cada um desses grupos serão tratadas separadamente.

Na dose de $25,7\text{J/cm}^2$, prevaleceram danos sugestivos de morte por apoptose, visualizados em microscopia confocal pela marcação de corpos apoptóticos pelo protocolo do laranja de acridina e brometo de etídio. O laranja de acridina é um marcador fluorescente seletivo para ácidos nucleicos usado para determinação de ciclo celular. Esta substância penetra nas membranas celulares e interage com o DNA e o RNA por intercalação ou atração eletrostática, respectivamente. Ligado ao DNA, este corante apresenta espectro semelhante ao da fluoresceína, com excitação máxima em 502 nm e emissão em 525 nm (verde). Quando se associa ao RNA, a excitação passa a 460 nm e emissão na faixa do laranja (620 nm) podendo chegar a 650 nm. O laranja de acridina também reage com compartimentos ácidos como os lisossomas e se torna protonado e sequestrado. Nessas condições de pH baixo, ele emite fluorescência laranja quando excitado por luz azul e portanto pode ser utilizado para identificar a presença de corpos apoptóticos, fluorescendo fortemente em laranja essas estruturas [155].

Utilizando concentrações de extratos naturais semelhantes ao presente trabalho (50-150 $\mu\text{g/mL}$) e doses de energia muito menores (0,4-1,2 J/cm^2), Yip et al. [183] demonstraram que o extrato aquoso de *Lonicera japonica* exibe significativa fototoxicidade em células CH27 induzindo principalmente morte celular por apoptose. De acordo com as características fenotípicas, as células apresentaram uma morfologia arredondada e, eventualmente, se separavam do substrato após a TFD com extratos da referida planta, achados semelhantes aos encontrados no tratamento de 4T1 com *Arrabiadaea chica*, no nosso estudo. Essas mudanças na morfologia celular refletem alterações nos filamentos de actina, nos microfilamentos citoplasmáticos predominantes nas células, cujas propriedades biofísicas podem contribuir para a manutenção da sua integridade estrutural [189]. No presente estudo, nesse mesmo grupo tratado com TFD a $25,7\text{ J/cm}^2$ a microscopia eletrônica de transmissão das células revelou danos ultraestruturais típicos de apoptose, sejam eles presença de *blebs*, intumescimento de mitocôndria e retículo endoplasmático rugoso e fragmentação nuclear. TFD utilizando ALA como FS e uma dose de energia de

3 J/cm² levou a danos ultraestruturais semelhantes em células PAM 212 – queratinócitos murinos [176]. Os danos mais frequentemente observados são aqueles causados nas mitocôndrias e isso pode ser explicado uma vez que elas são as organelas de processamento central, na maioria das vias de apoptose. Os sinais dos receptores de morte das superfícies celulares ou a partir de regiões danificadas convergem para as mitocôndrias, levando a permeabilização de ambas as membranas mitocondriais, dissipação do potencial transmembranário da membrana interna ($\Delta\Psi_m$), e de liberação de proteínas relacionadas com a apoptose, tais como citocromo C, fator indutor de apoptose (FIA), SMAC (segundo ativador mitocôndrias derivado de caspases), e de certas pró-caspases [181].

A TFD induz apoptose via dois mecanismos principais: mediado pela mitocôndria ou via intrínseca, como já mencionado, e mediado por receptores de morte ou via extrínseca, muitas vezes localizados nas membranas celulares [190]. A maioria dos FS hidrofóbicos se acumula na membrana plasmática, o que a torna o alvo principal para eventos fototóxicos [186]. Para verificar a interação da NanoECr com as membranas das células da linhagem 4T1, estas foram tratadas, processadas e analisadas em microscopia eletrônica de varredura. Puderam ser observados danos à membrana plasmática no grupo tratado com a dose de energia 25,7J/cm² (colapso de membrana) e a presença de algumas nanoestruturas associadas à membrana, bem visível nas células tratadas com a NanoECr sem irradiação. Essa interação é responsável pela TFD causar danos à membrana plasmática após a irradiação que se manifestam pelo intumescimento, formação de *blebs*, derramamento de vesículas contendo membrana plasmática, enzimas citosólicas e lisossomais, redução do transporte ativo, aumento da permeabilidade e despolarização da membrana plasmática [54].

Com a dose de energia de 85,7 J/cm², as células sofreram necrose em sua totalidade. Isso pode ser observado tanto na microscopia confocal pela marcação com laranja de acridina e brometo de etídio (já descrito), quanto na microscopia eletrônica de transmissão. Na microscopia confocal, 100% das células foram marcadas com brometo de etídio (células fluoresceram em vermelho), indicando morte celular por necrose. O brometo de etídio é um

agente intercalante fluorescente usado frequentemente como marcador de ácidos nucleicos cujo comprimento de onda de excitação é 405 nm e emissão em vermelho (670 nm), e é uma molécula que penetra apenas em células cuja membrana plasmática esteja rompida e, portanto é muito utilizado como marcador de necrose em ensaios de morte celular [155]. Na microscopia eletrônica de transmissão, as células apresentaram características típicas de necrose, com elevados níveis de danos celulares, em que a integridade da membrana plasmática é perdida, ocorrendo lise de células, colapso da membrana plasmática com liberação de componentes intracelulares, perda da densidade citoplasmática com a presença de grandes vacúolos no interior das células. Ademais, danos à membrana plasmática foram bastante visíveis por microscopia eletrônica de varredura nas células irradiadas com $85,7\text{J}/\text{cm}^2$, especificamente a presença de grandes lacunas, perfurações e perda total da integridade de membrana.

Já foi relatado em diversos trabalhos que doses altas de TFD (uma alta concentração de FS ou uma fluência de luz alta ou ambos) tende a causar a morte celular por necrose, enquanto a TFD administrada em doses mais baixas tendem a predispor as células para morte celular apoptótica [191]. Nagata, Obana [192] utilizando o FS anfifílico ATX-S10 em células de melanoma maligno humano verificaram que as doses de luz que levaram a menos de 70% de citotoxicidade induziram, principalmente, morte por apoptose, enquanto, a maioria das células necróticas apareceu com doses que levaram a 99% de citotoxicidade. Esse dado corrobora alguns resultados encontrados no presente estudo, no qual morte celular de 100% observada nos testes de viabilidade mitocondrial correspondeu no ensaio de laranja de acridina e brometo de etídio a necrose. Fatores que induzem necrose incluem localização extra-mitocondrial dos FS, doses altas de energia e depleção de glicose. O genótipo celular também pode influenciar a forma de morte celular pós TFD [revisado por 193]. Devido à curta meia-vida do $^1\text{O}_2$, medidos em nanossegundos, esta molécula citotóxica pode difundir-se apenas até 20 nm, em células [194]. Assim, a localização subcelular do FS determina quais organelas serão danificadas. Os FS podem também ser encontrados em outros locais, incluindo membrana plasmática, retículo endoplasmático e do complexo de Golgi aparentemente em

concentrações suficientes para mediar a citotoxicidade. Assume-se frequentemente que FS que se localizam na mitocôndria são mais propensos a induzir a apoptose e aqueles localizados nas membranas plasmáticas em induzir necrose. A fotoativação de hipericina, um importante componente FS, tem sido associada a apoptose quando administrada em concentrações mais baixas e baixo tempo pós-irradiação. Aumentando a concentração de hipericina e/ou prolongando o tempo pós-irradiação ocorreu aumento da morte celular por necrose [135]. Na prática, esses mecanismos de morte celular induzida por TFD podem ser mais facilmente observados *in vitro*, com concentrações definidas do FS e das taxas de fluência da luz. *In vivo*, a situação é mais complexa e a destruição do tumor provavelmente é resultado de uma mistura de morte celular por apoptose e necrose [193].

Uma vez que a ideia é que tratamentos contra o câncer matem as células, com regressão total da massa tumoral, qual é a importância de se estudar e saber os tipos de morte induzidos por essas terapias? Primeiramente, é razoável relatar que uma grande massa de proteínas provenientes de células cancerosas necróticas destruídas cause bloqueio rápido e irreversível de células saudáveis implicando em efeitos adversos potencialmente fatais [195]. Já a apoptose permite que as células cancerosas sejam destruídas causando baixa inflamação sob influência da TFD. Essa baixa inflamação é importante para ativação do sistema imune auxiliando na destruição das células alvo [Robertson et al., 196]. Por isso, vários estudos mostram que é essencial destruir células cancerosas via mecanismos apoptóticos com alguma necrose para fortalecer a indução inflamatória [181].

Os resultados deste trabalho, realizados *in vitro*, constituíram a primeira etapa na investigação de extratos vegetais oriundos da Amazônia como novos fotossensibilizantes para uso em TFD. Com os resultados obtidos nas experimentações e discussões da presente Tese de Doutorado, conclui-se que o extrato clorofórmico das partes aéreas da planta *Arrabidaea chica* associado a nanoemulsões poliméricas de PVM/MA é uma potencial formulação fotossensibilizante para o tratamento e eliminação de células tumorais de adenocarcinoma mamário.

8. CONCLUSÃO

Baseado nos resultados obtidos nas condições de realização do presente experimento pode-se chegar às seguintes conclusões:

- O extrato de partes aéreas de cajuru livre apresentou espectros de absorvância e fluorescência dentro da janela óptica de absorção (600 a 800 nm) e produziu ERO *in vitro* quando submetidos ao teste de decaimento do benzofurano;

- Foi produzida uma nanoemulsão polimérica estável com extratos de partes aéreas de cajuru, com população monodispersa e carga de superfície negativa;

- O extrato de partes aéreas de cajuru mesmo após incorporação em nanoemulsão polimérica apresentou espectros de absorvância e fluorescência dentro da janela óptica de absorção (600 a 800 nm) e produziu ERO *in vitro* quando submetidos ao teste de decaimento do benzofurano;

- A nanoemulsão polimérica de extratos de partes aéreas de cajuru não foi tóxica na concentração de 54µg/mL para as linhagens celulares cancerosas de adenocarcinoma mamário murino (4T1) e linhagens celulares normais de fibroblasto murino (NIH3T3) quando estas foram submetidas a testes sem irradiação com luz;

- A nanoemulsão polimérica de extratos de partes aéreas de cajuru foi tóxica na concentração de 54µg/mL para as linhagens celulares cancerosas de adenocarcinoma mamário murino (4T1) e linhagens celulares normais de fibroblasto murino (NIH3T3) quando estas foram submetidas a testes com irradiação com luz em todas as doses de energia utilizadas;

- Em doses de energia de 25,7 J/cm² a nanoemulsão de extrato de partes aéreas de cajuru induz morte celular por apoptose;

- Em doses de energia $85,7 \text{ J/cm}^2$ a nanoemulsão de extrato de partes aéreas de cajuru induz morte celular por necrose.

9. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Considerando o fato de que várias doenças não têm uma resposta definitiva na medicina convencional, um esforço para reconhecer o potencial de sistemas alternativos de tratamento e de combinações de vários sistemas validados através de métodos universalmente aceitáveis pode vir a ser benéfico para a comunidade humana em geral.

O extrato natural de partes aéreas de *Arrabidaea chica*, objeto de estudo da presente Tese oferece a perspectiva de que ela seja utilizada como um fotossensibilizante de 3ª geração na TFD. Além disso, associada à nanotecnologia, com objetivo de melhorar a liberação do fotossensibilizante ao tecido alvo e ao mesmo tempo de aumentar a especificidade e eficácia da TFD, a presente formulação de nanoemulsão polimérica de extratos de partes aéreas de *Arrabidaea chica* agrega valor e contribui para a complexidade dos estudos em TFD.

É importante lembrar que uma limitação da TFD é que ela não pode ser um processo de cura para tumores grandes e disseminados. No entanto, mesmo para uma doença avançada, como o câncer de mama em grau IV, a TFD pode melhorar a qualidade de vida dos pacientes e prolongar a sobrevivência, uma vez que pode ser utilizado como terapia adjuvante no transcirúrgico ou pós-cirurgia, evitando, quando possível, a mastectomia radical. Para tumores de mama pequenos e localizados a TFD pode ser um procedimento curativo com resultados minimamente invasivos e cosméticos excelentes. Dessa forma, a presente formulação tem potencial para ser utilizada juntamente com a TFD como terapia adjuvante – no trans ou no pós-cirúrgico, reduzindo assim a mutilação causada pelos procedimentos cirúrgicos radicais.

Essa foi a primeira etapa na investigação de extratos vegetais oriundos da Amazônia como novos fotossensibilizantes para uso em TFD. Estudos *in vivo* são necessários para avaliar não somente a estabilidade da nanoemulsão polimérica em organismos vivos como também as características necessárias para considerá-la um fármaco FS para uso em TFD. Além disso, é de extrema importância a identificação e caracterização química das substâncias ativas

presentes nesse extrato para que possamos controlar a concentração dos componentes bioativos nas subseqüentes extrações.

Por fim, a valorização da importância dos produtos naturais como fontes de fármacos estruturalmente novos e a enorme biodiversidade das florestas da América do Sul devem ser priorizados. Dessa forma, um esforço conjunto deve ser firmado para que muitos compostos com atividades biológicas sejam obtidos de diversos biomas, inclusive de biomas brasileiros, e com participação de pesquisadores brasileiros.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] INCA. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer – INCA, Estimativas da incidência e mortalidade por câncer. . Rio de Janeiro: INCA. Disponível em: <http://www2incagovbr/> no dia 07/11/2012 às 15h30 2011.
- [2] Dolmans DE, Kadambi A, Hill JS, Flores KR, Gerber JN, Walker JP, et al. Targeting tumor vasculature and cancer cells in orthotopic breast tumor by fractionated photosensitizer dosing photodynamic therapy. *Cancer research*. 2002;62:4289-94.
- [3] Thierry B. Drug nanocarriers and functional nanoparticles: applications in cancer therapy. *Current drug delivery*. 2009;6:391-403.
- [4] Bruxel F, Laux M, Wild LB, Fraga M, Koester LS, Teixeira HF. Nanoemulsões como sistemas de liberação parenteral de fármacos. *Química Nova*. 2012;35:1827-40.
- [5] Jing X, Deng L, Gao B, Xiao L, Zhang Y, Ke X, et al. A novel polyethylene glycol mediated lipid nanoemulsion as drug delivery carrier for paclitaxel. *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine*. 2013.
- [6] Cragg GM, Newman DJ. Plants as a source of anti-cancer agents. *J Ethnopharmacol*. 2005;100:72-9.
- [7] Ribeiro A, Melo M, Cassali G, Ferraz V, Cardoso G, Telles T, et al. Antileukemic potential of crude extracts of *Arrabidaea chica*. XII International Congress of Toxicology Barcelona, Spain, Abstract Adenda, p46. 2010.
- [8] Ruddon RW. *Cancer Biology*: Oxford University Press; 2007.
- [9] INCA. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer – INCA, Estimativas da incidência e mortalidade por câncer. . Rio de Janeiro: INCA. Disponível em: <http://www2incagovbr/> no dia 10/11/2012 às 14h 2012.
- [10] Leopold E. *A Darker Ribbon: Breast Cancer, Women, and their Doctors in the Twentieth Century*. Beacon Press, ISBN 978-0807065136, Boston. 1999.
- [11] Olson JE. *Bathsheba's Breast: Women, Cancer, and History*2002.
- [12] Ferenc P, Solár P, Mikeš J, Koval' K, Fedoročko P. *Breast Cancer and Current Therapeutic Approaches: From Radiation to Photodynamic Therapy*. Breast Cancer Faculty of Science, Institute of Biology and Ecology, P. J. Šafárik University in Košice, Slovakia2011.

- [13] Forrest AP. Beatson: hormones and the management of breast cancer. *Journal of the Royal College of Surgeons of Edinburgh*. 1982;27:253-63.
- [14] Shepard HM, Jin P, Slamon DJ, Pirot Z, Maneval DC. Herceptin. *Handbook of experimental pharmacology*. 2008:183-219.
- [15] Piccart-Gebhart MJ, Procter M, Leyland-Jones B, Goldhirsch A, Untch M, Smith I, et al. Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. *The New England journal of medicine*. 2005;353:1659-72.
- [16] Berry DA, Cronin KA, Plevritis SK, Fryback DG, Clarke L, Zelen M, et al. Effect of screening and adjuvant therapy on mortality from breast cancer. *The New England journal of medicine*. 2005;353:1784-92.
- [17] Gilbert FJ. Breast cancer screening in high risk women. *Cancer imaging : the official publication of the International Cancer Imaging Society*. 2008;8 Spec No A:S6-9.
- [18] Hellerhoff K. [Digital breast tomosynthesis : technical principles, current clinical relevance and future perspectives]. *Der Radiologe*. 2010;50:991-8.
- [19] NIH. National Institute of Health, US (ed). Disponível em: www.cancer.gov no dia 10/11/2012 às 15h. 2012.
- [20] Pirhard C, das Mercês N. Fatores De Risco Para Câncer De Mama: Nível De Conhecimento Dos Acadêmicos De Uma Universidade. *Rev enferm*. 2008;17:102-6.
- [21] Polyak K. Breast cancer: origins and evolution. *The Journal of clinical investigation*. 2007;117:3155-63.
- [22] Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98:10869-74.
- [23] Sorlie T, Wang Y, Xiao C, Johnsen H, Naume B, Samaha RR, et al. Distinct molecular mechanisms underlying clinically relevant subtypes of breast cancer: gene expression analyses across three different platforms. *Bmc Genomics*. 2006;7:127.
- [24] Park SY, Lee HE, Li H, Shipitsin M, Gelman R, Polyak K. Heterogeneity for stem cell-related markers according to tumor subtype and histologic stage in breast cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2010;16:876-87.
- [25] Marusyk A, Almendro V, Polyak K. Intra-tumour heterogeneity: a looking glass for cancer? *Nature reviews Cancer*. 2012;12:323-34.

- [26] Ferenc P. [Breast cancer and adrenalectomy]. *Orvosi hetilap*. 1970;111:1563-70.
- [27] Olson B. Breast cancer support resource available. *The Oregon nurse*. 2002;67:6.
- [28] Monteiro G, Novaes JR, Carvalho Junior J, Rio J, Ribeiro L, Silva L, et al. O dilema da decisão de Mastectomia Bilateral como prevenção do Câncer de Mama: aspectos éticos e bioéticos. *Bioethikos*. 2011;5:443-50.
- [29] Döbrönte Z, Wittmann T, Karácsony G. Rapid Development of Malignant Metastases in the Abdominal Wall after Laparoscopy. *Endoscopy*. 1978;10:127,30.
- [30] Stockdale AD, Pocock TJ. Abdominal wall metastasis following laparoscopy: a case report. *European journal of surgical oncology : the journal of the European Society of Surgical Oncology and the British Association of Surgical Oncology*. 1985;11:373-5.
- [31] Fernando IN. The role of radiotherapy in patients undergoing mastectomy for carcinoma of the breast. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*. 2000;12:158-65.
- [32] Demaria S, Formenti SC. Sensors of ionizing radiation effects on the immunological microenvironment of cancer. *International journal of radiation biology*. 2007;83:819-25.
- [33] Gray LH, Conger AD, Ebert M, Hornsey S, Scott OC. The concentration of oxygen dissolved in tissues at the time of irradiation as a factor in radiotherapy. *The British journal of radiology*. 1953;26:638-48.
- [34] Sinha R, Kim GJ, Nie S, Shin DM. Nanotechnology in cancer therapeutics: bioconjugated nanoparticles for drug delivery. *Mol Cancer Ther*. 2006;5:1909-17.
- [35] Dean M, Fojo T, Bates S. Tumour stem cells and drug resistance. *Nature reviews Cancer*. 2005;5:275-84.
- [36] Pegram MD, Pienkowski T, Northfelt DW, Eiermann W, Patel R, Fumoleau P, et al. Results of two open-label, multicenter phase II studies of docetaxel, platinum salts, and trastuzumab in HER2-positive advanced breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute*. 2004;96:759-69.
- [37] Perez EA, Suman VJ, Rowland KM, Ingle JN, Salim M, Loprinzi CL, et al. Two concurrent phase II trials of paclitaxel/carboplatin/trastuzumab (weekly or every-3-week schedule) as first-line therapy in women with HER2-

overexpressing metastatic breast cancer: NCCTG study 983252. *Clinical breast cancer*. 2005;6:425-32.

[38] Robert N, Leyland-Jones B, Asmar L, Belt R, Ilegbodu D, Loesch D, et al. Randomized phase III study of trastuzumab, paclitaxel, and carboplatin compared with trastuzumab and paclitaxel in women with HER-2-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol*. 2006;24:2786-92.

[39] Love RR, Koroltchouk V. Tamoxifen therapy in breast cancer control worldwide. *Bulletin of the World Health Organization*. 1993;71:795-803.

[40] Allison R, Mang T, Hewson G, Snider W, Dougherty D. Photodynamic therapy for chest wall progression from breast carcinoma is an underutilized treatment modality. *Cancer*. 2001;91:1-8.

[41] von Tappeiner H, Jesionek H. Therapeutische versuche mit fluoreszierenden stoffen. *Munch Med Wochenschr*. 1903;47:2042-4.

[42] Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, Larkin J, Endesfelder D, Gronroos E, et al. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *The New England journal of medicine*. 2012;366:883-92.

[43] Diamond I, McDonagh A, Wilson C, Granelli S, Nielsen S, Jaenicke R. Photodynamic Therapy Of Malignant Tumours. *The Lancet*. 1972;300:1175-7.

[44] Dougherty TJ, Grindey GB, Fiel R, Weishaupt KR, Boyle DG. Photoradiation therapy. II. Cure of animal tumors with hematoporphyrin and light. *Journal of the National Cancer Institute*. 1975;55:115-21.

[45] Kelly JF, Snell ME. Hematoporphyrin derivative: a possible aid in the diagnosis and therapy of carcinoma of the bladder. *The Journal of urology*. 1976;115:150-1.

[46] Dolmans DE, Fukumura D, Jain RK. Photodynamic therapy for cancer. *Nat Rev Cancer*. 2003;3:380-7.

[47] Mitra A, Stables GI. Topical photodynamic therapy for non-cancerous skin conditions. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2006;3:116-27.

[48] Kübler AC. Photodynamic therapy. *Medical Laser Application*. 2005;20:37-45.

[49] Macdonald IJ, Dougherty TJ. Basic principles of photodynamic therapy. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*. 2001;5:105-29.

[50] Allison RR, Downie GH, Cuenca R, Hu X-H, Childs CJH, Sibata CH. Photosensitizers in clinical PDT. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2004;1:27-42.

- [51] Triesscheijn M, Baas P, Schellens JH, Stewart FA. Photodynamic therapy in oncology. *Oncologist*. 2006;11:1034-44.
- [52] Foote CS. Definition of Type-I and Type-II Photosensitized Oxidation. *Photochem Photobiol*. 1991;54:659-.
- [53] Moan J, Berg K. The Photodegradation Of Porphyrins In Cells Can Be Used To Estimate The Lifetime Of Singlet Oxygen. *Photochemistry and Photobiology*. 1991;53:549-53.
- [54] Dougherty TJ, Gomer CJ, Henderson BW, Jori G, Kessel D, Korbelik M, et al. Photodynamic therapy. *J Natl Cancer Inst*. 1998;90:889-905.
- [55] Morlet L, Vonarx-Coinsmann V, Lenz P, Foutier MT, de Brito LX, Stewart C, et al. Correlation between meta(tetrahydroxyphenyl)chlorin (m-THPC) biodistribution and photodynamic effects in mice. *Journal of photochemistry and photobiology B, Biology*. 1995;28:25-32.
- [56] Veenhuizen R, Oppelaar H, Ruevekamp M, Schellens J, Dalesio O, Stewart F. Does tumour uptake of Foscan determine PDT efficacy? *Int J Cancer*. 1997;73:236-9.
- [57] Ris HB, Altermatt HJ, Stewart CM, Schaffner T, Wang Q, Lim CK, et al. Photodynamic therapy with m-tetrahydroxyphenylchlorin in vivo: optimization of the therapeutic index. *Int J Cancer*. 1993;55:245-9.
- [58] Chen B, de Witte PA. Photodynamic therapy efficacy and tissue distribution of hypericin in a mouse P388 lymphoma tumor model. *Cancer Letters*. 2000;150:111-7.
- [59] Cramers P, Ruevekamp M, Oppelaar H, Dalesio O, Baas P, Stewart FA. Foscan® uptake and tissue distribution in relation to photodynamic efficacy. *Br J Cancer*. 2003;88:283-90.
- [60] Triesscheijn M, Ruevekamp M, Aalders M, Baas P, Stewart FA. Outcome of mTHPC Mediated Photodynamic Therapy is Primarily Determined by the Vascular Response. *Photochem Photobiol*. 2005;81:1161-7.
- [61] Qiang YG, Yow CM, Huang Z. Combination of photodynamic therapy and immunomodulation: current status and future trends. *Medicinal research reviews*. 2008;28:632-44.
- [62] Gomer CJ, Razum NJ. Acute skin response in albino mice following porphyrin photosensitization under oxic and anoxic conditions. *Photochem Photobiol*. 1984;40:435-9.

- [63] Tromberg BJ, Orenstein A, Kimel S, Barker SJ, Hyatt J, Nelson JS, et al. In vivo tumor oxygen tension measurements for the evaluation of the efficiency of photodynamic therapy. *Photochem Photobiol.* 1990;52:375-85.
- [64] Pogue BW, Braun RD, Lanzen JL, Erickson C, Dewhirst MW. Analysis of the heterogeneity of pO₂ dynamics during photodynamic therapy with verteporfin. *Photochem Photobiol.* 2001;74:700-6.
- [65] Messmann H, Mlkvy P, Buonaccorsi G, Davies CL, MacRobert AJ, Bown SG. Enhancement of photodynamic therapy with 5-aminolaevulinic acid-induced porphyrin photosensitisation in normal rat colon by threshold and light fractionation studies. *British journal of cancer.* 1995;72:589-94.
- [66] Pogue BW, Hasan T. A theoretical study of light fractionation and dose-rate effects in photodynamic therapy. *Radiat Res.* 1997;147:551-9.
- [67] Sharman WM, Allen CM, van Lier JE. Photodynamic therapeutics: basic principles and clinical applications. *Drug discovery today.* 1999;4:507-17.
- [68] Detty MR, Gibson SL, Wagner SJ. Current clinical and preclinical photosensitizers for use in photodynamic therapy. *J Med Chem.* 2004;47:3897-915.
- [69] Yano S, Hirohara S, Obata M, Hagiya Y, Ogura S, Ikeda A, et al. Current states and future views in photodynamic therapy. *J Photoch Photobio C.* 2011;12:46-67.
- [70] O'Connor AE, Gallagher WM, Byrne AT. Porphyrin and Nonporphyrin Photosensitizers in Oncology: Preclinical and Clinical Advances in Photodynamic Therapy. *Photochem Photobiol.* 2009;85:1053-74.
- [71] Huang Y-Y, Sharma SK, Dai T, Chung H, Yaroslavsky A, Garcia-Diaz M, et al. Can nanotechnology potentiate photodynamic therapy ? *Nanotechnol Rev.* 2012;1 111–46.
- [72] Greish K. Enhanced permeability and retention (EPR) effect for anticancer nanomedicine drug targeting. *Methods Mol Biol.* 2010;624:25-37.
- [73] Torchilin VP. Targeted pharmaceutical nanocarriers for cancer therapy and imaging. *AAPS J.* 2007;9:E128-47.
- [74] Bhaskar S, Tian F, Stoeger T, Kreyling W, de la Fuente JM, Grazu V, et al. Multifunctional Nanocarriers for diagnostics, drug delivery and targeted treatment across blood-brain barrier: perspectives on tracking and neuroimaging. *Particle and fibre toxicology.* 2010;7:3.

- [75] Junping W, Takayama K, Nagai T, Maitani Y. Pharmacokinetics and antitumor effects of vincristine carried by microemulsions composed of PEG-lipid, oleic acid, vitamin E and cholesterol. *International journal of pharmaceutics*. 2003;251:13-21.
- [76] Mason TG, Wilking JN, Meleson K, Chang CB, Graves SM. Nanoemulsions: formation, structure, and physical properties. *Journal of Physics: Condensed Matter*. 2006;18:R635–R66.
- [77] Primo FL, Bentley MV, Tedesco AC. Photophysical studies and in vitro skin permeation/retention of Foscan/nanoemulsion (NE) applicable to photodynamic therapy skin cancer treatment. *Journal of nanoscience and nanotechnology*. 2008;8:340-7.
- [78] Wang J, Maitani Y, Takayama K. Antitumor effects and pharmacokinetics of aclacinomycin A carried by injectable emulsions composed of vitamin E, cholesterol, and PEG-lipid. *Journal of pharmaceutical sciences*. 2002;91:1128-34.
- [79] Tamilvanan S, Khanum R, Senthilkumar SR, Muthuraman M, Rajasekharan T. Studies on ocular and parenteral application potentials of azithromycin-loaded anionic, cationic and neutral-charged emulsions. *Current drug delivery*. 2013;10:572-86.
- [80] Yoncheva K, Lizarraga E, Irache JM. Pegylated nanoparticles based on poly(methyl vinyl ether-co-maleic anhydride): preparation and evaluation of their bioadhesive properties. *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*. 2005;24:411-9.
- [81] Schubert EF. *Light-emitting diode*. Cambridge Univ Pr. 2006.
- [82] Vogl TJ, Eichler K, Mack MG, Zangos S, Herzog C, Thalhammer A, et al. Interstitial photodynamic laser therapy in interventional oncology. *European radiology*. 2004;14:1063-73.
- [83] Brancalion L, Moseley H. Laser and non-laser light sources for photodynamic therapy. *Lasers in medical science*. 2002;17:173-86.
- [84] Bonnett R. Photosensitizers of the Porphyrin and Phthalocyanine Series for Photodynamic Therapy. *Chem Soc Rev*. 1995;24:19-33.
- [85] Castano AP, Demidova TN, Hamblin MR. Mechanisms in photodynamic therapy: part one—photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2004;1:279-93.

- [86] Anderson RR, Parrish JA. The optics of human skin. *J Invest Dermatol.* 1981;77:13-9.
- [87] Svaasand LO. Optical dosimetry for direct and interstitial photoradiation therapy of malignant tumors. *Progress in clinical and biological research.* 1984;170:91-114.
- [88] Wilson BC, Jeeves WP, Lowe DM. In vivo and post mortem measurements of the attenuation spectra of light in mammalian tissues. *Photochem Photobiol.* 1985;42:153-62.
- [89] Plaetzer K, Krammer B, Berlanda J, Berr F, Kiesslich T. Photophysics and photochemistry of photodynamic therapy: fundamental aspects. *Lasers in medical science.* 2009;24:259-68.
- [90] Gillenwater A, Jacob R, Richards-Kortum R. Fluorescence spectroscopy: a technique with potential to improve the early detection of aerodigestive tract neoplasia. *Head & neck.* 1998;20:556-62.
- [91] Svanberg K, af Klinteberg C, Nilsson A, Wang I, Andersson-Engels S, Svanberg S. Laser-based spectroscopic methods in tissue characterization. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 1998;838:123-9.
- [92] Richards-Kortum R, Sevick-Muraca E. Quantitative optical spectroscopy for tissue diagnosis. *Annual review of physical chemistry.* 1996;47:555-606.
- [93] Braichotte DR, Savary JF, Monnier P, van den Bergh HE. Optimizing light dosimetry in photodynamic therapy of early stage carcinomas of the esophagus using fluorescence spectroscopy. *Lasers in surgery and medicine.* 1996;19:340-6.
- [94] Bonnett R, Berenbaum M. Porphyrins as photosensitizers. *Ciba Foundation symposium.* 1989;146:40-53; discussion -9.
- [95] Hopper C. Photodynamic therapy: a clinical reality in the treatment of cancer. *Lancet Oncol.* 2000;1:212-9.
- [96] Henderson BW, Dougherty TJ. How does photodynamic therapy work? *Photochem Photobiol.* 1992;55:145-57.
- [97] Fritsch C, Ruzicka T. Fluorescence diagnosis and photodynamic therapy in dermatology from experimental state to clinic standard methods. *Journal of environmental pathology, toxicology and oncology : official organ of the International Society for Environmental Toxicology and Cancer.* 2006;25:425-39.

- [98] Grant WE, Speight PM, Hopper C, Bown SG. Photodynamic therapy: an effective, but non-selective treatment for superficial cancers of the oral cavity. *Int J Cancer*. 1997;71:937-42.
- [99] Verrico AK, Haylett AK, Moore JV. In vivo expression of the collagen-related heat shock protein HSP47, following hyperthermia or photodynamic therapy. *Lasers in medical science*. 2001;16:192-8.
- [100] Hopper C. The role of photodynamic therapy in the management of oral cancer and precancer. *European journal of cancer Part B, Oral oncology*. 1996;32B:71-2.
- [101] van den Bergh H. On the Evolution of Some Endoscopic Light Delivery Systems for Photodynamic Therapy. *Endoscopy*. 1998;30:392,407.
- [102] Jichlinski P, Leisinger HJ. Fluorescence cystoscopy in the management of bladder cancer: a help for the urologist! *Urol Int*. 2005;74:97-101.
- [103] Maraschi M, Verpoorte R. Engenharia do Metabolismo Secundário. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*. 1999;23:24-8
- [104] Mans DR, da Rocha AB, Schwartzmann G. Anti-cancer drug discovery and development in Brazil: targeted plant collection as a rational strategy to acquire candidate anti-cancer compounds. *The oncologist*. 2000;5:185-98.
- [105] Rubenstein K. *Medicinal Chemistry and Drug Discovery*. New York: Wiley-Interscience 1995.
- [106] Foglio M. Um estudo químico da *Artemisia annua* L. aclimatada no Brasil. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 1996.
- [107] ACS. American Cancer Society. Disponível em: <http://www.cancer.org/> no dia 10/11/2012 às 14h30. 2008.
- [108] Organization WH. "Fact sheet No. 297: Cancer". 2007:01-12.
- [109] Powell CB, Fung P, Jackson J, Dall'Era J, Lewkowicz D, Cohen I, et al. Aqueous extract of herba *Scutellaria barbatae*, a chinese herb used for ovarian cancer, induces apoptosis of ovarian cancer cell lines. *Gynecol Oncol*. 2003;91:332-40.
- [110] Rozanova Torshina N, Zhang JZ, Heck DE. Catalytic therapy of cancer with ascorbate and extracts of medicinal herbs. *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM*. 2010;7:203-12.

- [111] Kaur M, Mandair R, Agarwal R, Agarwal C. Grape seed extract induces cell cycle arrest and apoptosis in human colon carcinoma cells. *Nutrition and cancer*. 2008;60 Suppl 1:2-11.
- [112] Organization WH. Legal status of traditional medicine, complementary/alternative medicine: a worldwide review. 2001.
- [113] Zhou S, Koh HL, Gao Y, Gong ZY, Lee EJ. Herbal bioactivation: the good, the bad and the ugly. *Life sciences*. 2004;74:935-68.
- [114] Balunas MJ, Kinghorn AD. Drug discovery from medicinal plants. *Life sciences*. 2005;78:431-41.
- [115] Wani MC, Taylor HL, Wall ME, Coggon P, McPhail AT. Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *Journal of the American Chemical Society*. 1971;93:2325-7.
- [116] Wall ME, Campbell HF, Wani MC, Levine SG. Plant antitumor agents. X. The total synthesis of a ring DE analog of camptothecin. *Journal of the American Chemical Society*. 1972;94:3632-3.
- [117] McGuire WP, Hoskins WJ, Brady MF, Kucera PR, Partridge EE, Look KY, et al. Cyclophosphamide and cisplatin compared with paclitaxel and cisplatin in patients with stage III and stage IV ovarian cancer. *The New England journal of medicine*. 1996;334:1-6.
- [118] Bertino J. Irinotecan for metastatic colorectal cancer. *The Medical letter on drugs and therapeutics*. 1997;39:8.
- [119] Cragg GM, Newman DJ. Discovery and Development of Antineoplastic Agents from Natural Sources. *Cancer Investigation*. 1999;17:153-63.
- [120] Newman DJ, Cragg GM. Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years. *Journal of Natural Products*. 2007;70:461-77.
- [121] Shafi G, Munshi A, Hasan TN, Alshatwi AA, Jyothy A, Lei DK. Induction of apoptosis in HeLa cells by chloroform fraction of seed extracts of *Nigella sativa*. *Cancer cell international*. 2009;9:29.
- [122] Toledo A, Hirata L, Buffon M, Miguel M, Miguel O. Fitoterápicos: uma abordagem farmacotécnica. *Revista Lecta*. 2003;v. 21, n. 1/2: p. 7-13
- [123] Gohil K. Genomic responses to herbal extracts: lessons from in vitro and in vivo studies with an extract of *Ginkgo biloba*. *Biochemical pharmacology*. 2002;64:913-7.

- [124] Hudson JB, Towers GH. Therapeutic potential of plant photosensitizers. *Pharmacology & therapeutics*. 1991;49:181-222.
- [125] Giese A. Hypericium. *Photochem Photobiol Rev*. 1980;5: 229-255.
- [126] Gollnick K, Held S, Mártire DO, Braslavsky SE. Hydroxyanthraquinones as sensitizers of singlet oxygen reactions: quantum yields of triplet formation and singlet oxygen generation in acetonitrile. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. 1992;69:155-65.
- [127] Gutiérrez I, Bertolotti SG, Biasutti MA, Soltermann AT, García NA. Quinones and hydroxyquinones as generators and quenchers of singlet molecular oxygen. *Canadian Journal of Chemistry*. 1997;75:423-8.
- [128] Hansen EW, Martiarena CA. Contribución al estudio de la toxicidad de *Heterophyllaea pustulata* Hook "cegada" en el ganado, Dermatitis. Queratoconjuntivitis tóxica experimental en especies animales receptoras. *Rev Inv Agropec Patol Anim*. 1967;4:81-111.
- [129] Núñez Montoya SC, Comini LR, Sarmiento M, Becerra C, Albasa I, Argüello GA, et al. Natural anthraquinones probed as Type I and Type II photosensitizers: singlet oxygen and superoxide anion production. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2005;78:77-83.
- [130] Comini LR, Núñez Montoya SC, Sarmiento M, Cabrera JL, Argüello GA. Characterizing some photophysical, photochemical and photobiological properties of photosensitizing anthraquinones. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. 2007;188:185-91.
- [131] Nyman ES, Hynninen PH. Research advances in the use of tetrapyrrolic photosensitizers for photodynamic therapy. *Journal of photochemistry and photobiology B, Biology*. 2004;73:1-28.
- [132] Ebermann R, Alth G, Kreitner M, Kubin A. Natural products derived from plants as potential drugs for the photodynamic destruction of tumor cells. *Journal of photochemistry and photobiology B, Biology*. 1996;36:95-7.
- [133] Arnason JT, Logene BJR, Towers GHN. Phototoxins in plant insect interactions. In: *Herbivores*, 2nd Edn, Rosenthal, G. and Beremram, M. (eds) Academic Press, New York, in press.; 1990.
- [134] Cragg GM, Newman DJ, Snader KM. Natural products in drug discovery and development. *Journal of natural products*. 1997;60:52-60.

- [135] Kamuhabwa AR, Agostinis PM, D'Hallewin MA, Baert L, de Witte PA. Cellular photodestruction induced by hypericin in AY-27 rat bladder carcinoma cells. *Photochem Photobiol.* 2001;74:126-32.
- [136] Ong CY, Ling SK, Ali RM, Chee CF, Samah ZA, Ho AS, et al. Systematic analysis of in vitro photo-cytotoxic activity in extracts from terrestrial plants in Peninsula Malaysia for photodynamic therapy. *Journal of photochemistry and photobiology B, Biology.* 2009;96:216-22.
- [137] You BJ, Wu YC, Wu CY, Bao BY, Chen MY, Chang YH, et al. Proteomics displays cytoskeletal proteins and chaperones involvement in *Hedyotis corymbosa*-induced photokilling in skin cancer cells. *Experimental dermatology.* 2011;20:653-8.
- [138] Lohmann L, Ulloa C. *Bignoniaceae. Plants Prototype Checklist.* 2008.
- [139] Zorn B, García-Piñeres AJ, Castro V, Murillo R, Mora G, Merfort I. 3-Desoxyanthocyanidins from *Arrabidaea chica*. *Phytochemistry.* 2001;56:831-5.
- [140] Takemura OS, Iinuma M, Tosa H, Miguel OG, Moreira EA, Nozawa Y. A flavone from leaves of *Arrabidaea chica* f. *cuprea*. *Phytochemistry.* 1995;38:1299-300.
- [141] Albuquerque J. *Plantas tóxicas no jardim e no campo.* Belém: FCAP 120 p. 1980.
- [142] Corrêa M. *Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas.* Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura. 1984.
- [143] Ribeiro A, Melo M, Cassali G, Ferraz V, Cardoso G, Telles T, et al. Antileukemic potential of crude extracts of *Arrabidaea chica*. XII International Congress of Toxicology Barcelona, Spain, Abstract Adenda, p46. 2010.
- [144] Ribeiro A, Melo M, Cassali G, Ferraz V, Cardoso G, Telles T, et al. Effect of *Arrabidaea chica* extracts on the Ehrlich solid tumor development. *Brazilian Journal of Pharmacognosy.* 2011;vol.22 no.2.
- [145] Barbosa WLR, Pinto LdN, Quignard E, Vieira JMdS, Silva Jr. JOC, Albuquerque S. *Arrabidaea chica* (HBK) Verlot: phytochemical approach, antifungal and trypanocidal activities. *Revista Brasileira de Farmacognosia.* 2008;18:544-8.
- [146] Lorenzi H, Matos F. *Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas.* Nova Odessa: Instituto Plantarum, 544p. 2002.

- [147] Kim DH, Kim JH, Bae SE, Seo JH, Oh TK, Lee CH. Enhancement of Natural Pigment Extraction Using Bacillus Species Xylanase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2005;53:2541-5.
- [148] Ma XH, Wang ZW. Anticancer drug discovery in the future: an evolutionary perspective. *Drug discovery today*. 2009;14:1136-42.
- [149] Benevides P. Estudo fitoquímico guiado por bioensaios em algumas espécies da Mata Atlântica e Floresta Amazônica. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2001.
- [150] Graebner IB, Mostardeiro MA, Ethur EM, Burrow RA, Dessoy EC, Morel AF. Diterpenoids from *Humirianthera ampla*. *Phytochemistry*. 2000;53:955-9.
- [151] Nunes SM, Sguilla FS, Tedesco AC. Photophysical studies of zinc phthalocyanine and chloroaluminum phthalocyanine incorporated into liposomes in the presence of additives. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica [et al]*. 2004;37:273-84.
- [152] He X, Wu X, Wang K, Shi B, Hai L. Methylene blue-encapsulated phosphonate-terminated silica nanoparticles for simultaneous in vivo imaging and photodynamic therapy. *Biomaterials*. 2009;30:5601-9.
- [153] Stoker MR. Basic principles of lasers. *Anesthesia and Intensive Care Medicine*. 2005;6:402-4.
- [154] Hayat MA. *Stains and cytochemical methods* 1995.
- [155] Brousseau P, Payette Y, Tryphonas H, Blakley B, Flipo D, Fournier M. Assessment of cell viability: Determination of cell viability and cell concentration with ethidium bromide and acridine orange. Beudet M, Kouassi E, Lapierre P, Voccia I, editors *Manual of immunological methods* Boca Raton (FL): CRC Press LLC. 1999:28-39.
- [156] Kessel D, Cheng M-L. Biological and Biophysical Properties of the Tumor-localizing Component of Hematoporphyrin Derivative. *Cancer Research*. 1985;45:3053-7.
- [157] Washington C. Stability of lipid emulsions for drug delivery. *Advanced drug delivery reviews*. 1996;20:131-45.
- [158] Jerobin J, Sureshkumar RS, Anjali CH, Mukherjee A, Chandrasekaran N. Biodegradable polymer based encapsulation of neem oil nanoemulsion for controlled release of Aza-A. *Carbohydrate polymers*. 2012;90:1750-6.

- [159] Uzdensky AB, Bragin DE, Kolosov MS, Kubin A, Loew HG, Moan J. Photodynamic effect of hypericin and a water-soluble derivative on isolated crayfish neuron and surrounding glial cells. *Journal of photochemistry and photobiology B, Biology*. 2003;72:27-33.
- [160] Kato H, Suzuki M, Fujita K, Horie M, Endoh S, Yoshida Y, et al. Reliable size determination of nanoparticles using dynamic light scattering method for in vitro toxicology assessment. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*. 2009;23:927-34.
- [161] Ruffa MJ, Ferraro G, Wagner ML, Calcagno ML, Campos RH, Cavallaro L. Cytotoxic effect of Argentine medicinal plant extracts on human hepatocellular carcinoma cell line. *Journal of ethnopharmacology*. 2002;79:335-9.
- [162] Anesini C, Ferraro G, Lopez P, Borda E. Different intracellular signals coupled to the antiproliferative action of aqueous crude extract from *Larrea divaricata* Cav. and nor-dihydroguaiaretic acid on a lymphoma cell line. *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology*. 2001;8:1-7.
- [163] Batlle A, Mamone L, Casas A, Rodriguez L, Venosa GD. Studies on extracts of Argentinean plants: cytotoxic tumoral activity per se and as photosensitizers in photodynamic therapy of cancer. University of Buenos Aires; 2010.
- [164] Ma BC. Eficácia do alumínio-cloro ftalocianina associado a nanopartículas de poli(vinil metil éter-co-anidrido maleico) na terapia fotodinâmica contra células tumorais *in vitro* Universidade de Brasília; 2012.
- [165] Kiss L, Walter FR, Bocsik A, Veszeka S, Ozsvári B, Puskas LG, et al. Kinetic analysis of the toxicity of pharmaceutical excipients Cremophor EL and RH40 on endothelial and epithelial cells. *Journal of pharmaceutical sciences*. 2013;102:1173-81.
- [166] Rezaire A, Robinson JC, Bereau D, Verbaere A, Sommerer N, Khan MK, et al. Amazonian palm *Oenocarpus bataua* ("patawa"): Chemical and biological antioxidant activity – Phytochemical composition. *Food Chemistry*. 2014;149:62-70.
- [167] Soukos NS, Hamblin MR, Hasan T. The effect of charge on cellular uptake and phototoxicity of polylysine chlorin(e6) conjugates. *Photochem Photobiol*. 1997;65:723-9.
- [168] Stavropoulos NE, Kim A, Nseyo UU, Tsimaris I, Chung TD, Miller TA, et al. *Hypericum perforatum* L. extract - novel photosensitizer against human

bladder cancer cells. *Journal of photochemistry and photobiology B, Biology*. 2006;84:64-9.

[169] Moan J, Peng Q. An outline of the hundred-year history of PDT. *Anticancer research*. 2003;23:3591-600.

[170] Verma A, Stellacci F. Effect of surface properties on nanoparticle-cell interactions. *Small*. 2010;6:12-21.

[171] Dickson G, Meban, C. Use of imidazole – osmium tetroxide mixtures in the preservation of lung surfactant. *J Anat*. 1988;87, 161:248.

[172] Hayat M. *Stains and cytochemical methods*. (Ed Plenum Publishing Corporation: New York). 1993.

[173] Gasparetto A, Lapinski TF, Zamuner SR, Khouri S, Alves LP, Munin E, et al. Extracts from *Alternanthera maritima* as natural photosensitizers in photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). *Journal of photochemistry and photobiology B, Biology*. 2010;99:15-20.

[174] Bui-Xuan NH, Tang PM, Wong CK, Fung KP. Photo-activated pheophorbide-a, an active component of *Scutellaria barbata*, enhances apoptosis via the suppression of ERK-mediated autophagy in the estrogen receptor-negative human breast adenocarcinoma cells MDA-MB-231. *Journal of ethnopharmacology*. 2010;131:95-103.

[175] Kapsokalyvas D, Dimitriou H, Skalkos D, Konstantoudakis G, Filippidis G, Stiakaki E, et al. Does *Hypericum perforatum* L. extract show any specificity as photosensitizer for HL-60 leukemic cells and cord blood hemopoietic progenitors during photodynamic therapy? *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2005;80:208-16.

[176] Radakovic-Fijan S, Rappersberger K, Tanew A, Honigsmann H, Ortel B. Ultrastructural changes in PAM cells after photodynamic treatment with delta-aminolevulinic acid-induced porphyrins or photosan. *The Journal of investigative dermatology*. 1999;112:264-70.

[177] Weinberg R. *A biologia do câncer*. Porto Alegre: Artmed; 2008.

[178] Hamblin MR, Newman EL. On the mechanism of the tumour-localising effect in photodynamic therapy. *Journal of photochemistry and photobiology B, Biology*. 1994;23:3-8.

[179] Juzeniene A, Juzenas P, Iani V, Moan J. Topical applications of iron chelators in photosensitization. *Photochemical & photobiological sciences* :

Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology. 2007;6:1268-74.

[180] Brown SB, Brown EA, Walker I. The present and future role of photodynamic therapy in cancer treatment. *The lancet oncology*. 2004;5:497-508.

[181] Oleinick NL, Morris RL, Belichenko I. The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: what, where, why, and how. *Photochemical & photobiological sciences : Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology*. 2002;1:1-21.

[182] Alves MSM, Mendes PC, Vieira JGdP, Ozela EF, Barbosa WLR, Silva Júnior JOC. Análise farmacognóstica das folhas de *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) B. Verlt., Bignoniaceae. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2010;20:215-21.

[183] Yip EC, Chan AS, Pang H, Tam YK, Wong YH. Protocatechuic acid induces cell death in HepG2 hepatocellular carcinoma cells through a c-Jun N-terminal kinase-dependent mechanism. *Cell biology and toxicology*. 2006;22:293-302.

[184] Kang OH, Choi YA, Park HJ, Lee JY, Kim DK, Choi SC, et al. Inhibition of trypsin-induced mast cell activation by water fraction of *Lonicera japonica*. *Archives of pharmacal research*. 2004;27:1141-6.

[185] Park E, Kum S, Wang C, Park SY, Kim BS, Schuller-Levis G. Anti-inflammatory Activity of Herbal Medicines: Inhibition of Nitric Oxide Production and Tumor Necrosis Factor- α Secretion in an Activated Macrophage-like Cell Line. *The American Journal of Chinese Medicine*. 2005;33:415-24.

[186] Moor AC. Signaling pathways in cell death and survival after photodynamic therapy. *Journal of photochemistry and photobiology B, Biology*. 2000;57:1-13.

[187] Wyllie AH. Apoptosis: an overview. *Br Med Bull*. 1997;53:451-65.

[188] Hong MY, Chapkin RS, Davidson LA, Turner ND, Morris JS, Carroll RJ, et al. Fish oil enhances targeted apoptosis during colon tumor initiation in part by downregulating Bcl-2. *Nutrition and cancer*. 2003;46:44-51.

[189] Lee HZ, Lin WC, Yeh FT, Wu CH. 2-Phenyl-4-quinolone prevents serotonin-induced increases in endothelial permeability to albumin. *European journal of pharmacology*. 1998;354:205-13.

- [190] Almeida RD, Manadas BJ, Carvalho AP, Duarte CB. Intracellular signaling mechanisms in photodynamic therapy. *Biochimica et biophysica acta*. 2004;1704:59-86.
- [191] Mroz P, Yaroslavsky A, Kharkwal GB, Hamblin MR. Cell Death Pathways in Photodynamic Therapy of Cancer. *Cancers*. 2011;3:2516-39.
- [192] Nagata S, Obana A, Gohto Y, Nakajima S. Necrotic and apoptotic cell death of human malignant melanoma cells following photodynamic therapy using an amphiphilic photosensitizer, ATX-S10(Na). *Lasers in surgery and medicine*. 2003;33:64-70.
- [193] Nowis D, Makowski M, Stoklosa T, Legat M, Issat T, Golab J. Direct tumor damage mechanisms of photodynamic therapy. *Acta biochimica Polonica*. 2005;52:339-52.
- [194] Moan J. On the diffusion length of singlet oxygen in cells and tissues. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 1990;6:343-4.
- [195] Graczyk. *Photodynamic diagnosis and treatment of cancer*. 1999.
- [196] Robertson CA, Hawkins D, H A. Photodynamic therapy (PDT): a short review on cellular mechanisms and cancer research applications for PDT. *Journal of photochemistry and photobiology B, Biology*. 2009;96:1-8.

ANEXO 1

Tabela: Relação de Fitoterápicos Ofertados pelo SUS

Nome popular	Nome científico	Indicação
Espinheira-santa	<i>Maytenus ilicifolia</i>	Dispepsias, coadjuvante no tratamento de gastrite e úlcera duodenal
Guaco	<i>Mikania glomerata</i>	Expectorante e broncodilatador
Alcachofra	<i>Cynara scolymus</i>	Colagogos e coleréticos em dispepsias associadas a disfunções hepatobiliares.
Aroeira	<i>Schinus terebenthifolius</i>	Produtos ginecológicos antiinfeciosos tópicos simples
Cáscara-sagrada	<i>Rhamnus purshiana</i>	Constipação ocasional
Garra-do-diabo	<i>Harpagophytum procumbens</i>	Antiinflamatório (oral) em dores lombares, osteoartrite
Isoflavona-de-soja	<i>Glycine max</i>	Climatério (Coadjuvante no alívio dos sintomas)
Unha-de-gato	<i>Uncaria tomentosa</i>	Antiinflamatório (oral e tópico) nos casos de artrite reumatóide, osteoartrite e como imunoestimulante
Hortelã	<i>Mentha x piperita</i>	Síndrome do cólon irritável
Babosa	<i>Aloe vera</i>	Queimaduras e psoríase
Salgueiro	<i>Salix alba</i>	Dor lombar
Plantago.	<i>Plantago ovata</i>	Coadjuvante nos casos de obstipação intestinal Tratamento da síndrome do cólon irritável

Fonte: Manual do Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos do Ministério da Saúde, 2008.