



Universidade de Brasília

Instituto de Ciências Biológicas

Programa de Pós-Graduação em Nanociências e Nanobiotecnologia

Terapia fotodinâmica mediada por extrato de cajuru e cloreto de alumínio-ftalocianina em nanoemulsões no tratamento de câncer de mama *in vitro*

BRASÍLIA

2014

MOSAR CORRÊA RODRIGUES

Terapia fotodinâmica mediada por extrato de cajuru e cloreto de alumínio-ftalocianina em nanoemulsões no tratamento de câncer de mama *in vitro*

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Nanociências e Nanobiotecnologia, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, como parte integrante dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Nanociências e Nanobiotecnologia.

Profa. Dra. Mônica Pereira Garcia

BRASÍLIA

2014



Dissertação de Mestrado

Mosar Corrêa Rodrigues

Título:

“Terapia fotodinâmica mediada por extrato de crajiru e cloreto de alumínio-ftalocianina em nanoemulsões no tratamento de câncer de mama in vitro”.

Comissão Examinadora:


Prof. Dra. Mônica Pereira Garcia
Presidente / Orientadora
UnB


Prof. Dr. Guilherme Martins Gelfuso
Membro Titular Interno não Vinculado ao Programa
UnB/FS


Prof. Dra. Graziela Anselmo Joanitti
Membro Titular Interno Vinculado ao Programa
UnB/Faculdade de Ceilândia

Prof. Dra. Maria de Fátima Menezes de Almeida Santos
Membro Suplente
Interno Vinculado ao Programa
Un/IB

Brasília, 17 de julho de 2014.

*Dedico este trabalho aos meus amados pais
e irmãos, aos meus queridos sobrinhos e
aos meus amigos de toda hora.*

Agradecimentos

A Deus, pelas oportunidades de aprender e compartilhar tantas experiências boas nessa vida. A São Jorge e a Santo Expedito pela proteção e força, ajudando-me a erguer a cabeça e seguir em frente mesmo nos momentos mais difíceis.

Aos meus amados pais Ilton e Marlúcia, minha inspiração, meus exemplos de companheirismo, união e amor, que ensinaram a mim e aos meus irmãos os significados das palavras valor, educação, respeito e fé.

As minhas amadas irmãs, Raquel, Rosângela e Ana Victória, e aos meus amados irmãos, Wilton, Willian e Wanderson, pelos momentos de descontração, de carinho, de amor, de cumplicidade e de muitas alegrias. A admiração de vocês pelas minhas conquistas me faz lembrar o quanto é importante comemorar cada vitória, mesmo as menores e mais simples. Aproveito a oportunidade para agradecer pelas minhas sobrinhas, as princesas Isadora e Sofia, e pelo meu já muito amado sobrinho Isaac.

Agradeço ao Prof^o Dr. Ricardo Bentes de Azevedo, pela confiança depositada em mim, desde o primeiro momento, para a realização desse trabalho. Entre suas muitas qualidades, levarei para sempre comigo seu exemplo de dedicação e de liderança.

À Prof^a Mônica Pereira Garcia, pela orientação dedicada, que muito contribuiu para realização e conclusão desse estudo e para o meu crescimento pessoal e profissional, fazendo-me compreender cada etapa com mais maturidade.

Ao meu grande amigo Prof^o Luís Alexandre Muehlmann, que me mostrou como sou capaz e quão longe posso chegar com estudo, trabalho e dedicação. Sou muito grato por sua amizade verdadeira e pelo seu companheirismo. E pelos nossos *insights* nas noites passadas nos laboratórios da vida.

À minha eterna irmã do coração Karen Rapp Py-Daniel. Py, quero lhe agradecer por ter me acolhido de forma tão carinhosa aqui em Brasília e também por todos os conselhos, exemplos, puxões de orelha e, claro, por todos os momentos felizes que compartilhamos.

À querida e insubstituível Dona Zélia, por meio de quem agradeço também a todos os colegas do laboratório de Nanobiotecnologia que, de uma forma ou de outra, contribuíram muito para minha evolução como pesquisador e para meu crescimento como ser humano. Em especial agradeço também à Jaqueline e Samuel que contribuíram muito na parte *in vitro* desse estudo.

Às grandes amigas especiais Paolin e Ludmilla que sempre foram tão companheiras e me ensinaram muito. Obrigado flores!

Aos meus fieis estagiários quem tanto contribuíram para realização desse estudo. Galera valeu!!! Livia, Luíza, Victor e Eduarda. Vocês são nota 1000.

Às meninas da secretária Kelly e Dani (*Letícia Spiller*), pelo apoio e gentileza de sempre.

À Universidade de Brasília e seus professores. Em especial ao Prof^o João Paulo Longo. Ao Programa de Pós-graduação em Nanociências e Nanobiotecnologia, pela oportunidade.

Ao Capes e ao INCT, pelo apoio financeiro.

“A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original”.

Albert Einstein

RESUMO

O câncer de mama é o segundo tipo de câncer mais incidente no mundo, acometendo uma a cada oito mulheres. Os tratamentos utilizados atualmente para o câncer de mama não apresentam o índice terapêutico desejado e, diante disso, a emergente terapia fotodinâmica (TFD) vem despertando bastante atenção no tratamento de neoplasias. Fundamentada em três componentes básicos, luz no comprimento de onda específico, fotossensibilizante (FS) e oxigênio, a TFD é considerada bastante segura e eficaz. Uma das limitações da TFD está relacionada à natureza hidrofóbica apresentada pela maioria dos FS. Nesse sentido, o presente estudo teve como objetivo analisar a utilização de dois agentes fotossensibilizantes: extrato de cajuru (ECr) e o cloreto de alumínio-ftalocianina (AlFtCl), associados em duas nanoemulsões independentes, como mediadores da TFD aplicados em ensaios celulares de tumor de mama 2D e 3D. As nanoformulações obtidas (NE-ECr/NE-AlFtCl) apresentaram diâmetro hidrodinâmico de cerca de 30 nm, foram monodispersas e com carga de superfície levemente negativa. As NE-ECr apresentou pico de absorção de $\lambda=668$ nm e emissão de fluorescência (excitação em 350 nm) de $\lambda=676$. A NE-AlFtCl apresentou pico de absorção de $\lambda=676$ nm e emissão de fluorescência (excitação em 350 nm) de $\lambda=680$. Ademais, as duas nanoformulações apresentaram excelente capacidade de produzir espécies reativas de oxigênio (ERO). Foi conferida também uma excelente estabilidade nas condições a 4 °C e a ~25°C, sendo possível preservar as propriedades fotofísicas e fisicoquímicas das nanoformulações pelo máximo tempo testado, i.e., 365 dias. Tanto a NE-ECr (0,125 mg/mL) quanto a NE-AlFtCl (0,125 μ M) expostas por 15 minutos às células tumorais MCF-7, separadamente, apresentaram-se interiorizadas no citoplasma dessas células. Os efeitos citotóxicos ocasionados nas células foram exclusivamente pela ação das duas nanoformulações quando irradiadas. As células MCF-7 submetidas à TFD mediada pelas diferentes concentrações de NE-ECr apresentaram CC_{50} de 0,0013 mg/mL e CC_{100} de 0,007 mg/mL. Nas mesmas condições, foram observadas para células MCF-10A CC_{50} e CC_{100} de 0,0048 mg/mL e de 0,020 mg/mL das NE-ECr, respectivamente. Também foi observada uma recuperação mais lenta das células tumorais quando comparadas às não tumorais. As NE-ECr mediadoras da TFD também se apresentaram bastantes citotóxicas contra os esferoides das células MCF-7. Nos experimentos realizados com as NE-AlFtCl, as células MCF-7 foram submetidas à TFD mediada pelas diferentes concentrações, agora das NE-AlFtCl, apresentando CC_{50} de 0,0028 μ M e CC_{100} de 0,093 μ M. Nas mesmas condições, foram observadas para células MCF-10A CC_{50} e CC_{100} de 0,0058 μ M e de 0,625 μ M das NE-AlFtCl, respectivamente. MCF-7 apresentaram-se mais lentas quanto à recuperação por diferentes tempos após a TFD. Quando os esferoides foram expostos a diferentes concentrações das NE-AlFtCl-TFD por 60 minutos, houve uma maior citotoxicidade em relação ao tempo de 30 minutos. Conclui-se que as NE-ECr e as NE-AlFtCl são estáveis a diferentes condições por longos períodos de tempo, e que as duas nanoemulsões, quando utilizadas como mediadoras da TFD, independentemente, foram citotóxicas contra células tumorais com maior intensidade do que a exercida sobre células não tumorais. A TFD mediada pelas NE-ECr ou NE-AlFtCl também apresentou efeito citotóxico contra esferoides de células MCF-7.

Palavras-chave: terapia fotodinâmica; extrato de cajuru; clore de alumínio-ftalocianina; cultivo tridimensional de células; câncer de mama.

ABSTRACT

Breast cancer is the second most frequent type of cancer in the world, affecting one in eight women. Current treatments for breast cancer do not present the desired therapeutic index binging attention, therefore, to the emerging photodynamic therapy (PDT), which has been attracting much attention for the treatment of neoplasias. Based on three basic components, light in specific wavelength, photosensitizer (PS) and oxygen, PDT is considered very safe and effective. One of the limitations of PDT is related to the hydrophobic nature presented by the majority of the PS. In this sense, the present study aimed at analyzing the use of two photosensitizing agents: crajiru extract (ECr) and aluminum phthalocyanine chloride (AlFtCl), associated in two independent nanoemulsions, as PDT mediators applied in cellular assays of 2D and 3D breast tumors. The nanoformulations obtained (NE-ECr/NE-AlFtCl) had a hydrodynamic diameter of about 30 nm, were monodisperse and had a slightly negative surface charge. The NE-ECr showed absorption peak of $\lambda = 668$ nm and fluorescence emission (excitation at 350 nm) of $\lambda = 676$. The NE- AlFtCl showed absorption peak of $\lambda = 676$ nm and fluorescence emission (excitation at 350 nm) of $\lambda = 680$. Moreover, both nanoformulations showed excellent capacity to produce reactive oxygen species (ROS). We also observed excellent stability conditions at 4 °C and ~ 25 °C, which showed that it is possible to preserve the physicochemical and photophysical properties of the nanoformulations during the maximum tested period, i.e. 365 days. Both NE-ECr (0.125 mg/mL) and NE-AlFtCl (0.125 μ M) separately exposed for 15 minutes to the MCF-7 tumor cells presented themselves internalized into the cytoplasm of these tumor cells. The cytotoxic effects on cells were caused solely by the action of both nanoformulations when irradiated. MCF-7 cells undergoing PDT mediated by different concentrations of NE-ECr showed CC_{50} of 0,0013 mg/mL and CC_{100} of 0,007 mg/mL. Under the same conditions, we observed for MCF-10A CC_{50} and CC_{100} of 0,0048 mg/mL e of 0,020 mg/mL of NE-ECr, respectively. Slower recovery of tumor cells was also observed when compared to that of non-tumor cells. NE-ECr as PDT mediators also presented significant cytotoxicity against spheroids of MCF-7 cells. In the experiments with NE-AlFtCl, MCF-7 cells were subjected to PDT mediated by different concentrations mediated of NE-AlFtCl, this time presenting CC_{50} of 0,0028 μ M and CC_{100} of 0,093 μ M. Under the same conditions, we observed for MCF-10A CC_{50} and CC_{100} of 0,0058 μ M and of 0,625 μ M of NE-AlFtCl, respectively. Recovery of MCF-7 was slower for different periods after PDT. When spheroids were exposed to different concentrations of NE-AlFtCl-PDT for 60 minutes, there was higher cytotoxicity when compared to those exposed for 30 minutes. We conclude that the NE-ECr and the NE-AlFtCl are stable under different conditions for long periods of time, and that both nanoemulsions, when used as mediators of PDT, independently, presented cytotoxicity to tumor cells in a stronger intensity than that exerted on non-tumor cells . PDT mediated by NE-ECr or NE-AlFtCl also showed cytotoxic effect against spheroids of MCF-7 cells.

Keywords: photodynamic therapy; crajiru extract; aluminum phthalocyanine chlorides; three-dimensional cell culture; breast cancer.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estágios do desenvolvimento do câncer	2
Figura 2: Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2014, por sexo, exceto câncer de pele não melanoma.	4
Figura 3. Esquema do mecanismo de ação da terapia fotodinâmica	10
Figura 4: Imagem da Planta cajuru (<i>Arrabidaea chica</i>)	15
Figura 5: Combinação de imagens analíticas de seções medianas de esferoides	20
Figura 6: Esquema ilustrativo da preparação das nanoemulsões	29
Figura 7: Esquema ilustrativo da montagem do LED	38
Figura 8: Diferentes concentrações das nanoemulsões sem os fotossensibilizantes (FS) (NE-LECr)	40
Figura 9: Diferentes concentrações em meio de cultivo (DMEM ou DMEM-F12) e etanol 10% da AlFtCl	41
Figura 10: Diferentes concentrações em meio de cultivo (DMEM/DMEM-F12) das amostras NE-ECr e das NE-AlFtCl que foram utilizadas	42

Figura 11: Diferentes concentrações em meio de cultivo (DMEM) das NE-ECr e das NE-AIFtCl que foram utilizadas no cultivo 3D	45
Figura 12: Espectro de absorção (absorbância) e de emissão (fluorescência) das nanoemulsões com ou sem Extrato Bruto de Crajiru (ECr) após sua preparação	49
Figura 13: Espectro de absorção (absorbância) e de emissão (fluorescência) das nanoemulsões com e sem Cloreto de alumínio-Ftalocianina (AIFtCl), após a preparação	50
Figura 14: Avaliação da estabilidade físicas por dispersão dinâmica de luz (DLS) das nanoemulsões com extrato de crajiru (NE-ECr)	52
Figura 15: Espectroscopia das NE-ECr	54
Figura 16: Produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) com diferentes diluições das nanoformulações de NE-ECr pelo decaimento de DBF	55
Figura 17: Avaliação da estabilidade físicas por dispersão dinâmica de luz (DLS) das nanoemulsões com cloreto de alumínio-ftalocianina (NE-AIFtCl)	57
Figura 18: Espectroscopia das NE-AIFtCl	58
Figura 19: Produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) com diferentes diluições das nanoformulações de NE-AIFtCl pelo decaimento de DBF	60
Figura 20: Viabilidade das células MCF-10A e MCF-7 expostas apenas ao Diodo emissor de luz com 25,9 j/cm ² LED)	61

- Figura 21:** Visualização por microscopia confocal da incorporação intracelular pelas células MCF-7 expostas por 15 minutos a 0,125 mg/mL de NE-ECr 62
- Figura 22:** Viabilidade das células MCF-10A e MCF-7 expostas por 15 minutos a diferentes concentrações das NE-LECr, pelo método MTT 63
- Figura 23:** Viabilidade celular de MCF-10A e MCF-7 após 24 horas da TFD mediada pelas diferentes concentrações da NE-ECr 65
- Figura 24:** Viabilidade das células MCF-10A e MCF-7 após diferentes tempos da aplicação da TFD mediada por 0,0013 mg/mL (CC₅₀) e 0,007 mg/mL (CC₁₀₀) das NE-ECr, avaliada pelo método MTT 68
- Figura 25:** Visualização por microscopia confocal da incorporação intracelular pelas células MCF-7 expostas por 15 minutos a 0,125 µM de NE-AlFtCl 69
- Figura 26:** Viabilidade das células MCF-10A e MCF-7 expostas por 15 minutos a diferentes concentrações da NE-LAlFtCl pelo método MTT. 70
- Figura 27:** Viabilidade das células MCF-10A e MCF-7 expostas por 15 minutos a diferentes concentrações de AlFtCl, pelo método MTT 72
- Figura 28:** Viabilidade celular de MCF-10A e MCF-7 após 24 horas da TFD mediada por diferentes concentrações das NE-AlFtCl 74
- Figura 29:** Viabilidade das células MCF-10A e MCF-7 após diferentes tempos da aplicação da TFD mediada por 0,0028 µM (CC₅₀) e 0,0093 µM (CC₁₀₀) das NE-

AlFtCl, avaliada pelo método MTT	77
Figura 30: Esferoides de células MCF-7 obtidos a partir de $1,5 \times 10^4$ células/poço.	79
Figura 31: Quantificação de lactato desidrogenase (LDH) liberada no meio de cultivo após TFD mediada pelas NE-ECr	81
Figura 32: Quantificação de lactato desidrogenase (LDH) liberada no meio de cultivo após TFD mediada pelas NE-AlFtCl	83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Estimativas para o ano de 2014 das taxas brutas de incidência por 100 mil habitantes e de número de casos novos por câncer, segundo sexo e localização primária	04
Tabela 2: Lista de Equipamentos	25
Tabela 3: Tabela de Materiais	26
Tabela 4: Lista de Reagentes	27
Tabela 5: Comprimentos de onda ajustados para acessar os picos de absorção e emissão de fluorescência das nanoformulações (NE-ECr e NE-AIFtCl)	32
Tabela 6: Linhagens celulares utilizadas no presente estudo	34
Tabela 7: Valor médio do diâmetro hidrodinâmico (DH), do índice de polidispersão (IPD) e do potencial zeta (Zt) determinados a partir do espalhamento dinâmico de luz, das nanoemulsões NE-ECr, NE-LECr, NE-AIFtCl e NE-LAIFtCl após a preparação	47
Tabela 8: Valor médio do diâmetro hidrodinâmico (DH), do índice de polidispersão (IPD) e do potencial zeta (Zt) determinados a partir do espalhamento dinâmico de luz, das nanoemulsões NE-ECr, NE-AIFtCl dispersas em meio DMEM e meio DMEMF12	48

SÍMBOLOS, UNIDADES E FÓRMULAS

Sigla/Abreviatura	Significado
λ	comprimento de onda
~	Aproximadamente
[]	concentração do fármaco
<	Menor
>	Maior
μM	Micromolar
μL	Microlitros
μg	Microgramas
$^1\text{O}_2$	oxigênio Singlete
2D	Bidimensional/monocamada
3D	Tridimensional
4T1	Adenocarcinoma mamário murinho
ALA	Ácido-5-aminolevulínico
AlFtCl	cloreto de alumínio-ftalocianina
AlFtCl-NP	nanopartícula polimérica associada ao AlFtCl
ANOVA	análise de variância
ATCC [®]	<i>American Type Cell Culture</i>
ATP	trifosfato de adenosina
B16F10	melanoma maligno murinho
CC ₅₀	concentração citotóxica que causa morte em 50 % das células
CC ₁₀₀	concentração citotóxica que causa morte em 100 % das células
CO ₂	dióxido de carbono
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DBF	1,3-difenil-isobenzofurano

DH	diâmetro hidrodinâmico
DLS	dispersão dinâmica de luz
DNA	ácido desoxirribonucleico
DMEM	modificação do meio <i>Eagle Dulbecco</i>
DMEM-F12	modificação do meio <i>Eagle Dulbecco</i> : mistura do nutriente F12
DMSO	dimetilsulfóxido ou sulfóxido de dimetilo
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
ERO	espécies reativas de oxigênio
ECr	extrato de cajuru
E.P.M	erro padrão médio
FDA	<i>Food and drug administration</i>
FS	Fotossensibilizante
g	Giro
Hela	<i>epitheloid cervix carcinoma</i>
Hep-2	carcinoma epitelial humano
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IPD	índice de polidispersão
J/cm ²	Joule por centímetro quadrado
J774A.1	macrófago monócito murinho
LDH	enzima lactato desidrogenase
LED	diodo emissor de luz com 25,9 j/cm ²
MCF-7	adenocarcinoma mamário humano
MCF-10A	epiderme mamário não tumoral
mg	Miligramas
mL	Mililitros
MAL (METIX [®])	Methyl aminolevulinate
MTT	brometo de 3 (4,5 dimetiliazol-2il)-2,5-difenil-tetrazólio

MP	mega pixel
mV	Milivolts
mW	Miliwatt
NE-AIFtCl	nanoemulsão com cloreto de alumínio-ftalocianina
NE-ECr	nanoemulsão com extrato de cajuru
NE-LAIFtCl	nanoemulsão sem cloreto de alumínio-ftalocianina
NE-LECr	nanoemulsão sem extrato de cajuru
NanoA	nanoemulsão com óleo de açaí
nm	Nanômetros
PBS	tampão fosfato salina
pH	potencial hidrogeniônico
O ₂	Oxigênio
RPM	rotação por minuto
TFD	terapia fotodinâmica
WHO	<i>World Health Organization</i>
WM 2817	células melanoma metastáticos
Zt	potencial zeta

SUMÁRIO

1 Introdução	1
1.1 Câncer	1
1.1.1 Câncer de mama	5
1.1.2 Os principais tratamentos do câncer de mama	6
1.2 Terapia fotodinâmica	9
1.2.1 Fotossensibilizantes	11
1.2.1.1 O fotossensibilizante: Cloreto de alumínio-ftalocianina	13
1.2.1.2 O fitoterápico: <i>Arrabidaea chica</i>	14
1.3 Nanobiotecnologia e terapia fotodinâmica	16
1.4 Cultivo tridimensional de células	18
2 Justificativa	22
3 Objetivos	23
3.1 Objetivo Geral	23
3.2 Objetivos Específicos	23
4 Materiais e Métodos	25
4.1 Equipamentos, materiais e reagentes	25
4.2 Obtenção do extrato de <i>crajiru</i> (<i>Arrabidaea chica</i>)	28
4.3 Preparação das nanoemulsões	28
4.3.1 Caracterização e avaliação da estabilidade físicas das NE-ECr e NE-AIFtCl	30
4.3.1.1 Avaliação dos parâmetros físicas das NE-ECr e NE-AIFtCl quando expostas ao meio de cultivo celular	31
4.3.2 Caracterização e avaliação fotofísica das NE-ECr e NE-AIFtCl	31
4.3.3 Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio pelas NE-ECr e NE-AIFtCl	32

4.4	<i>Ensaios de atividade biológicas das NE-ECr e NE-AIFtCl in vitro</i>	33
4.4.1	<i>Linhagens celulares</i>	33
4.4.2	<i>Manutenção das linhagens celulares em monocamada (2D)</i>	34
4.4.2.1	<i>Estabelecimento de subculturas</i>	35
4.4.3	<i>Visualização da incorporação intracelular nas células MCF-7 expostas as NE-ECr e NE-AIFtCl</i>	36
4.4.4	<i>Determinação da viabilidade celular pelo método MTT</i>	37
4.4.5	<i>Efeito do LED na viabilidade celular</i>	38
4.4.6	<i>Efeito do LED com nanoformulações sem fotossensibilizantes (NE-LECr /NE-LAIFtCl) na viabilizada celular</i>	39
4.4.7	<i>Efeito da terapia fotodinâmica mediada por AIFtCl na viabilidade celular</i>	40
4.4.8	<i>Efeito da terapia fotodinâmica mediada por ECr e AIFtCl associados a nanoemulsões na viabilidade celular</i>	41
4.4.9	<i>Avaliação da viabilidade celular após diferentes tempos da terapia fotodinâmica</i>	42
4.5	<i>Cultivo celular em três dimensões: obtenção dos esferoides</i>	43
4.5.1	<i>Determinação da Citotoxicidade nos esferoides utilizando o Kit Cytotox 96[®]</i>	44
4.5.3	<i>Terapia fotodinâmica mediada pelo ECr e AIFtCl associados a nanoemulsões para tratamento dos esferoides</i>	45
4.6	<i>Análises Estatísticas</i>	46
5	Resultados	47
5.1	<i>Características físicas das nanoemulsões</i>	47
5.1.1	<i>Características físicas das nanoemulsões dispersas em meio de cultivo</i>	48
5.2	<i>Caracterizações fotofísicas das nanoemulsões</i>	48

5.3 Estabilidade das nanoemulsões com extrato de cajuru (NE-ECr)	50
5.3.1 Determinação da estabilidade físicas das NE-ECr	50
5.3.2 Determinação da estabilidade fotofísica das NE-ECr	53
5.3.3 Produção de espécies reativas de oxigênio das NE-ECr	54
5.4 Estabilidade das nanoemulsões com cloreto de alumínio-ftalocianina (NE-ECr)	55
5.4.1 Determinação da estabilidade físicas das NE-AlftCl	58
5.4.2 Determinação da estabilidade fotofísica das NE-AlftCl	58
5.4.3 Produção de espécies reativas de oxigênio das NE-AlftCl	60
5.5 Ensaios de atividade biológicas das NE-ECr e NE-AlftCl in vitro	60
5.5.1 Efeito do LED na viabilidade das células MCF-10A e MCF-7	61
5.5.2 Visualização da incorporação intracelular nas células MCF-7 expostas a NE-ECr	62
5.5.3 Efeito das NE-LECr e do LED na viabilidade das células MCF-10A e MCF-7	64
5.5.4 Efeito da TFD mediada pelas NE-ECR na viabilidade das células MCF-10A e MCF-7	66
5.5.5 Viabilidade das células MCF-10A e MCF-7 após diferentes tempos da aplicação da TGF β	69
5.5.6 Visualização da incorporação intracelular nas células MCF-7 expostas a NE-AlftCl	70
5.5.7 Efeito das NE-LAlftCl e do LED na viabilidade das células MCF-10A e MCF-7	71
5.5.8 Efeito da TFD mediada pelo AlftCl na viabilidade das células MCF-10A e MCF-7	72
5.5.9 Efeito da TFD mediada pela NE-AlftCl na viabilidade das células MCF-10A e MCF-7	75

5.5.10 Viabilidade das células MCF-10A e MCF-7 após diferentes tempos da aplicação da TFD mediada pela NE-AlFtCl	78
5.6 Obtenção dos esferoides	80
5.6.1 Efeito citotóxico nos esferoides de células MCF-7 após 24 horas de aplicação da TFD mediada pelas NE-ECr	82
5.6.2 Efeito citotóxico nos esferoides de células MCF-7 após 24 horas de aplicação da TFD mediada pelas NE-AlFtCl	82
6 Discussão	84
6.1 Extrato de cajuru associado a nanoemulsões (NE-ECr)	84
6.1.1 Características e estabilidade físicas	84
6.1.2 Características e estabilidade fotofísica e fotoquímica	87
6.1.3 Citotoxicidade das NE-ECr: cultivo celular em monocamada (2D)	88
6.1.4 Obtenção de esferoides de células MCF-7	93
6.1.5 Citotoxicidade de NE-ECr nos esferoides de MCF-7	94
6.2 Cloreto de alumínio-ftalocianina associado a nanoemulsões (NE-AlFtCl)	96
6.2.1 Características e estabilidade físicas	96
6.2.2 Características e estabilidade fotofísica e fotoquímica	97
6.2.3 Citotoxicidade das NE-AlFtCl: cultivo celular em monocamada (2D)	100
6.2.4 Citotoxicidade de NE-AlFtCl nos esferoides de MCF-7	104
7 Conclusão	106
Referências	109

1 Introdução

1.1 Câncer

O câncer é uma das principais doenças que levam pacientes a óbito no mundo. É originado pela proliferação desordenada de células anormais no organismo decorrentes de mutações no material genético causadas por fatores genéticos, epigenéticos e/ou ambientais, abrangendo mais de duzentos tipos de doenças. Essa doença é caracterizada pela alteração de mecanismos que regulam o crescimento e a divisão das células normais, e também pela habilidade das células cancerosas de invadirem outros tecidos. Essa invasão das células tumorais por sua vez, se dá pela degradação da lâmina basal, facilitando então, uma interação direta entre células cancerosas e o tecido conjuntivo adjacente ao tumor, podendo assim originar focos neoplásicos metastáticos, os quais estão relacionados entre as principais causas de morte decorrentes da doença (Hanahan e Weinberg, 2011; Natarajan *et al.*, 2011).

O desenvolvimento do câncer ocorre bem lentamente, podendo haver formação do tumor muitos anos após a exposição ao agente carcinogênico. O processo de desenvolvimento do câncer se divide em três estágios principais, sendo o primeiro denominado de iniciação (dano no DNA), o segundo promoção (mudanças genéticas e epigenéticas adicionais aumentada com dano genômico no estágio de iniciação) e o terceiro e último progressão (se torna invasiva e metastática) (Figura 1). Na iniciação, as células apresentam alterações genéticas em decorrência da exposição a algum agente carcinogênico. No próximo estágio, promoção, a célula afetada inicia, lentamente, o processo de transformação maligna, caracterizado pela proliferação celular descontrolada e irreversível, formando uma massa tumoral no local. Por último, no

estágio de progressão, algumas células podem entrar em metástases. Sendo assim, adquirem a capacidade de invadir à corrente sanguínea e linfática e se instalar em outros tecidos do organismo (Pitot, 2011; Hanahan e Weinberg, 2011).

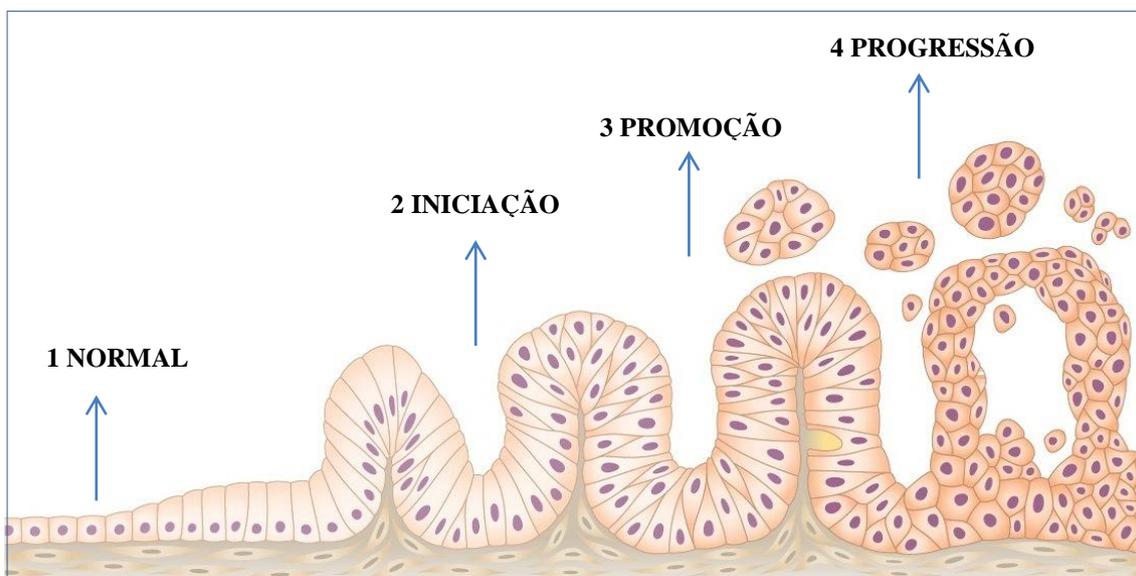


Figura 1: Estágios do desenvolvimento do câncer. **1** - células normais. **2** – mutação genética. **3** – transformação das células. **4** – proliferação descontrolada das células e metástases. Adaptado de: <http://www.medicinanet.com.br/conteudos/acp-medicine/5388>.

O câncer tem sido amplamente estudado em diferentes aspectos, desde prevenção da doença a novos tratamentos de cura. O cuidado com a prevenção ainda é, sem dúvidas o melhor remédio: cerca de um terço dos novos casos de câncer no mundo poderiam ser evitados (Hanahan e Weinberg, 2011; WHO, 2014).

O estilo de vida influencia sobremaneira a suscetibilidade do indivíduo ao desenvolvimento de câncer, de maneira que mais da metade dos novos casos da doença podem ser prevenidos ou eliminados com mudanças de hábitos ou abstenção à exposição ao tabaco, sedentarismo e nutrição inadequada (Colditz *et al.*, 2012; WHO, 2014).

Os tratamentos mais utilizados hoje para tratamento de pacientes diagnosticados com câncer são a radioterapia, quimioterapia e a cirurgia. Sendo que esses tratamentos também podem ser usados de forma combinada dependendo do estágio que se encontra a doença (WHO, 2014; Polom *et al.*, 2014; Yu *et al.*, 2014). As principais terapias anticâncer serão apresentadas mais adiante.

De acordo com Instituto Nacional do Câncer (INCA), somente no Brasil para o ano de 2014, são esperados 576 mil novos casos de câncer, número que deve se repetir também em 2015. Dentre os diferentes tipos de câncer, o de maior ocorrência será o câncer de pele tipo não melanoma (31,60 % dos novos casos), seguido pelos tumores de próstata (11,97%), mama feminina (9,89%), câncer de cólon e reto (5,72%), pulmão (4,67%), estômago (3,66%) e o câncer de colo do útero (2,60%) (Tabela 1) (INCA, 2014).

Para os casos de câncer de pele não melanoma, a estimativa é de aproximadamente 394 mil novos casos. Sendo uma estimativa de 51,78% para o sexo masculino. Nesse grupo, os cânceres mais incidentes serão os de próstata, pulmão, cólon e reto, estômago e cavidade oral. Para o sexo feminino essa estimativa será de 48,22%, como maior ocorrência dos cânceres de mama, cólon e reto, colo do útero, pulmão e câncer da glândula tireoide (Figura 2).

Tabela 1: Estimativas para o ano de 2014 das taxas brutas de incidência por 100 mil habitantes e de número de casos novos por câncer, segundo sexo e localização primária.

Localização Primária da Neoplasia Maligna	Estimativa dos Casos Novos							
	Homens				Mulheres			
	Estados		Capitais		Estados		Capitais	
	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta
Próstata	68.800	70,42	17.540	82,93	-	-	-	-
Mama Feminina	-	-	-	-	57.120	56,09	19.170	80,67
Colo do Útero	-	-	-	-	15.590	15,33	4.530	19,20
Traqueia, Brônquio e Pulmão	16.400	16,79	4.000	18,93	10.930	10,75	3.080	13,06
Cólon e Reto	15.070	15,44	4.860	22,91	17.530	17,24	5.650	23,82
Estômago	12.870	13,19	2.770	13,07	7.520	7,41	2.010	8,44
Cavidade Oral	11.280	11,54	2.220	10,40	4.010	3,92	1.050	4,32
Laringe	6.870	7,03	1.460	6,99	770	0,75	370	1,26
Bexiga	6.750	6,89	1.910	8,91	2.190	2,15	730	2,97
Esôfago	8.010	8,18	1.460	6,76	2.770	2,70	540	0,00
Ovário	-	-	-	-	5.680	5,58	2.270	9,62
Linfoma de Hodgkin	1.300	1,28	410	5,72	880	0,83	420	8,64
Linfoma não Hodgkin	4.940	5,04	1.490	6,87	4.850	4,77	1.680	7,06
Glândula Tireoide	1.150	1,15	470	1,76	8.050	7,91	2.160	9,08
Sistema Nervoso Central	4.960	5,07	1.240	5,81	4.130	4,05	1.370	5,81
Leucemias	5.050	5,20	1.250	5,78	4.320	4,24	1.250	5,15
Corpo do Útero	-	-	-	-	5.900	5,79	2.690	11,24
Pele Melanoma	2.960	3,03	950	4,33	2.930	2,85	1.150	4,57
Outras Localizações	37.520	38,40	9.070	42,86	35.350	34,73	8.590	36,49
Subtotal	203.930	208,77	51.100	241,30	190.520	187,13	58.710	248,46
Pele não Melanoma	98.420	100,75	19.650	92,72	83.710	82,24	22.540	95,26
Todas as Neoplasias	302.350	309,53	70.750	334,08	274.230	269,35	81.250	343,85

* Números arredondados para 10 ou múltiplos de 10. Fonte: INCA, 2014.

Localização primária	casos novos	%		Localização primária	casos novos	%
Próstata	68.800	22,8%		Mama Feminina	57.120	20,8%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	16.400	5,4%		Cólon e Reto	17.530	6,4%
Cólon e Reto	15.070	5,0%		Colo do Útero	15.590	5,7%
Estômago	12.870	4,3%		Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.930	4,0%
Cavidade Oral	11.280	3,7%		Glândula Tireoide	8.050	2,9%
Esôfago	8.010	2,6%		Estômago	7.520	2,7%
Laringe	6.870	2,3%		Corpo do Útero	5.900	2,2%
Bexiga	6.750	2,2%		Ovário	5.680	2,1%
Leucemias	5.050	1,7%		Linfoma não Hodgkin	4.850	1,8%
Sistema Nervoso Central	4.960	1,6%		Leucemias	4.320	1,6%

* Números arredondados para 10 ou múltiplos de 10.

Figura 2: Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2014, por sexo, exceto câncer de pele não melanoma. Fonte: Instituto Nacional do Câncer (INCA), Estimativa Câncer, 2014.

Dentre os diferentes tipos de câncer, destaca-se o câncer de mama que é considerado uma doença complexa em nível genético e é o de maior incidência em mulheres no mundo todo (DeSantis *et al.*, 2011).

1.1.1 Câncer de mama

O câncer de mama é uma doença causada pela multiplicação anormal das células da mama, que forma um tumor. Segundo tipo de câncer mais frequente no mundo, acometendo uma a cada oito mulheres. Para o ano de 2014, são estimados mais de 57.120 mil novos casos somente no Brasil. Estudos indicam que há um aumento de casos de câncer de mama tanto nos países desenvolvidos quanto nos países em desenvolvimento (Zhu, 2011; Noori e Hassan, 2012; INCA, 2014).

A idade é um fator primordial para o aparecimento do câncer de mama, a chance de contrair a doença aumenta à medida que a mulher envelhece. Outro fator está ligado à hereditariedade, uma vez que cerca de 4 a 9% dos casos de câncer de mama são geralmente causados pela mutação nos genes das proteínas BRCA1 e BRCA2. A expressão desses genes aumenta muito o risco do aparecimento da doença, principalmente em mulheres que têm casos na família com câncer de mama ou câncer de ovário (Kimmick e Balducci, 2000; Louwman *et al.*, 2008; Roukema *et al.*, 2011; AICR, 2007; Noori e Hassan, 2012;).

Outros fatores relacionados ao aparecimento da doença estão ligados aos hábitos de vida. Pessoas que fumam, não praticam algum tipo de exercício físico (sedentários) e possuem uma má alimentação estão relativamente mais susceptíveis à doença. Mulheres que tiveram menarca precoce (primeira menstruação), menopausa tardia, nuliparidade (mulheres que nunca tiveram filhos), gestação tardia (com mais de 30 anos), obesidade ou ciclos menstruais irregulares estão também mais susceptíveis a desenvolver câncer de mama. Em homens o diagnóstico do câncer de mama é muito raro, porém é possível (Colditz *et al.*, 2012; INCA, 2014).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO, do inglês *World Health Organization*) (2014), o surgimento de câncer de mama em mulheres com menos de 35 anos são relativamente raros. Porém, quando acometida em mulheres nessa faixa etária é considerada uma doença devastadora e de extrema gravidade, uma vez que, as mesmas se encontram no auge de seus anos reprodutivos e os tratamentos oferecidos podem trazer efeitos colaterais irreversíveis. Pensando nessas jovens, a Escola Europeia de Oncologia (ESO) em 2012, realizou a 1ª Conferência internacional de consenso para o câncer de mama em mulheres jovens (BCY1) na cidade de Dublin, Irlanda. O evento deu destaque a mulheres jovens portadoras da doença e também ênfases em campanhas de prevenção e diagnósticos (Cardoso *et al.*, 2014).

Os métodos mais recomendados para o diagnóstico precoce do câncer de mama são exames clínicos das mamas e a mamografia. Quando a doença é diagnosticada em estágios iniciais, o câncer de mama apresenta um bom prognóstico com taxa de aproximadamente 65% de sobrevivência dos pacientes, mas mesmo assim as taxas de mortalidade continuam crescendo. No Brasil e em outros países em desenvolvimento, esse aumento muito provavelmente é devido ao fato de que a doença só é diagnosticada em estágios mais avançados. Na população mundial, a sobrevivência média após cinco anos da doença é de 61% (Nelson *et al.*, 2009; INCA, 2014).

1.1.2 Os principais tratamentos do câncer de mama

Atualmente os tratamentos mais utilizados para o câncer de mama são cirurgia, radioterapia e as chamadas terapias sistêmicas: quimioterapia, terapia

hormonal e a imunoterapia (terapias alvo). A aplicação dos tratamentos varia de acordo com o estágio de desenvolvimento e localização do tumor, podendo ser usados combinadamente. A cirurgia consiste na remoção total ou parcial da mama (mastectomia), e muitas vezes também dos nódulos linfáticos adjacentes. Há casos em que é necessária a retirada dos ovários quando nos estágios metastáticos, dependendo do estágio em que se encontra o câncer. A mastectomia traz efeitos adversos como a diminuição da autoestima com a mutilação do órgão; fraqueza no braço próximo à cirurgia e suor nas mãos (Polom *et al.*, 2014; INCA, 2014).

Radioterapia é um tratamento oncológico baseado em radiações ionizantes que são capazes de destruir células tumorais. É considerado como tratamento comum e primário, cerca de 50% dos pacientes que tratam câncer de mama associam a radioterapia durante a quimioterapia. A eficiência da radioterapia é controlada com um pré-cálculo da radiação e do tempo da exposição ao paciente, sendo que esses cálculos irão depender do volume do tumor. Outro fator importante é sua aplicação de forma fracionária com várias aplicações para diminuir o risco de atingir tecidos normais. Porém o uso da radioterapia pode trazer efeitos adversos após sua aplicação. Segundo Lee e colaboradores (2013), os riscos de desenvolvimento de toxicidades crônicas associadas ao tratamento com radioterapia podem aparecer anos depois. Esses efeitos colaterais são caracterizados pelo aparecimento de edemas nos membros superiores, disfunção no ombro, que levaria uma alteração na qualidade de vida do paciente e complicações mais graves como carditoxicidade (DeVita *et al.*, 2011; Epperly *et al.*, 2014; INCA, 2014).

A quimioterapia é utilizada para tratamento de doenças causadas por agentes biológicos. No tratamento do câncer, o quimioterápico atinge preferencialmente células com elevadas taxas de proliferação, dentre elas as células cancerosas. Mesmo

assim a quimioterapia antineoplásica é acompanhada por efeitos adversos, como o comprometimento nas funções cognitivas, morte de células sanguíneas, alopecia, alterações gastrointestinais, perda de apetite e em alguns casos até infertilidade, dentre outros, decorrentes da ação de quimioterápicos em células não alvos (Guarneri, 2004; Hutchinson, 2012; INCA, 2014; Dietrich, 2014).

Terapia hormonal consiste na diminuição da produção de hormônios, como o estrógeno, conhecido por ser importante hormônio para o desenvolvimento de células tumorais, sendo então usados medicamentos que são moduladores seletivos da expressão de receptores ou inibidores da síntese de estrógeno. Uma das vantagens da terapia hormonal é sua associação com a cirurgia, através do uso de hormônios que atuam na redução do crescimento de tumores que antes seriam inoperáveis, tornando-os operáveis. Em contra partida, os efeitos adversos oriundos da terapia hormonal são diversos, como enjoos, náuseas, irregularidade nos períodos menstruais, alterações do endométrio, diminuição da libido, dores de cabeça, calores intensos e vagina ressecada. Outros efeitos adversos que as pacientes podem apresentar são riscos de trombose, redução na densidade mineral óssea e falência cardíaca, havendo então contra indicação em diversos casos (INCA, 2014; Van deVelde *et al.*, 2014).

A imunoterapia consiste na utilização de moduladores da atividade imunitária, auxiliando o sistema imunitário no combate das células tumorais. Este tipo de terapia é emergente nos estudos relacionados ao câncer. De acordo com Gianni e Bianchini (2014), o papel dos componentes do sistema imunitário para o tratamento do câncer, passa progressivamente de uma hipótese para uma ferramenta fundamentada em evidências sólidas. A imunoterapia também revela novos caminhos para o desenvolvimento de novos fármacos, não sendo somente utilizadas para o tratamento do câncer. No entanto, essa terapia ainda está na fase pré-clínica e precisa ser mais bem

compreendida para aplicação efetiva, além do mais traz alguns efeitos colaterais como fortes dores de cabeça, febres, náuseas, diarreias, danos no coração e pulmão (Gianni e Bianchini, 2014; INCA, 2014).

Diante do descrito, tratamentos menos danosos a saúde e a estética tem sido explorados em pesquisas no mundo todo, como por exemplo, a terapia fotodinâmica que apresenta excelentes resultados, com menos efeitos adversos.

1.2 Terapia fotodinâmica

Há aproximadamente duas décadas, a TFD foi à primeira técnica que utiliza combinação de luz e fototerápicos aprovada pela Associação Americana de Drogas e Alimentos (FDA, do inglês *Food and Drug Administration*). Atualmente, o FDA aprova o uso da TFD para o tratamento clínico de neoplasias em diferentes localizações, como por exemplo, na pele, cabeça e pescoço, esôfago, pulmão, pâncreas e também para tratamento de câncer de mama (Triesscheijn M *et al.*, 2006; Brown, 2004; Barnes, 2009; Arumainayagem, 2010).

A terapia fotodinâmica (TFD) é uma forma de tratamento que envolve luz, um agente fotossensibilizante (FS) e oxigênio. É considerada uma técnica muito segura e eficaz. O mecanismo de ação envolve um processo da fotossensibilização do tecido tumoral pela excitação do FS por uma luz em comprimento de onda específico. O tumor fotossensibilizado é exposto à irradiação com luz. A luz ativa o FS que por sua vez, faz uma transferência de energia para o oxigênio molecular contido no tecido alvo. Essa transferência de energia irá mudar a molécula de oxigênio (estado fundamental) para um estado mais excitado, formando assim espécies reativas de oxigênio (ERO) (Figura 3).

As ERO subsequentemente oxidam lipídios, aminoácidos e as proteínas das células, induzindo assim a necrose ou apoptose, além de estimular a transcrição, promover obstrução de vasos sanguíneos e liberação de mediadores de inflamação. A efetividade da TFD é determinada pelo suprimento de oxigênio e pode decair em condições de hipóxia tecidual (Wöhrle *et al.*, 1998; Taylor *et al.*, 2002; Brown, 2004; Biel, 2007; Calzavara-Pinton *et al.*, 2007; Firczuk, 2011; Mroz *et al.*, 2011).

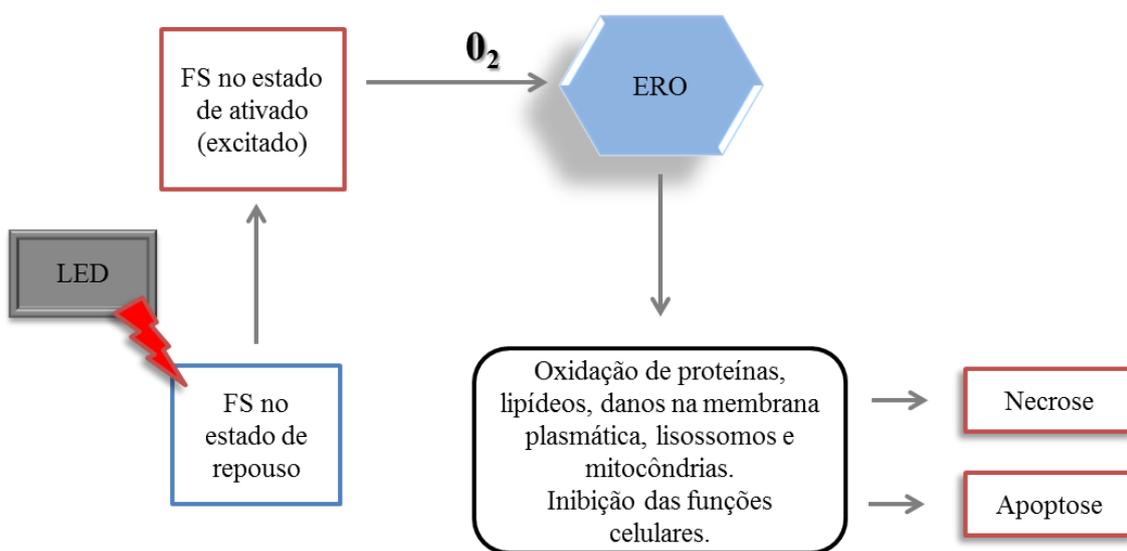


Figura 3. Esquema do mecanismo de ação da terapia fotodinâmica. O Fotossensibilizante é excitado com luz em comprimento de onda específico ocorrendo, a partir do O_2 tecidual, a formação de espécies reativas de oxigênio que são tóxicos a células tumorais. ERO: espécies reativas de oxigênio; FS: fotossensibilizante.

Quando a célula é submetida a esse processo da TFD, ocorre uma associação da molécula fotoativa à membrana plasmática, a permeação dessa molécula (FS) pode ser de duas formas, ativa ou passiva. A forma passiva é pelo citosol, com permeação por difusão ou osmose. Quando ocorre permeação ativa, o transporte ativo do FS é feito por endocitose. Sendo que, são observadas diferenças de concentração dos FS, tanto dentro quanto fora da célula. O processo ativo, envolve o transporte do FS através da membrana plasmática da célula com gasto de energia. Esse gasto de energia

pode ser diretamente influenciado pelo gradiente de concentração do FS utilizado (Castano *et al.*, 2004).

1.2.1 Fotossensibilizantes

Os FSs são componentes indispensáveis para o êxito da TFD, possuem diferentes características que os tornam uma das peças-chave para excelência da terapia. Dentre as características idealmente presentes nestes fototerápicos, encontram-se a pureza química, o acúmulo preferencial em tecidos tumorais, a ativação em comprimentos de onda específicos, a capacidade de geração de elevadas quantidades de espécies reativas de oxigênio (ERO), a rápida eliminação tecidual, minimizando danos a tecidos normais e atóxicos sem a exposição luminosa. A função principal dos FS na TFD é a transição da energia luminosa para energia química, essencial para a geração das ERO (Plaetzer *et al.*, 2009; Berlanda *et al.*, 2010).

De acordo com O'Connor *et al.*, (2009), os FSs utilizados na TFD são geralmente classificados como não porfirínicos ou porfirínicos. Os FS não porfirínicos como as antraciclina e as cianinas, demonstram aplicação clínica consideravelmente defasada em comparação à dos FSs porfirínicos, sendo assim pouco utilizados. Os FS são divididos em primeira, segunda e terceira geração. FS de 1ª geração são os porfímeros sódicos e derivados das hematoporfirinas (HpD). Segundo Macdonald e Dougherty (2001), os FS de 1ª geração apresentam baixa depuração pelo organismo, gerando prolongada retenção na pele e possuem limitações na absorção de luz em comprimentos de onda longos, sendo essas características indesejáveis para TFD.

Diante desses pontos negativos apresentados nos FS de 1ª geração, uma segunda geração de FS foi desenvolvida com intuito de melhorar os aspectos

indesejáveis acima citados. Os FS de 2ª geração apresentam maior pureza química, maior capacidade de absorver luz em comprimentos de onda longos, mais próximos da região do vermelho, e apresentam também uma melhor depuração pelo organismo, sendo assim menos retidos pela pele. Outras características que os fazem melhores fármacos fotossensíveis é o seu elevado rendimento quântico na geração de oxigênio singleto, maior estabilidade química e física, atóxico em ausência de luz, alto grau de pureza química e redução de efeitos secundários. (Phillips, 2010; O'Connor *et al.*, 2009).

Diante das inúmeras características favoráveis apresentadas pelos FS de 2ª geração, o FDA aprovou a aplicação terapêutica de alguns destes. Os FS aprovados no uso terapêutico são as texafirinas, ftalocianinas, purpurinas, protoporfirinas, porfíricos, benzoporfirinas (Visudyne®) e as clorinas (Temoporfin®). Sistemas formados pela associação dos FS de 2ª geração a carreadores nanoestruturados ou a compostos biológicos ativos, como por exemplo, anticorpos, peptídeos e ácido fólico, são denominados de FS de 3ª geração (Allison *et al.*, 2004; Phillips, 2010; Yano *et al.*, 2011).

Os FS são, em sua maioria, caracterizados como aromáticos e de natureza hidrofóbica. Em condições fisiológicas, esses FS podem sofrer agregação, reduzindo assim, significativamente os rendimentos quânticos de produção de ERO, principal fator citotóxico na TFD. Há também FS que são solúveis em água, porém neste caso, a seletividade e o acúmulo em tecidos tumorais não é suficientemente elevada para a utilização na clínica. Neste contexto, a incorporação destes FS em sistemas nanoparticulados como nanoemulsões poderá aumentar a solubilidade dos mesmos, assim como aumentar sua seletividade no tecido tumoral (Derycke, 2004; Paszko *et al.*, 2011).

1.2.1.1 O fotossensibilizante Cloreto de alumínio-ftalocianina

Ftalocianinas, são um tipo de FS que vem atraindo bastante atenção na área de TFD devido suas propriedades fotoquímicas e fotofísicas. As ftalocianinas apresentam um alto coeficiente de absorção espectral na faixa de comprimentos de onda longos, entre 650-850 nm, correspondendo ao intervalo da região do vermelho visível e com maior poder de penetração. Outras características desses FS estão relacionadas à alta eficiência, a rápida captação e ao longo tempo de retenção em células neoplásicas, e também possuem excelente capacidade de produção de ERO. (Chan *et al.*, 1990; Allison *et al.*, 2004; Detty *et al.*, 2004; Wainwright, 2008; O'Connor, 2009; Bonnett, 2010).

Para Muehlmann e colaboradores (2011), as ftalocianinas possuem como principal característica química a hidrofobicidade, o que é uma limitação para seu uso em sistemas biológicos. Neste contexto, para aumentar a eficiência desses FS, podem ser usadas nanoformulações como carreadores, permitindo a manutenção da forma monomérica ativa dos FS em meios hidrofílicos, bem como melhorar sua farmacocinética *in vivo*. Essa associação de FS a nanopartículas aumenta o controle da seletividade, uma vez que alterações na composição dos nanovetores como a adição de grupos funcionais e diferentes moléculas, podem ser feitos de forma a adequá-los para o transporte e direcionamento às células e tecidos-alvo em meio fisiológico. O direcionamento dos nanocarreadores potencializa o nível de absorção do FS em células tumorais, também evita a degradação do FS no organismo, aumentando a retenção em lugares específicos (Wang & Thanou, 2010).

Longo e colaboradores (2009) analisaram a eficiência da ftalocianina associada a lipossomos como mediador da TFD contra tumores de Ehrlich induzidos na

língua de camundongos Swiss. Este estudo mostrou que o tratamento ocasionou necrose em 90% e a eliminação da vascularização do tumor após a TFD mediada pelo lipossoma-ftalocinina, porém quando usada a ftalocinina na forma livre, não foi obtido mesmo sucesso.

1.2.1.2 O fitoterápico: Arrabidaea chica

O reino vegetal apresenta-se como uma grande fonte potencial de produtos químicos com atividades antitumorais e citotóxicas. Neste cenário, novos fármacos fotossensibilizantes estão sendo investigados a partir de metabólitos secundários de plantas, representando uma fonte alternativa de agentes anticâncer, que muitas vezes podem ser mais eficazes e/ou menos tóxicos em relação aos FS convencionais (Kim *et al.*, 2005; Ma e Wang, 2009).

Segundo Lohmann e Ulloa (2008), a *Arrabidaea chica* é uma planta que pertence à família Bignoniaceae na qual compreende 832 espécies divididas em 78 gêneros (Figura 4). É uma planta arbustiva generalizada que ocorre do Sul do México ao Brasil Central, particularmente na Bacia Amazônica, e também na África (Takemura *et al.*, 1995; Zorn *et al.*, 2001).

No Brasil, é conhecida também como crajiru (forma que aqui será usada), carajurú, capiranga, cipó-cruz, grajirú, crajurú, guarajurupiranga, pariri, piranga, calajouru, karajura, e krawiru (Albuquerque, 1980).



Figura 4: Imagem da Planta crajiru (*Arrabidaea chica*) mostrando as hastes e as folhas.
Fonte: www.google.com.br/crajiruimagens.

As folhas do crajiru são muito usadas em forma de banhos e chás por ter ação cicatrizante e anti-inflamatória no tratamento de cólicas intestinais, diarreias, anemias, inflamações uterinas, hemorragias, leucemia, icterícia, albuminúria, impingens, micoses e lavagem de ferimentos na pele. Essas funções são derivadas de alguns dos seus constituintes químicos como: alcaloides, flavonoides como antocininas e antocinosídeos, cumarinas, saponinas, taninos, triterpenos, dentre outros (Corrêa, 1984).

O crajiru também apresenta atividade anticancerígena e antioxidante, pois quando esses pigmentos são tratados com enzimas específicas, a planta libera agliconas. As agliconas são estruturalmente similares ao estrogênio e, portanto têm a capacidade de imitar as funções do estradiol no corpo humano (Setchell e Cassidy, 1999; Tsangalis *et al.*, 2004). Anderson e colaboradores (1999) mostraram, em estudo *in vitro* que as agliconas previnem as transformações de células normais em pré-malignas, tornando assim mais lenta a proliferação celular e atenuando a angiogênese.

Estudos com o extrato dessa planta para efeito fototóxico ainda são emergentes. Carvalho (2013) analisou a eficiência do extrato de cajuru associado a nanoemulsão como mediador da TFD contra células de carcinoma mamário de murinho (4T1). Este estudo mostrou que o extrato de cajuru irradiado com LED apresentava efeito citotóxico, o que não ocorreu quando não irradiado. Foi observado também, por análise no espectrofotômetro, que o extrato de cajuru apresenta absorção em comprimento de onda de 670 nm, interessante à TFD, além de uma alta capacidade de produção de ERO. Assim, o potencial uso deste extrato como fotossensibilizante ainda deve ser mais bem explorado.

1.3 Nanotecnologia e TFD

A ciência denominada nanotecnologia é multidisciplinar, baseada no desenvolvimento e na aplicação de estruturas na escala nanométrica. Em função do tamanho diminuto das nanoestruturas, geralmente com dimensões entre 1 e 300 nm, a nanotecnologia permite a fabricação, caracterização, manipulação e utilização destes materiais que apresentam propriedades físicas e químicas diferentes das observadas quando estes estão em escalas macroscópicas. Um dos campos dessa ciência é a nanobiotecnologia, que estuda materiais nanoestruturados e sua interação com sistemas biológicos (Gupta e Gupta, 2005; Farokhzad e Langer, 2006; L'azou *et al.*, 2008; Ramsden, 2014).

O uso da nanobiotecnologia tem despertado bastante interesse da comunidade científica no mundo todo. Principalmente pelos desafios relacionados à compreensão das propriedades físicas e químicas dos nanomateriais e pelas diversas possibilidades de aplicações biotecnológicas que esses materiais podem apresentar.

Chama a atenção o uso desses nanomateriais como sistemas carreadores de fármaco, na terapia gênica, na indução da magnetohipertemia, no diagnóstico por imagem e na terapia fotodinâmica antineoplásica (Batlle; Labarta, 2002; Yoo *et al.*, 2011; Yigit; Moore; Medarova, 2012; Passos *et al.*, 2013; Xiao *et al.*, 2014).

Matérias nanométricas ou nanomateriais são definidos como filmes finos (apresentam uma dimensão nanométrica), nanofios (apresentam duas dimensões nanométricas) e nanopartículas (apresentam três dimensões nanométricas) (Faleiros *et al.*; 2011; Ramsden e Freeman 2009; Ramsden, 2014).

Dentre os nanomateriais, destacam-se as nanoemulsões que são formadas por pequenas gotículas de óleo em água, sendo estabilizadas por um surfactante. As nanoemulsões apresentam tamanhos inferiores a 300 nm. A biocompatibilidade das matérias-primas (óleos de origem natural ou semissintética e fosfolipídeos) utilizadas para a obtenção desse sistema nanoparticulado o torna uma alternativa promissora para a administração de diversos tipos de moléculas. Assim, esses sistemas estão rapidamente se tornando fundamentais para estratégias inovadoras na prevenção e tratamento de diversas doenças, dentre estas o câncer como veículos carreadores de fármacos (Anton *et al.*, 2008, Date e Nagarsenker, 2008; Delmas, 2011).

As nanoemulsões utilizadas no carreamento de fármacos anticâncer têm como objetivo minimizar a degradação ou inativação do fármaco após administração, prevenir efeitos adversos como excesso de droga e aumentar a sua entrega ao seu local de ação. Assim, esta aplicação tem ganhado bastante destaque na literatura em tratamentos do câncer (Torchilin, 2007; Xiao *et al.*, 2014).

Segundo Srikanth e colaboradores (2011), a utilização do quimioterápico dacarbazina em nanoemulsão apresentou maior eficiência na diminuição de tumores de pele xenotransplantados em camundongos do que dacarbazina livre, aplicação

intratumoral. Em estudo feito por Ragelle e colaboradores (2012), o uso da nanoemulsão pode aumentar intensamente a biodisponibilidade de agentes antitumorais, como no uso da fisetina que teve sua eficiência aumentada quando associada a uma nanoformulação após ser administrada em camundongos portadores de tumor pele em comparação com a fisetina livre.

O estudo clínico piloto realizado por Passos *et al.* (2013) também mostrou que o uso de uma nova nanoemulsão de ácido 5-aminolevulínico (ALA) associado à terapia fotodinâmica (TFD) apresentou uma redução de 45% no campo de cancerização de pele de um paciente com câncer de pele, quando comparada com a formulação que é comercializada para esse tipo de tratamento, o MAL (METVIX[®]).

1.4 Cultura tridimensional de células

A cultura celular é uma ferramenta essencial para teste pré-clínicos, caracterizada por permitir a manutenção de células vivas em laboratório independente do organismo que a originou. O surgimento desta técnica possibilitou uma melhor compreensão dos mecanismos moleculares das células, permitindo importantes avanços científicos no que se refere, por exemplo, à produção de vacinas e à biologia da célula tumoral (Kenny, Lee *et al.*, 2007).

A cultura de células em três dimensões (3D) derivou-se inicialmente da cultura de células em duas dimensões (2D), monocamada. O diferencial da cultura 3D é permitir que as células explorem as três dimensões do espaço, portanto, aumentando as interações com o ambiente e entre as células. O crescimento das células neste sistema

forma estruturas denominadas de esferoides multicelulares. (PARKS *et al.*, 2003; Zhang, 2004; Kim, 2005).

Alguns autores consideram os esferoides oriundos de células tumorais um representante *in vitro* mais fidedigno do ambiente celular tumoral *in vivo* e tem recebido muita atenção no campo da biologia celular. Os esferoides não apresentam vascularização, característica essa que mimetiza tumores em estágio inicial de crescimento, outra característica é que apresentam micrometástases (Mueller-Klieser, 1978).

Segundo Hirschhaeuser e colegas (2010), as células dos esferoides de tumores apresentam padrões de distribuição de lactose, oxigênio e glicose diferentes, dependendo do microambiente em que as células se encontram dentro do esferoide (Figura 5). O mesmo acontece em relação à histomorfologia e ao tipo de fragmentação do DNA, exatamente como ocorre com os tumores *in vivo*, tornando esta ferramenta extremamente propícia nos estudos de terapias antineoplásicas.

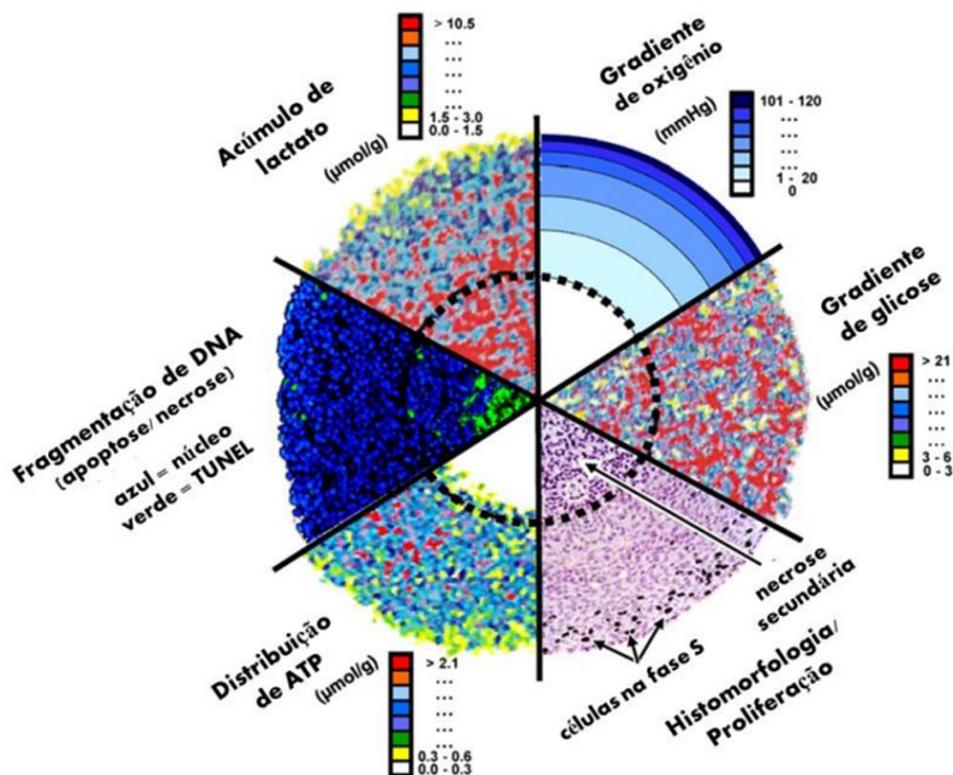


Figura 5: Combinação de imagens analíticas de seções medianas de esferoides estudados com diferentes técnicas, ilustrando os padrões de acúmulo de lactose; distribuição de trifosfato de adenosina (ATP), oxigênio e glicose; histomorfologia e fragmentação do DNA no microambiente dos esferoides. Imagem adaptada de Hirschhaeuser *et al.*, 2010.

A utilização da cultura de células tumorais crescidas em ambiente tridimensional (3D) já era feita desde os trabalhos iniciais desenvolvidos por Moscona (1957). Moscona analisou a interação de células de melanoma em agregados celulares, os quais ele denominou quimeras.

Kenny e colaboradores (2007) analisaram, em 25 linhagens de células de mama, as diferenças tanto morfológicas quanto de expressão gênica nestas linhagens que foram crescidas em ambiente 3D. Os autores confirmaram que a formação de estruturas acinares somente ocorria em células normais. Já nas células tumorais, eles perceberam que quanto maior era o grau de desenvolvimento do câncer, mais fraca era a interação das células no esferoide.

Seguindo esta mesma abordagem, Han e colaboradores (2010) conseguiram relacionar marcadores moleculares com expressão fenotípica de linhagens celulares de mama. Por meio deste método, foi possível estabelecer diferentes classes morfológicas (observadas somente em ambiente 3D) e, em cada uma destas classes, avaliar aspectos comuns como, por exemplo, a expressão da proteína ERBB2 (aspecto importante para o prognóstico).

A célula MCF-7 é uma linhagem mamária humana que apresenta um fenótipo tumoral (Soule, Vazquez *et al.*, 1973). Esferoides desta célula são utilizados em diversos ensaios que envolvem testes de fármacos e radioterapia (Ivascu e Kubbies, 2007; Debeb, Xu *et al.*, 2010). Células MCF-7, quando crescidas em ambiente 3D com Matrigel, formam esferoides que não apresentam estruturas luminais. Esse fato fez com que alguns autores utilizassem essa linhagem para compreender melhor a formação luminal. A modulação de moléculas de adesão (Kirshner, Chen *et al.*, 2003), a utilização de co-cultura com fibroblastos (Krause, Maffini *et al.*, 2010) bem como um maior tempo de cultura 3D (Do Amaral, Urabayashi *et al.*, 2010) apontam para a possibilidade de reversão de algumas características tumorais. Segundo Perche e Torchilin (2012), estudos de investigação da combinação de fármacos antitumorais associados à nanopartículas vêm sendo empregados à técnica de cultivo em 3D, para avaliação de permeação e citotoxicidade em esferoides.

2 Justificativa

A nanobiotecnologia tem mostrado um grande potencial para revolucionar o tratamento e o diagnóstico de diversas doenças, principalmente do câncer. Dentre as diversas aplicações biomédicas dos nanomateriais destaca-se o seu uso como sistemas carreadores de fármaco e, também, o uso destes carreadores em terapia fotodinâmica. Diante deste panorama, cada vez mais o desenvolvimento de pesquisas nanotecnológicas que visam a obter melhores resultados no tratamento de câncer, em especial, do câncer de mama, vem crescendo nos últimos anos.

Assim, a busca de novas formulações de fármacos anticâncer mais eficientes e seguras passa a ser um desafio e este trabalho vem a contribuir neste cenário de modo a desenvolver formulações com dois tipos de fotossensibilizantes, o cloreto de alumínio-ftalocianina e o extrato bruto de cajuru, como alternativas para a aplicação da terapia fotodinâmica no tratamento do câncer de mama. Além disso, outro diferencial deste trabalho é a análise desta eficácia sobre um modelo de cultura de células cancerosas em três dimensões (3D), representando vantagens em relação ao modelo em monocamada assim como se aproximando mais à realidade *in vivo* do câncer.

3 Objetivos

3.1 Objetivo geral

- Avaliar o efeito da terapia fotodinâmica mediada por extrato de cajuru ou cloreto de alumínio-ftalocianina veiculado em nanoemulsões contra células de câncer de mama (linhagem MCF-7) em cultivos de células bidimensional e tridimensional.

3.2 Objetivos Específicos

- Após a preparação das nanoemulsões com extrato de cajuru (NE-ECr) e com cloreto de alumínio-ftalocianina (NE-AIFtCl), serão avaliadas as variáveis físicas de NE-ECr e de NE-AIFtCl - diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersão e o potencial zeta nas seguintes condições: logo após o preparo, em meio de cultivo celular e em diferentes temperaturas por 365 dias;
- Avaliar as propriedades fotofísicas de NE-ECr e de NE-AIFtCl - espectros de absorção e de emissão: logo após o preparo e em diferentes temperaturas por 365 dias;
- Avaliar a produção de espécies reativas de oxigênio pela NE-ECr e a NE-AIFtCl em diferentes concentrações;
- Avaliar o efeito do LED na viabilidade das células MCF-7 e MCF-10A (células epiderme mamário não tumoral);
- Visualizar a incorporação de NE-ECr e de NE-AIFtCl pelas células MCF-7;

- Avaliar o efeito do LED na viabilidade das células MCF-7 e MCF-10A após exposição às nanoemulsões sem os fotossensibilizantes (NE-LECr/NE-LAlFtCl);
- Avaliar o efeito da terapia fotodinâmica mediada pelo AlFtCl na viabilidade das células MCF-7 e MCF-10A;
- Avaliar o efeito da terapia fotodinâmica mediada por diferentes concentrações de NE-ECr e NE-AlFtCl na viabilidade das células MCF-7 e MCF-10^a (linhagem no);
- Avaliar a viabilidade das células MCF-7 e MCF-10A após diferentes tempos da aplicação da terapia fotodinâmica mediada por NE-Ecr e NE-AlFtCl;
- Padronizar a formação de esferoides de células MCF-7;
- Avaliar o efeito da terapia fotodinâmica mediada por NE-ECr e NE-AlFtCl em esferoides de MCF-7.

4 Material e Métodos

4.1 Equipamentos, Materiais e Reagentes

As listas de equipamentos, materiais e reagentes utilizadas nesse estudo estão descritas nas tabelas 2, 3 e 4.

Tabela 2: Lista de Equipamentos

Equipamentos	Modelo	Fabricante
Agitador Magnético	Q221M	Quimis, BRA
Autoclave	Vitate 12	Cristófoli, BRA
Balança Analítica	AA200	Denver Instrument, USA
Banho Maria	240-2	J. Prolab, BRA
Banho Ultra Sônico	T-14	Thornton, BRA
Câmera Digital	Moticam 2300 3.0MP	Live Resolution, BRA
Centrifuga de Bancada	Excelsa Baby	Fanem, BRA
Centrifuga com Rotor de Placas	Universal 320R	LtettichZentrifugen,ALE
Espectrofotômetro	Spectramax M2	Molecular Devices, USA
Estufa	TLZ 10	DeLeo, BRA
Fluxo Laminar	CFLV 12	Veco, BRA
Incubadora de CO ₂	3425	Thermo S. Inc.,USA
LED	XL001WP01NRC660	Shenzhen S. O. Co., CHI
Microscópio de Luz Invertido	Ck 2	Olympus. JPN
Microscópio Confocal	SP5	Leica, BRA
Refrigerador	DC39	Eletrolux, BRA
Zetasizer	ZS90	Malvern/ Reino Unido

Tabela 3: Tabela de Materiais

Materiais	Fabricante
Criotubos	TPP, CHE
Filtro para Seringa (0,22 μm)	TPP, CHE
Frascos de Cultura (25 cm^3 e 75 cm^2)	TPP, CHE
Hemocitômetro de Neubauer	C. A. Hausser & Son, USA
Lâminas para Microscopia	Bioslide
Lamínulas para Microscopia	Exacta Perfecta, BRA
Lamínulas para Microscopia (redondas)	Glasscyto
Micropipetas	Gilson. Inc., USA
Micropipeta Multicanal	Gilson. Inc., USA
Microplacas (12 e 96 poços)	TPP, CHE
Ponteiras para Micropipetas	Axygen, USA
Seringas	Advantive, NLD

Tabela 4: Lista de Reagentes

Reagentes	Fabricante
1,3-difenil-isobenzofurano (DBF)	Sigma-Aldrich Co., USA
4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI)	Sigma-Aldrich Co., USA
Agarose <i>Low Melting</i>	Invitrogen [®]
Antibiótico (Penicilina e Estreptomicina)	Gibco, USA
Azul Trypan	Sigma-Aldrich Co., USA
Bicarbonato de Sódio	Sigma-Aldrich Co., USA
Cloroformio PA	Sigma-Aldrich Co., USA
Kolliphor [®] (Kolliphor [®] ELP)	Sigma-Aldrich Co., USA
CytoTox 96 [®] (Non-Radioativo Cytotoxicity)	Invitrogen, USA
DMSO	Mallinkrodt Chemicals, USA
DMEM	Gibco, USA
EGF	Sigma-Aldrich Co., USA
Etanol 98 ⁰ GL	Sigma-Aldrich Co., USA
Extrato Bruto de Crájiru	UEA, BRA
Ham's F12	Gibco, USA
Hidrocortisona	Sigma-Aldrich Co., USA
Insulina Bovina	Sigma-Aldrich Co., USA
MTT	Invitrogen, USA
Óleo de Rícino (Castor oil)	Sigma-Aldrich Co., USA
Óleo Tricilglicerois capricho/caprílico	Sigma-Aldrich Co., USA
Soro Equino	Gibco, USA
Soro Fetal Bovino	Gibco, USA
Paraformaldeido 4%	Sigma-Aldrich Co., USA
ProLong [®] Gold Antifade Reagente	Life, BRA
PBS	Laborclin, BRA
Toxina Colérica	Sigma-Aldrich Co., USA
Tripsina-EDTA	Gibco, USA

4.2 Obtenção do extrato de *crajiru* (*Arrabidaea chica*)

Arrabidaea chica foi obtida em janeiro de 2011, na Reserva Florestal Humaitá, especificadamente coletada nas coordenadas 9°45'18"S 67°36'50"W, localizada a 33 km de Rio Branco, no município de Porto Acre, Estado do Acre, pelo prático em taxonomia botânica Edilson Consuelo de Oliveira, e a obtenção do extrato seguiu a metodologia descrita por Graebner *et al.*, (2000). Após a coleta da planta ainda verde (4,650 kg), foram retiradas as partes aéreas incluindo folhas e hastes, em seguida, as amostras foram secas em estufa a 50 °C e obteve-se 2,3 kg de material vegetal seco. Uma porção de 800 g foi triturada e postas em infusão em Etanol 98⁰ GL. O material foi filtrado e o líquido extraído foi evaporado em rotaevaporador com pressão reduzida, retendo o extrato etanólico 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 gramas e denominado extrato etanólico seco. A partir dos 68 g foi realizada a extração com clorofórmio PA obtendo-se 1,80 g de produto final, denominado de extrato clorofórmico de *crajiru* ou extrato de *crajiru* (ECr). Esse procedimento foi realizado na Universidade do Acre e o material foi gentilmente cedido pelo Professor Doutor Igor Degterev.

4.3 Preparação das nanoemulsões

As nanoemulsões foram desenvolvidas no Laboratório de Nanobiotecnologia da Universidade de Brasília – UnB pelo Professor Doutor Luis Alexandre Muehlman. As nanoemulsões foram produzidas por nanoemulsificação espontânea. Resumidamente, foram dispostos em um béquer o surfactante, óleo e FS e, na sequência, foi adicionada água destilada. Em seguida, a mistura foi deixada sob agitação magnética branda a 60 °C por uma hora (Figura 6). Foram obtidas duas nanoemulsões distintas, uma contendo o extrato de Crajiu (NE-ECr) e outra contendo cloreto de alumínio-ftalocianina (NE-AlFtCl).

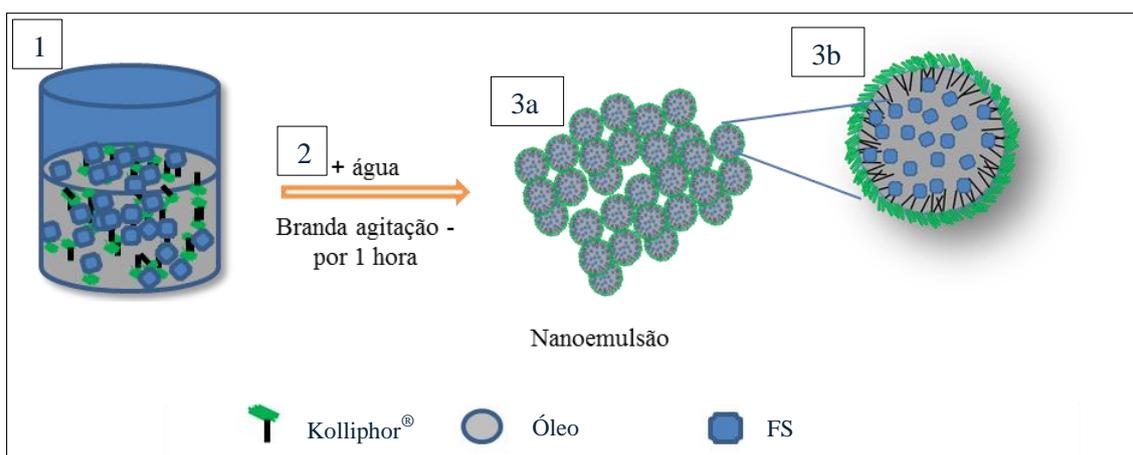


Figura 6: Esquema ilustrativo da preparação das nanoemulsões. 1- surfactante, óleo e FS adicionados em um béquer. 2 - adição de água destilada, sob-branda agitação. 3a - obtenção das nanoemulsões. 3b - aumento das nanoemulsões representando a localização de cada componente.

A nanoemulsão contendo o extrato de Crajiru (NE-ECr) foi obtida utilizando Kolliphor[®] ELP como tensoativo e o óleo utilizado foi o triacilgliceróis cáprico/caprílico como o solubilizante, na proporção de 3:1, respectivamente. A concentração de extrato de crajiru nesta nanoformulação foi de 7 mg/mL. Também foi obtida, nas mesmas condições, a nanoformulação sem ECr (NE-LECr).

Para a nanoemulsão contendo cloreto de alumínio-ftalocianina (AlFtCl) foi utilizado Kolliphor[®] como tensoativo e o óleo rícino como o solubilizante, a proporção

usada foi de 3:1, respectivamente. A concentração de AlFtCl na nanoformulação final (NE-AlFtCl) foi de 40 μM (0,00023 mg/mL). Também foi obtida, nas mesmas condições, nanoformulação sem AlFtCl (NE-LAlFtCl).

4.3.1 Caracterização e avaliação da estabilidade físicas das NE-ECr e NE-AlFtCl

As variáveis físicas como o diâmetro hidrodinâmico (DH), índice de polidispersão (IPD) e potencial zeta (Zt) das nanoformulações (NE-ECr e NE-AlFtCl) foram analisadas logo após o preparo (tempo 0). Para esse experimento foram utilizados 20 μL de cada nanoformulação diluídos em 980 μL de PBS, independentemente, ou seja, 0,14 mg/mL de NE-ECr e 0,08 μM de NE-AlFtCl. Também foram realizadas as caracterizações físicas descritas nessa seção das nanoformulações sem os FS (NE-LECr e NE-LAlFtCl). As amostras foram então postas em cubetas e analisadas por dispersão dinâmica de luz (DLS) em Zetasizer (Zetasizer, ZS90, Malvern).

Para avaliação da estabilidade coloidal, alíquotas das nanoformulações foram armazenadas em microtubos de centrifugação em diferentes temperaturas: geladeira (4 °C), em temperatura ambiente de aproximadamente 25 °C (~25 °C) e em estufa a 37 °C. Assim, em cada tempo proposto (até 365 dias) foram feitas as diluições das nanoformulações e suas variáveis físicas foram aferidas, como descritas nessa seção. As nanoformulações estavam estéreis para que não houvesse nenhuma possível interferência. A esterilização das nanoemulsões foi feita por filtragem em filtros com poros de diâmetro médio de 0,22 μm dentro do fluxo laminar devidamente limpo com álcool 70% e exposto a U.V. por 15 minutos. O *Software* do aparelho Zetasizer foi ajustado na temperatura de 25 °C, com leitura em 90 graus, e a amostra tiveram as variáveis aferidas três vezes.

4.3.1.1 Avaliação dos parâmetros físicos das NE-ECr e NE-AIFtCl quando expostas ao meio de cultivo celular

A fim de verificar se as amostras das nanoemulsões (NE-ECr e NE-AIFtCl) mantêm suas estabilidades sob a influência da temperatura fisiológica e o contato com os meios de cultura que foram utilizados nos ensaios biológicos com cultivo de células (MCF-7 e MCF-10A), as amostras foram incubadas por 30 minutos nas condições de temperatura de 37 °C, 5% de CO₂ e 80% de umidade, independentemente, com os dois tipos de meio de cultura para cada linhagem, o meio DMEM das células MCF-7 e o meio DMEM-F12 das células MCF- 10A. Em seguida, os parâmetros físicos (DH, IPD e Zt) foram mensurados como descritos no item 4.3.1. As amostras utilizadas neste experimento estavam armazenadas a 4 °C. O experimento foi realizado com amostras em triplicada.

4.3.2 Caracterização e avaliação da estabilidade fotofísica das NE-ECr e NE-AIFtCl

A caracterização e a estabilidade fotofísica das nanoformulações (NE-ECr e NE-AIFtCl) foram realizadas pela avaliação dos espectros de absorção (absorbância) e emissão de fluorescência utilizando o espectrofotômetro. Os espectros de absorção e de fluorescência dos FS foram analisados nos intervalos de comprimentos de onda listados na Tabela 5.

Tabela 5: Comprimentos de onda ajustados para acessar os picos de absorção e emissão de fluorescência das nanoformulações (NE-ECr e NE-AIFtCl).

	NE-ECr (NE-LECr)	NE-AIFtCl (NE-LAIFtCl)
Absorbância (nm)	$\lambda = \text{Em. } 400\text{-}800$	$\lambda = \text{Em. } 400\text{-}800$
Fluorescência (nm)	$\lambda = \text{Ex. } 350 \text{ Em. } 400\text{-}750$	$\lambda = \text{Ex. } 350 \text{ Em. } 400\text{-}750$

NE-ECr: nanoemulsão contendo extrato de cajuru. NE-LECr: nanoemulsão sem extrato de cajuru. NE-AIFtCl: nanoemulsão contendo cloreto de alumínio-ftalocianina. NE-LAIFtCl: nanoemulsão sem cloreto de alumínio-ftalocianina. nm: nanômetro. Em: emissão. Ex: excitação. λ significa comprimento de onda.

Para avaliação da estabilidade fotofísica, alíquotas das NE-ECr e de NE-AIFtCl foram armazenadas e mensuradas nas mesmas concentrações e nos mesmos intervalos de tempo descritos na seção 4.3.1. Assim, 200 μL das amostras foram postas em microplacas de 96 poços e os espectros foram mensurados. Esta metodologia foi adaptada de Nunes *et al.*, (2004). Em cada experimento realizado as amostras foram analisadas em triplicata.

4.3.3 Avaliação da Produção de Espécies Reativas de Oxigênio pelas NE-ECr e NE-AIFtCl

Para determinação da capacidade das amostras de gerarem espécies reativas de oxigênio (ERO) ou oxigênio singleto, foi utilizado o método de degradação do benzofurano- $^1\text{O}_2$ -dependente, descrito por Spiller e colaboradores (1998). O reagente 1,3-difenil-isobenzofurano (DBF) é uma molécula que possui pico de absorção característico em $\lambda = 414 \text{ nm}$, na medida em que há geração de oxigênio singleto ($^1\text{O}_2$), esta molécula é degradada e sua absorbância decai em relação diretamente proporcional à geração desta espécie reativa.

Para esse experimento, foi preparado uma solução de DBF da seguinte forma, 0,0022 µg do DBF foi pesado em balança de precisão em béquer de 25 mL, em seguida, foram adicionados 10 mL de etanol absoluto. A solução obtida foi posta em balão volumétrico de 10 mL, deixado em banho ultrassônico por 10 minutos, para que houvesse uma melhor solubilização do reagente. Posteriormente, 200 µL das nanoformulações em diluições seriadas, (para a NE-ECr foram de 0,0000003 – 0,0001 mg/mL e para a NE-AlFtCl foi de 0,16 – 20 µM), foram preparadas e dispostos em microplacas de 96 poços para leitura em espectrofotômetro. Em seguida, foram adicionados 10 µL da solução de DBF às nanoformulações em cada poço, sem irradiação, e feita leitura em espectrofotômetro. As nanoformulações com a solução de DBF foram irradiadas por 10 segundos (fluência de 25,9 j/cm²) e em seguida lidas com espectrofotômetro, esse procedimento se repetiu até que houvesse a estabilização da absorbância das amostras. O *Software* do aparelho Espectrofotômetro foi ajustado em *EndPoint*, absorbância em comprimento de onda de 414 nm.

4.4 Ensaios de atividade biológicas das NE-ECr e NE-AlFtCl in vitro

4.4.1 Linhagens Celulares

As linhagens celulares utilizadas foram células epiteliais de glândula mamária de origem humana denominadas de MCF-10A e MCF- 7 (Tabela 6). As linhagens foram obtidas da ATCC[®] (American Type Culture Collection – Manassas, VA, EUA) por meio do banco de células do Rio de Janeiro. Somente a MCF-7 foi comprada, MCF-10A foi

gentilmente cedida pela Professora Doutora Maria Mitzi Brentani da Universidade de São Paulo, USP.

Tabela 6: Linhagens celulares utilizadas no presente estudo.

Linhagens Celulares (humana)	Descrição
MCF-10A	epiderme mamário não tumoral
MCF-7	adenocarcinoma mamário

4.4.2 Manutenção das Linhagens Celulares em Monocamada (2D)

Neste presente estudo, as linhagens celulares foram preservadas em criotubos contendo 5% de DMSO e 95% de soro fetal bovino (SFB) para células MCF-7 e em soro fetal de cavalo (SFC) para células MCF-10A, sendo devidamente identificadas e armazenadas em tanque de nitrogênio líquido em Câmara Fria no Laboratório de Nanotecnologia da Universidade de Brasília – UnB. Alíquotas dessas células na concentração de 2×10^6 células/mL foram retiradas do tanque de nitrogênio líquido e descongeladas a 37 °C. Em fluxo laminar (esterilizado – álcool 70% e luz UV por 15 minutos), as alíquotas foram transferidas para tubo de centrifugação de 15 mL, adicionou-se mais 1 mL de meio (específico para cada linhagem) e em seguida foi centrifugado a 750 g por três minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspense em 1 mL de meio de cultura, que foi transferido para garrafas de cultivo celular de 25 cm³, identificadas e mantidas em incubadora a 37 °C e atmosfera de 5% CO₂ e 80% de umidade.

O meio de cultura usado para células MCF-7 foi DMEM tamponado com bicarbonato de sódio, pH 7,2 e suplementado com 10% (v/v) SFB, penicilina 100 UI/mL e estreptomicina 100 µg/mL. Para células MCF-10A foi usado meio DMEM (não

suplementado) e DMEM-F12 (1:1) tamponados com bicarbonato de sódio, pH 7,2 suplementado com uma concentração final de 5% de soro fetal de cavalo, 20 ng/mL de fator de crescimento epidermal, 0,5µg/mL de hidrocortisona, 100 ng/mL de toxina colérica e 10 µg/mL de insulina (DMEM-F12). Os cultivos foram mantidos em incubadora a 37 °C e atmosfera de 5% CO₂ e 80% de umidade e quando necessário o meio de cultivo era trocado.

4.4.2.1 Estabelecimento de Subculturas

O estabelecimento de subculturas era feito a partir da remoção da monocamada das células confluentes das garrafas de 25 cm³ cultivo inicial e transferência de menor densidade para uma nova garrafa de 75 cm². Quando as células atingiam uma confluência de aproximadamente 80%, eram desassociadas enzimaticamente com 4 mL do reagente Tripsina-EDTA 0,25% deixado em incubadora por três minutos. Após o desprendimento das células, foram adicionados 4 mL de meio de cultura para neutralizar a tripsina, em seguida o conteúdo da garrafa foi transferido para um tubo de centrifugação de 15 mL e centrifugado a 750 g por três minutos. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas com 1 mL de meio de cultura. Para determinação da quantidade de células viáveis, 10 µL da suspensão foram adicionados a 90 µL de Azul de Tripán (0,4% em PBS) – este corante não é capaz de penetrar em células que apresentam a membrana plasmática intacta. Do preparado contendo o corante, 10 µL foram retirados e aplicados em hemocítômetro de Neubauer. A concentração de células foi determinada baseando-se em seus quadrantes laterais e de acordo com a equação abaixo:

$$\frac{\text{Numero de células contadas}}{\text{Numero de quadrantes}} \times \text{Fator de diluição} \times 10^4 = \text{Numero de células/mL}$$

Após a contagem de cada linhagem celular, 20% das suspensões foram repassadas para uma nova garrafa. Cada repassagem foi registrada sendo que foram utilizadas as células com no máximo 10 passagens. O meio de cultivo foi trocado a cada 72 horas. Para a realização dos experimentos, após a quantificação, as células foram transferidas para microplacas de cultura de acordo com o experimento a ser realizado.

4.4.3 Visualização da incorporação intracelular nas células MCF-7 expostas as NE-ECr e NE-AIFtCl

Para visualização das NE-ECr e NE-AIFtCl, células MCF-7 foram dispostas em placas de 12 poços, contendo uma lamínula redonda de 20 mm de diâmetro ao fundo, na concentração de 5×10^4 células/poço. Após 24 horas de cultivo nas condições descritas na seção 4.4.2, com as células já aderidas à lamínula, o meio de cultivo foi removido e foram adicionados 100 μ L das suspensões das nanoformulações em meio de cultura nas seguintes concentrações: 0,125 mg/mL para NE-ECr e de 0,125 μ M para NE-AIFtCl, e as células foram incubadas por 15 minutos a 37 °C e atmosfera de 5% CO₂ e 80% de umidade. As células foram lavadas novamente com PBS por duas vezes e fixadas com paraformaldeído 4% (m/v) por 15 minutos, lavadas por duas vezes com PBS, em seguida, as células expostas ao corante DAPI por 15 minutos a TA. O corante DAPI foi utilizado para marcação do núcleo das células, lavadas por mais duas vezes. Depois, e então foi adicionada uma gota de AntiFade. As lamínulas foram retiradas com auxílio de um pinça

e montadas em lâmina. As lâminas prontas foram analisadas em microscópio confocal utilizando comprimentos de excitação e de emissão para DAPI de 358 e 461 nm, respectivamente. Para visualização do ECr o comprimento de excitação foi de 350 e de emissão de 690 nm. Para AIFtCl foram utilizados os comprimentos de excitação e emissão de 405 e 633 nm, respectivamente. Como controle foi realizado o mesmo processo, mas sem as nanoformulações ou com as nanoformulações na ausência dos FS (NE-LECr e NE-LAIFtCl).

4.4.4 Determinação da viabilidade celular pelo método de MTT

Para determinar a viabilidade celular de MCF-10A e MCF-7 após os tratamentos nos cultivos em monocamada (2D) foi utilizado o método de avaliação colorimétrica de brometo de 3 (4,5 dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil-tetrazólio (MTT), descrita por Mosmann (1983). Após os tratamentos propostos, as células foram expostas à solução de MTT em meio de cultivo respectivo de cada linhagem. Essa solução em células viáveis interage com as desidrogenases mitocondriais como a succinil desidrogenase, promovendo a redução do reagente MTT a um composto denominado formazan, o mesmo possui coloração púrpura e é insolúvel em meios hidrofílicos. A viabilidade celular é indicada pela quantificação da produção de cristais de formazan de acordo com a presença de desidrogenases ativas.

Brevemente, após os tratamentos nos tempos estabelecidos, o meio de cultura foi substituído por um novo meio contendo MTT a 10%. O preparado foi incubado a 37 °C e atmosfera de 5% CO₂ e 80% de umidade. A solução contendo MTT foi removida após duas horas e 200 µL de DMSO foram adicionados para a solubilização

do formazan (cristais). A partir da medida do espectro de absorbância com comprimento de onda de 595 nm obtido em espectrofotômetro conjugado à leitora de microplacas, foi quantificada a produção de formazan e, portanto, determinada a viabilidade celular.

4.4.5 Efeito do LED na viabilidade celular

A finalidade desse ensaio constituiu em determinar se a luz do Diodo emissor de luz com $25,9 \text{ j/cm}^2$ (LED), sem a presença das nanoemulsões (NE-ECr/NE-AIFtCl), era capaz de induzir morte celular. O experimento foi baseado em Monge-Fuentes (2014). Para tanto, as células MCF-7 foram cultivadas em microplacas de 96 poços na concentração de $1,5 \times 10^4$ células/poço nas condições descritas na seção 4.4.2. Após o período de 24 horas, o meio de cultivo celular foi descartado, e as células foram lavadas por duas vezes com PBS. Em seguida, foi montado o LED em um suporte de metal a uma distância de cinco centímetros da microplaca, dentro do fluxo laminar previamente limpo com álcool 70% e irradiado com luz U.V. por 15 minutos (Figura 7). As células incubadas com 100 μL de PBS foram irradiadas utilizando LED por 10 minutos, e em seguida o PBS foi removido e as células foram cultivadas sob as condições descritas na seção 4.4.2 por 24 horas. Foram realizados três experimentos independentes cada um com sete amostras testadas.

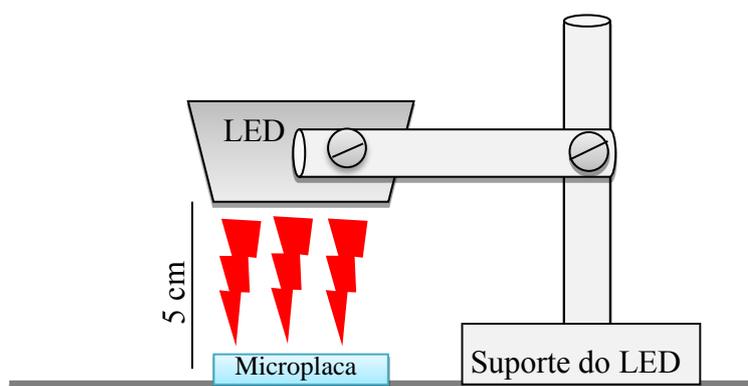


Figura 7: Esquema ilustrativo da montagem do LED em fluxo laminar utilizando um suporte de metal. Diodo emissor de luz com $25,9 \text{ j/cm}^2$ (LED).

Células nas mesmas condições desta seção descrita, não irradiadas pelo LED, foram utilizadas como controle. O LED utilizado emitia luz com comprimento de onda de 660 nm e potência máxima de 130 mW no centro do ponto focal. Esse experimento foi feito nas mesmas condições com as células MCF-10A, mudando apenas o meio de cultivo (DMEM-F12) e a concentração de $0,5 \times 10^4$ células/poço. Após 24 horas, o efeito do LED na viabilidade celular foi determinado por MTT conforme descrito na seção 4.4.4. Foram realizados três experimentos independentes cada um com sete amostras testadas.

4.4.6 Efeito do LED com nanoformulações sem os fotossensibilizantes (NE-LECr/NE-LAlFtCl) na viabilidade celular

Esse experimento constituiu em determinar a viabilidade celular após a exposição das células às nanoemulsões sem o extrato de cajuru (NE-LECr) e as nanoemulsões sem do cloreto de alumínio-ftalocianina (NE-LAlFtCl) juntamente com a irradiação do LED como descrito em 4.4.5. Assim, $1,5 \times 10^4$ células/mL de MCF-7 foram dispostas em placas de 96 poços e após 24 horas o meio de cultivo foi removido, as células lavadas com PBS e incubadas por 15 minutos com diferentes concentrações de NE-LECr e NE-LAlFtCl, a 37°C e atmosfera de 5% CO_2 e 80% de umidade (Figura 8). Após este período, as células foram lavadas duas vezes com PBS e expostas ao LED como descrito na seção 4.4.5. Células nas mesmas condições desta seção descrita, porém não irradiadas foram utilizadas como controle e deixadas em estufa. Após 24 horas, a viabilidade celular foi determinada por MTT conforme descrito na seção 4.4.4.

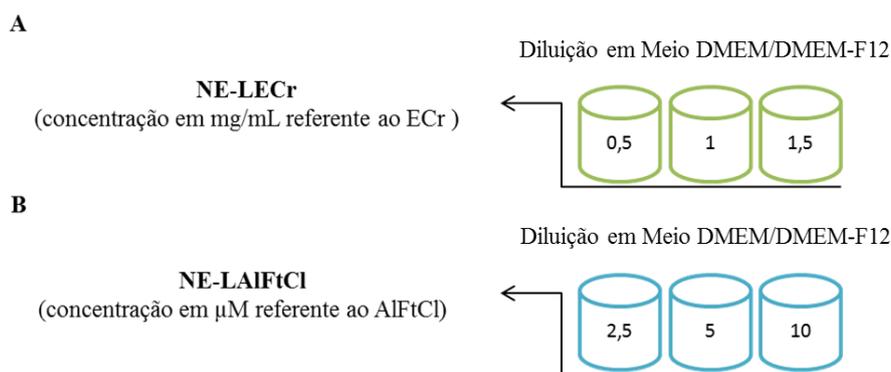


Figura 8: Diferentes concentrações das nanoemulsões sem os fotossensibilizantes (FS). As concentrações foram referentes ao FS. **A** – Diluições de NE-LECr utilizadas no tratamento com as células MCF-10A e MCF-7. **B** - Diluições de NE-LECr utilizadas no tratamento com as células MCF-10A e MCF-7. NE-ECr: nanoemulsões com extrato bruto de cajuru. NE-AlFtCl: nanoemulsões com cloreto de alumínio-ftalocianina. DMEM-F12: meio de cultura das células MCF-10A. DMEM: meio de cultura das células MCF-7.

Esse mesmo experimento foi realizado com as células MCF-10A nas mesmas condições, mudando apenas o meio de cultura (DMEM-F12) e a concentração de $0,5 \times 10^4$ células/poço (Figura 8). Foram realizados três experimentos independentes cada um com sete amostras testadas.

4.4.7 Efeito da terapia fotodinâmica mediada por AlFtCl na viabilidade celular

Esse experimento foi realizado a fim de avaliar a viabilidade das células MCF-10A e das MCF-7 após exposição ao fotossensibilizante AlFtCl- livre e o LED. Assim, $1,5 \times 10^4$ células/mL de MCF-7 ou $0,5 \times 10^4$ células/mL de MCF-10A foram dispostas em microplacas de 96 poços, independentemente, após 24 horas o meio de cultivo foi removido, as células lavadas com PBS e incubadas a 37°C e atmosfera de 5% CO_2 e 80% de umidade por 15 minutos com diferentes concentrações do AlFtCl diluídos em etanol 10% (Figura 9). Após este período, as células foram lavadas duas vezes com PBS e expostas ao LED como descrito na seção 4.4.5. Foram utilizadas como controle as

células MCF-10A e MCF-7 nas mesmas condições desta seção descrita, porém não foram irradiadas pelo LED. Após 24 horas, a viabilidade celular foi determinada por MTT conforme descrito na seção 4.4.4. Foram realizados três experimentos independentes, cada um com sete amostras testadas.

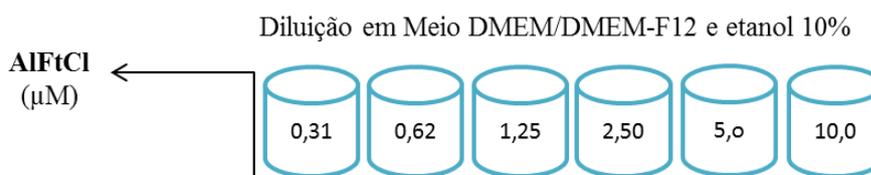


Figura 9: Diferentes concentrações em meio de cultivo (DMEM ou DMEM-F12) e etanol 10% da AIFtCl que foram utilizadas nas células MCF-10A e MCF-7. **A** – Diluições da AIFtCl utilizadas no tratamento com as células MCF-10A e MCF-7. AIFtCl: cloreto de alumínio-ftalocianina. DMEM-F12: meio das células MCF-10A. DMEM: meio das células MCF-7.

4.4.8 Efeito da terapia fotodinâmica mediada por ECr e AIFtCl associados a nanoemulsões na viabilidade celular

Este teste foi realizado de modo a avaliar a eficácia do ECr e AIFtCl em nanoemulsões como mediadores fotossensibilizantes empregados na terapia fotodinâmica (TFD). Para tanto, $1,5 \times 10^4$ células MCF-7 foram dispostas em placas de 96 poços e incubadas a 37 °C e atmosfera de 5% CO₂ e 80% de umidade por 24 horas. Findo o período de incubação, o meio de cultivo foi descartado, e foram adicionados 100 µL de diferentes concentrações de NE-ECr ou NE-AIFtCl (Figura 10). As células permaneceram incubadas por 15 minutos a 37 °C e atmosfera de 5% CO₂ e 80% de umidade. Em seguida, as células foram lavadas duas vezes com PBS e expostas ao LED como descrito na seção 4.4.5. Células nas mesmas condições desta seção descrita, porém não irradiadas

pelo LED foram utilizadas como controle. Após 24 horas, a viabilidade celular foi determinada por MTT conforme descrito na seção 4.4.4.

Esse experimento foi realizado com as células MCF-10A nas mesmas condições, mudando apenas o meio de cultura (DMEM-F12) e a concentração para $0,5 \times 10^4$ células/poço (Figura 10). Foram realizados três experimentos independentes cada um com sete amostras testadas.

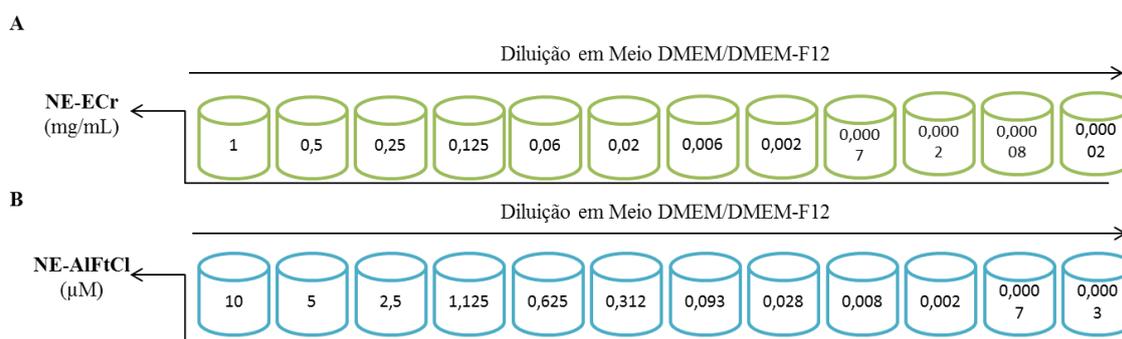


Figura 10: Diferentes concentrações em meio de cultivo (DMEM/DMEM-F12) das amostras NE-ECr e das NE-AIFtCl que foram utilizadas. As setas indicam a diminuição das concentrações utilizadas. **A** – Diluições de NE-LECr utilizadas no tratamento com as células MCF-10A e MCF-7. **B** - Diluições de NE-LECr utilizadas no tratamento com as células MCF-10A e MCF-7. NE-ECr: nanoemulsões com extrato bruto de cajuru. NE-AIFtCl: nanoemulsões com cloreto de alumínio-ftalocianina. DMEM-F12: meio de cultura das células MCF-10A. DMEM: meio de cultura das células MCF-7.

4.4.9 Avaliação da viabilidade celular após diferentes tempos da terapia fotodinâmica

A partir dos resultados da viabilidade celular após a TFD mediada por NE-ECr e NE-AIFtCl foram definidas as concentrações citotóxicas das nanoemulsões que mataram 50% (CC_{50}) e 100% (CC_{100}) de MCF-7. Para avaliar a viabilidade celular após a TFD, foi realizado o ensaio com MTT com 24, 48 e 72 horas da aplicação da TFD. As células, tanto normais quanto tumorais, foram expostas a CC_{50} e CC_{100} da MCF-7 uma vez que esta é a célula alvo da TFD.

Para tanto, $1,5 \times 10^4$ células MCF-7/poço ou $0,5 \times 10^4$ células MCF-10A/poço foram dispostas em placas de 96 poços e incubadas a 37°C , 5% CO_2 por 24 horas. Findo o período de incubação, o meio de cultivo foi descartado e foram adicionados 100 μL de 0,0013 mg/mL (CC_{50}) ou 0,007 mg/mL (CC_{100}) de NE-ECr ou 0,0028 μM (CC_{50}) ou 0,093 μM (CC_{100}) de NE-AlFtCl. As células permaneceram incubadas por 15 minutos a 37°C , 5% CO_2 . Em seguida, as células foram lavadas duas vezes com PBS e expostas ao LED como descrito na seção 4.4.5. Células mantidas nas mesmas condições aqui descritas, porém não irradiadas pelo LED, foram utilizadas como controle. Após 24, 48 e 72 horas, a viabilidade celular foi determinada por MTT conforme descrito na seção 4.4.4. Foram realizados três experimentos independentes cada um com sete amostras testadas.

4.5 Cultivo celular em três dimensões: obtenção dos esferoides

A técnica de cultivo celular em 3D ainda não havia sido estabelecida no Laboratório de Nanobiotecnologia da UnB. Portanto, esse presente estudo estabeleceu o cultivo em três dimensões (3D) de células baseando-se em Perche e Torchilin (2012), com adaptações. As células utilizadas para obtenção dos esferoides foi MCF-7. Brevemente, 50 μL de solução de agarose *Low Melting* a 1,5 % em água destilada foram dispostos em cada poço de microplacas de 96 poços. A solução de agarose foi utilizada para impedir a adesão das células ao fundo dos poços. Em seguida, as células foram processadas como descrito na sessão 4.4.2. Foram adicionadas $1,5 \times 10^4$ células a cada poço. Em seguida, as microplacas foram submetidas à centrifugação por 15 minutos a 4000 RPM. Findo o tempo de centrifugação, as microplacas foram mantidas em incubadora a 37°C e atmosfera de 5% CO_2 e 80% de umidade. A formação dos esferoides

foi monitorada e fotografada diariamente utilizando microscópio de luz invertido Ck 2 (Olympus, Japão) com câmera digital (Moticam 2300 3.0MP, Life Resolution, Brasil) conjugada. Foi utilizada magnificação de 10x para todas as imagens obtidas. O cultivo em 3D foi mantido até os esferoides atingirem aproximadamente 200-250 μm de diâmetro (6° dia). Então, foram iniciados os experimentos com as nanoformulações (NE-ECr e NE-AlFtCl).

4.5.1 Citotoxicidade utilizando Kit Cytotox 96

Para determinar a citotoxicidade das nanoemulsões (NE-ECr/NE-AlFtCl) nos tratamentos com os esferoides foi utilizado o kit CytoTox 96[®] (Non-Radioativo Cytotoxicity, Invitrogen) como previamente descrito em Perche e Torchilin (2012). O kit CytoTox 96[®] quantifica lactato desidrogenase (LDH), uma enzima citosólica que é liberada após a lise celular. Portanto, em cada poço contendo um único esferoide foram coletados exatos 40 μL do meio de cultivo e misturados com 40 μL do reagente CytoTox 96[®], mantidos ao abrigo da luz por 30 minutos. Em seguida, a absorbância foi lida utilizando espectrofotômetro com leitora de placas. Como controles foram utilizados meio DMEM com e sem os tratamentos (nas mesmas concentrações da Figura 11). Os valores de absorbâncias obtidas dos controles foram utilizados para normalizar os tratamentos. O *Software* do aparelho Espectrofotômetro foi ajustado em *EndPoint*, absorbância com comprimento de onda de 490 nm.

4.5.2 Terapia fotodinâmica mediada pelo ECr e AlFtCl associados a nanoemulsões para tratamento dos esferoides

Esse experimento foi baseado no cultivo em 2D, portanto, das diferentes concentrações utilizadas na seção 4.4.7, foram escolhidas três concentrações de cada nanoemulsão que apresentou um CC_{100} quando irradiada e não citotóxica no escuro. Segundo Perche & Torchillin (2012), os esferoides “maduros”, ou seja, com seis dias de cultivo apresentam uma membrana de proteção que dificulta a incorporação de fármacos durante o tratamento. Portanto, os esferoides formados a partir do cultivo descrito na seção 4.5 foram expostos a diferentes concentrações das NE-ECr e NE-AIFtCl (Figura 11) por 30 e 60 minutos, independentemente, em incubadora a 37 °C e atmosfera de 5% CO_2 e 80% de umidade, ao abrigo da luz. Findo os tempos estabelecidos, os esferoides foram expostos ao LED como descrito na seção 4.4.5 por um tempo de 20 minutos com fluência de 25,9 j/cm^2 . A determinação da citotoxicidade nos esferoides foi feita como descrito na seção 4.5.2. Foram realizados dois experimentos independentes e as amostras testadas em quadruplicatas.

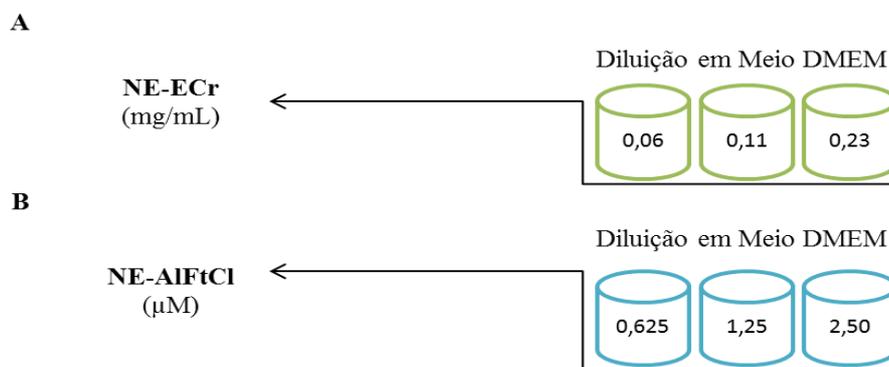


Figura 11: Diferentes concentrações em meio de cultivo (DMEM) das NE-ECr e das NE-AIFtCl que foram utilizadas no cultivo 3D. **A** – Diluições das NE-LECr utilizadas no tratamento com as células MCF-10A e MCF-7. **B** - Diluições das NE-LECr utilizadas no tratamento com as células MCF-10A e MCF-7. NE-ECr: nanoemulsões com extrato bruto de cajuru. NE-AIFtCl: nanoemulsões com cloreto de alumínio-ftalocianina. DMEM-F12: meio das células MCF-10A. DMEM: meio das células MCF-7.

4.6 Análises Estatística

Os dados foram avaliados por meio de estatística paramétrica ou não paramétrica de acordo com a distribuição da normalidade. Para os dados paramétricos foi realizada ANOVA (análise de Variância) seguido do teste Tukey-Kramer e os não paramétricos foram analisados com o teste de Kruskal-Wallis, seguindo do teste de Dunn. O programa estatístico utilizado foi GraphPad Prims 5 (GraphPad software, EUA). Valores *outlier*, ou seja, isolados, foram descartados pelo program Grubbs.

5 Resultados

5.1 Características Físicas das Nanoemulsões

A Tabela 7 apresenta as características físicas das nanoemulsões associadas ou não aos fotossensibilizantes, extrato de cajuru (NE-ECr) ou cloreto de alumínio-ftalocianina (NE-AIFtCl), logo após sua preparação. Observa-se que todas as nanoformulações apresentam inicialmente o diâmetro hidrodinâmico (DH) inferior a 30 nm e com índice de polidispersão (IPD) inferior a 0,15 indicando a monodispersividade das amostras. O potencial zeta (Zt) apresentou uma alteração significativa, muito provavelmente pela carga do AIFtCl que é levemente negativa.

Tabela 7: Valor médio do diâmetro hidrodinâmico (DH), do índice de polidispersão (IPD) determinado pelo espalhamento dinâmico de luz, e o potencial zeta (Zt) por mobilidade eletroforética determinados a partir do, das nanoemulsões NE-ECr, NE-LECr, NE-AIFtCl e NE-LAIFtCl após a preparação dispersas em PBS. Em PBS (pH 7,4)

Propriedades Físicas			
Nanoemulsões	DH (nm)	IPD	Zt (-mV)
NE-ECr	29,56 ± 0,63	0,140 ± 0,01	-3,43 ± 0,23
NE-LECr	27,45 ± 0,54	0,09 ± 0,23	-4,56 ± 0,32
NE-AIFtCl	25,08 ± 0,28	0,131 ± 0,20	-6,24 ± 0,47
NE-LAIFtCl	24,33 ± 0,27	0,094 ± 0,28	-3,84 ± 0,56

NE-ECr: nanoemulsão contendo extrato de cajuru. NE-LECr: nanoemulsão sem extrato de cajuru. NE-AIFtCl: nanoemulsão contendo cloreto de alumínio-ftalocianina. NE-LAIFtCl: nanoemulsão sem cloreto de alumínio-ftalocianina. nm: nanômetro.

5.1.1 Características físicas das nanoemulsões dispersas em meio de cultivo

A Tabela 8 apresenta as características físicas das NE-ECr e NE-AIFtCl dispersas em meio de cultivo DMEM/DMEM12 suplementados por 30 minutos em temperatura de 37 °C, 5% de CO₂ e 80% de umidade. Não foram observadas diferenças significativas no DH, IPD e no potencial zeta em meio de cultivo quando comparadas as nanoemulsões dispersas em água destilada.

Tabela 8: Valor médio do diâmetro hidrodinâmico (DH), do índice de polidispersão (IPD) determinado pelo espalhamento dinâmico de luz, e o potencial zeta (Zt) por mobilidade eletroforética determinados a partir do, das nanoemulsões NE-ECr, NE-LECr, NE-AIFtCl e NE-LAIFtCl após a preparação dispersas em meio de cultivo, DMEM e DMEM/F12.

Nanoemulsões	Propriedades Físicas		
	DH (nm)	IPD	Zt (-mV)
<i>DMEM</i>			
NE-ECr	29,45 ± 5,54	0,189 ± 0,12	-3,57 ± 0,82
NE-AIFtCl	25,57 ± 2,34	0,130 ± 0,09	-3,15 ± 1,54
<i>DMEMF12</i>			
NE-ECr	28,78 ± 3,45	0,179 ± 0,17	- 3,45 ± 0,78
NE-AIFtCl	25,89 ± 1,23	0,109 ± 0,31	-2,95 ± 0,96

NE-ECr: nanoemulsão contendo extrato de cajuru. NE-AIFtCl: nanoemulsão contendo cloreto de alumínio-ftalocianina.

5.2 Caracterizações fotofísica das nanoemulsões (NE-ECr e NE-AIFtCl)

A caracterização fotofísica por espectroscopia das NE-ECr mostrou picos de absorção e de emissão de luz na região do vermelho. Na Figura 12 observam-se os

espectros de absorvância e de fluorescência de NE-Ecr. Na Figura 12A, um único pico de absorção a 668 nm foi detectado, o que não ocorreu quando foram analisadas as NE-LECr. Em Figura 12B representa o pico único de emissão de fluorescência (excitação em 350 nm) a 676 nm, diferentemente das NE-LECr que não apresentam pico de emissão.

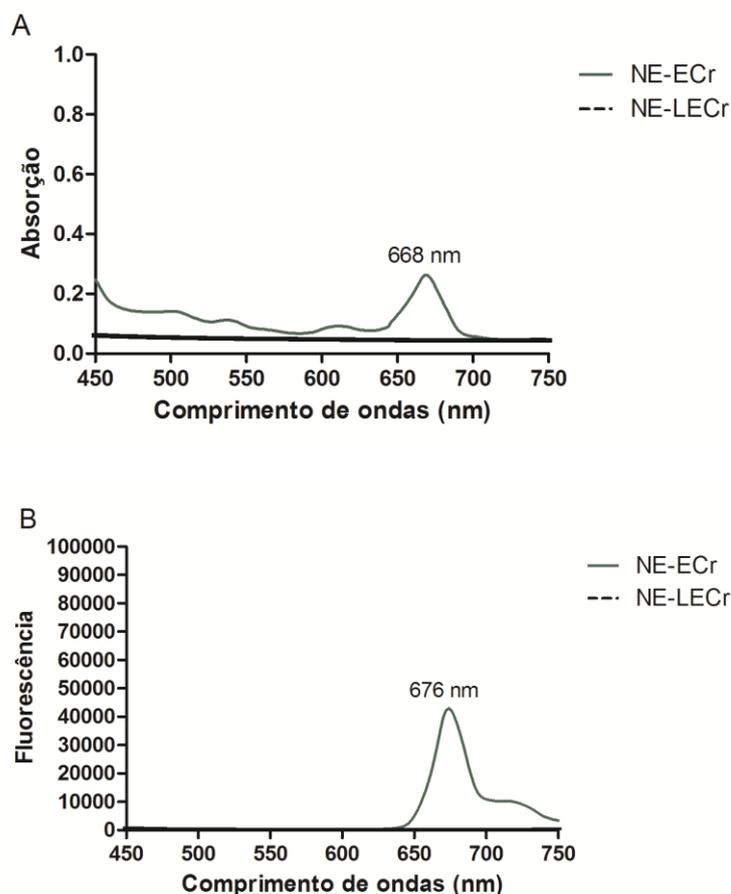


Figura 12: Espectro de absorção (absorbância) e de emissão de fluorescência (excitação em 350 nm) das nanoemulsões com ou sem Extrato Bruto de Crajiru (ECr) após sua preparação. Em **A** – mostra o pico de absorção de 668 nm da NE-ECr, e não é observado nenhum pico para as NE-LECr; em **B** – representa o pico de emissão de 676 nm das NE-ECr e ausência de emissão de luz para NE-LECr. NE-ECr: nanoemulsões com extrato de crajiru, NE-LECr: nanoemulsões sem extrato de crajiru. Eixo Y (unidade arbitrária).

Também foi observado picos de absorção e emissão de luz na região do vermelho para as NE-AlFtCl (Figura 13). O maior pico de absorção apresentado pelas

NE-AIFtCl foi de 676 nm e o de emissão de fluorescência (excitação em 350 nm) foi de 680 nm.

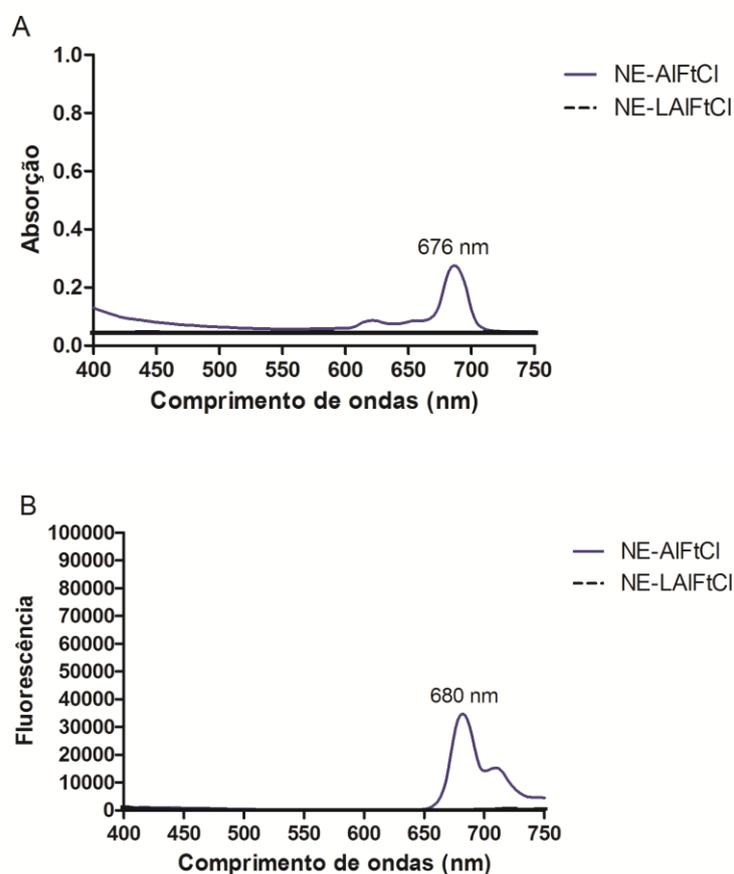


Figura 13: Espectro de absorção (absorbância) e de emissão de fluorescência (excitação em 350 nm) das nanoemulsões com e sem cloreto de alumínio-Ftalocianina (AIFtCl), após a preparação. Em **A** - mostra o pico de absorção de 676 nm das NE-AIFtCl, e não é observado nenhum pico para as NE-LAIFtCl; em **B** – representa o pico de emissão de 680 nm das NE-AIFtCl e ausência de emissão de luz para NE-LAIFtCl. NE-AIFtCl: nanoemulsão com cloreto de alumínio-ftalocianina. NE-LAIFtCl: nanoemulsão sem cloreto de alumínio-ftalocianina. Eixo Y (unidade arbitrária).

5.3 Estabilidade das nanoemulsões com extrato de cajiru (NE-ECr)

5.3.1 Determinação da estabilidade física das NE-ECr

A determinação da estabilidade físicas das NE-ECr acondicionadas em diferentes temperaturas (4 °C, ~25 °C e 37 °C) foi realizada ao longo do tempo, sendo analisados o diâmetro hidrodinâmico (DH), o índice de polidispersão (IPD) e o potencial zeta (Zt) por DLS. Como observado na Figura 14, as NE-ECr foram estáveis por todo o tempo de análise (365 dias) nas condições de armazenamento de 4 °C e ~25 °C, mantendo o DH abaixo de 35 nm, porém foi observado um aumento expressivo no DH médio das amostras armazenadas a 37 °C (Figura 14A). Esse aumento foi significativo após sete dias da preparação e continuou até o 105º dia ($p < 0,001$) comparado com amostra no tempo 0, e com as outras condições de armazenamento. Diante desse resultado, a análise de todos os parâmetros físicas e fotofísica da amostra armazenada a 37 °C foi interrompida com 105 dias.

O IPD das NE-ECr ao longo dos 365 dias se manteve abaixo de 0,25 para todas as temperaturas analisadas, variando entre 0,25 e 0,08 (Figura 14B). Este resultado indica que as NE-Cr mantêm a condição de monodispersão ao longo do tempo analisado.

Na Figura 14C, estão representados os resultados do potencial zeta (Zt) ao longo de 365 dias. Observa-se que, para todas as temperaturas analisadas, o potencial zeta se manteve negativo durante todo tempo de análise. Este valor está muito próximo ao valor encontrado para as nanoemulsões após a preparação ($-3,43 \pm 0,23$ mV)

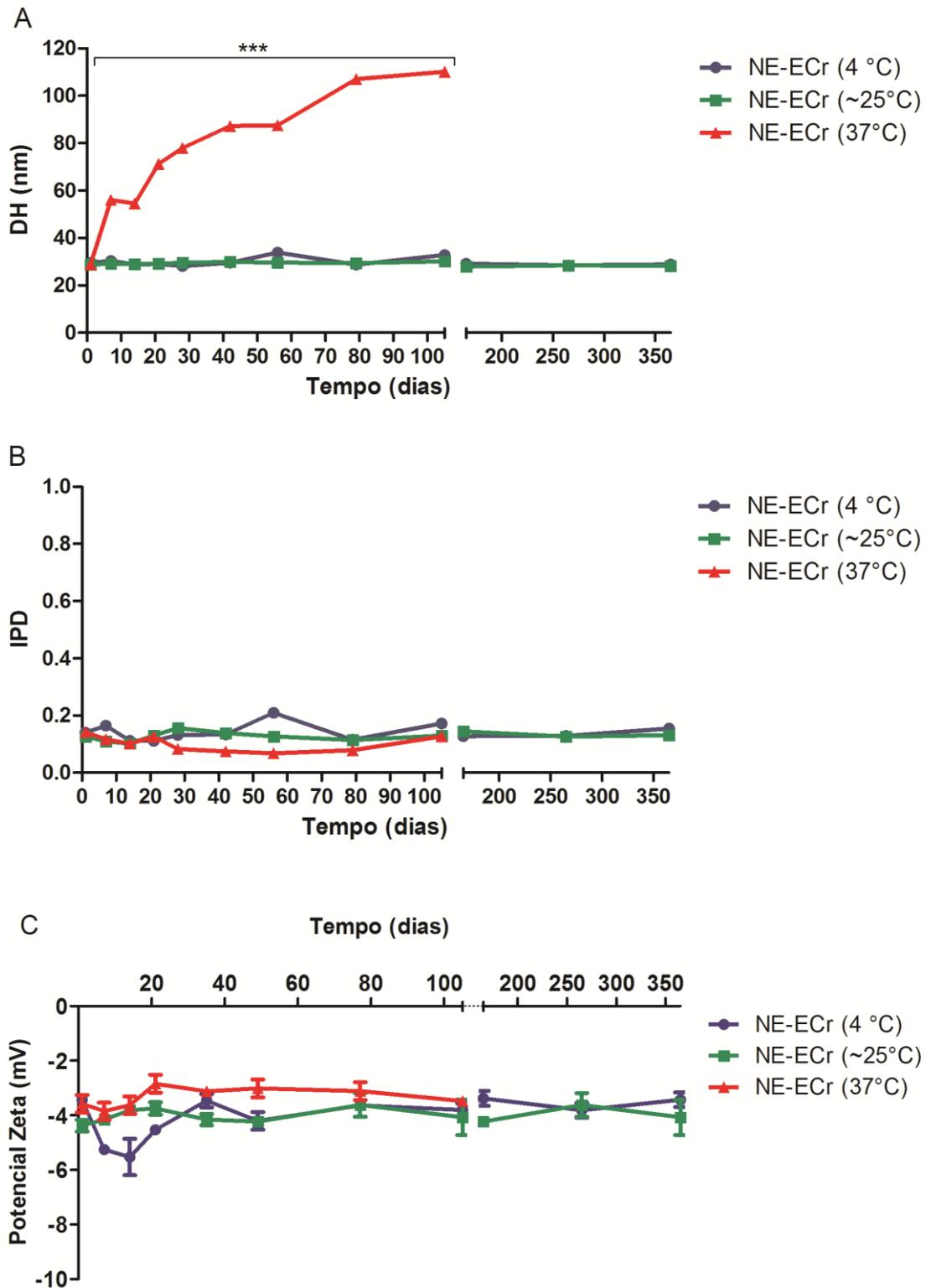


Figura 14: Avaliação da estabilidade físicas por dispersão dinâmica de luz (DLS) das nanoemulsões com extrato de crajiru (NE-ECr) armazenadas sob as condições de 4 °C (linha azul), ~25 °C (linha verde) e 37 °C (linha vermelha) ao longo de 365 dias. **A** – Diâmetro Hidrodinâmico (DH). **B** – Índice de Polidispersão (IPD). **C** – Potencial Zeta (Zt). Os dados estão representados como média ± E. P. M. para triplicatas. *** significa $p < 0,001$.

5.3.2 Determinação da estabilidade fotofísica das NE-ECr

Os resultados apresentados na Figura 15 mostram a estabilidade fotofísica das NE-ECr a partir da manutenção dos picos de absorção em 668 nm e de emissão em 674 nm das nanoemulsões mantidas a 4 °C e ~25 °C durante 365 dias e a 37 °C por 105 dias.

As amostras armazenadas nas diferentes condições de temperaturas apresentaram pico de absorção com valores abaixo de 1,0 e não foi observada diferença significativa entre as condições analisadas. (Figura 15A).

O pico de emissão de fluorescência também se manteve estável não apresentando diferenças significativas entre as temperaturas e o tempo de análise (Figura 15B).

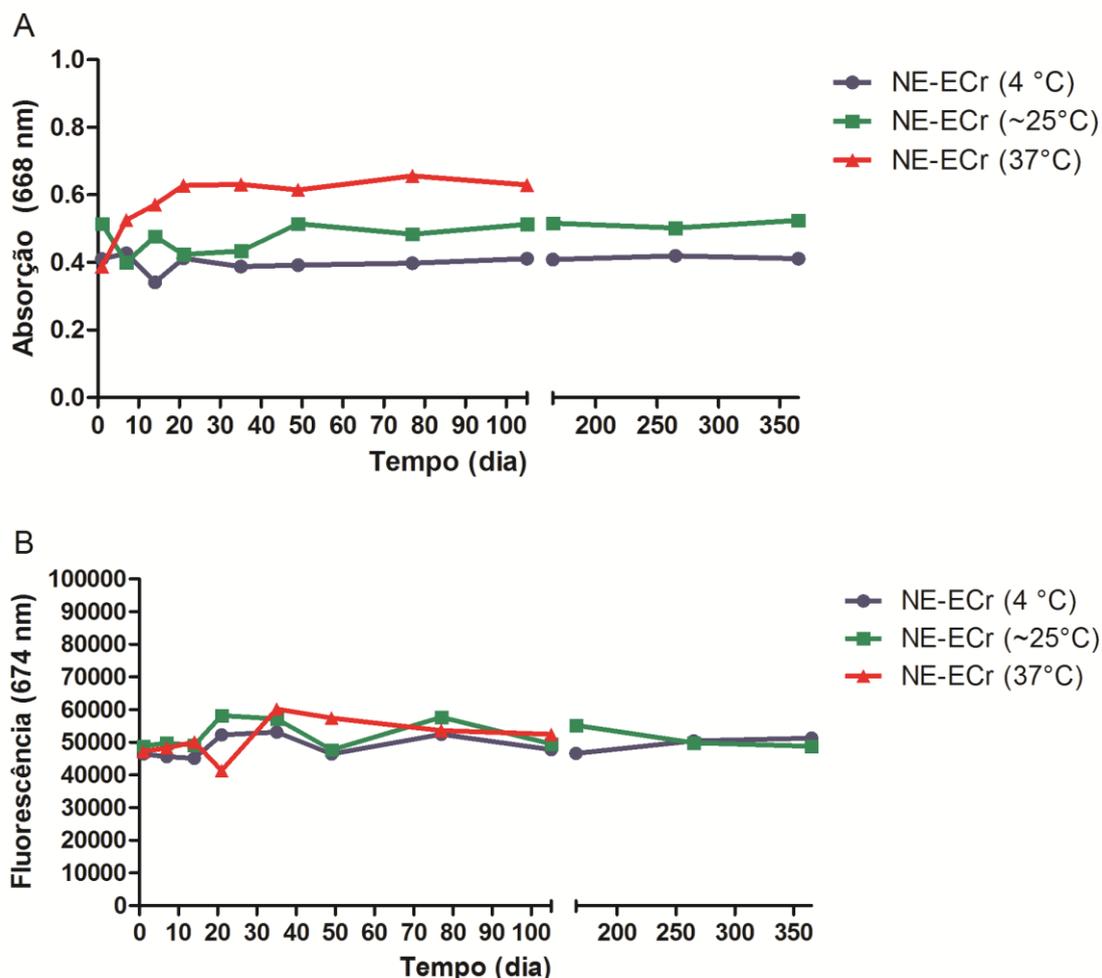


Figura 15: Espectroscopia das NE-ECr. **A** – Intensidade de absorção (668 nm) das nanoemulsões com extrato de cajuru (NE-ECr) ao longo do tempo. **B** – Intensidade de fluorescência em (excitação em 350 nm, emissão em 674 nm). NE-ECr a 4 °C (linha azul); NE-ECr a ~25 °C (linha verde); NE-ECr a 37 °C (linha vermelha). Os dados estão representados como média \pm E. P. M. Eixo Y (unidade arbitária).

5.3.3 Produção de espécies reativas de oxigênio das NE-ECr

O extrato de cajuru em nanoemulsão (NE-ECr) mostrou alta capacidade de geração de espécies reativas (ERO), comprovada pela técnica de decaimento do DBF. Observa-se, na Figura 16, que a produção de ERO é aumentada na medida que a concentração de NE-ECr é aumentada. Todas as concentrações utilizadas apresentaram produção de ERO em relação ao controle utilizado, nanoemulsões sem extrato de cajuru (NE-LECr). Essa produção foi de 100% nas concentrações de 0,00003, 0,00005 e 0,0001

mg/mL, sendo que essa máxima na produção para primeira foi atingida em 70 segundos, e as duas últimas no tempo de 40 segundos, respectivamente.

Concentrações maiores que 0,0001mg/mL de NE-ECr foram testadas, porém a turbidez das amostras interferiu na leitura do decaimento de DBF e, portanto, os resultados foram descartados.

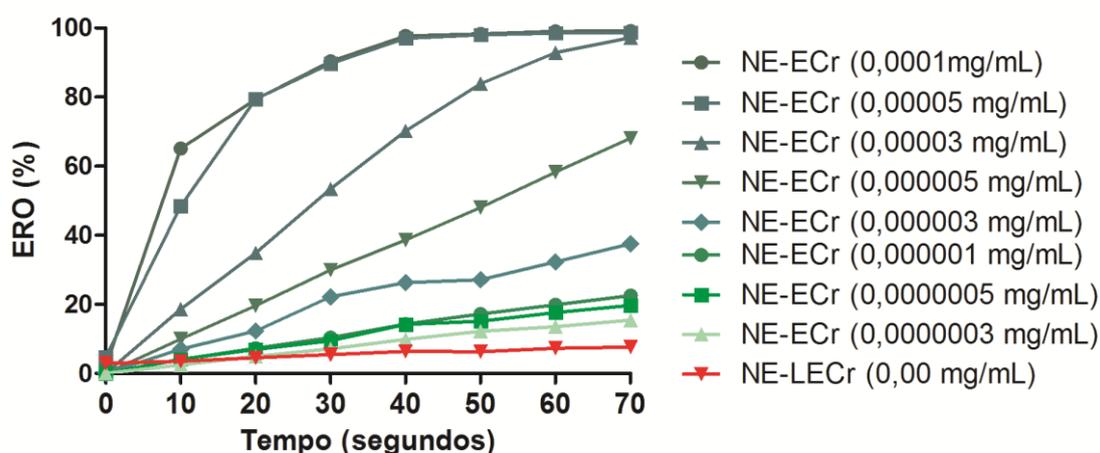


Figura 16: Produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) com diferentes concentrações das nanoformulações de NE-ECr pelo decaimento de DBF. As linhas nos tons de verde representam as diferentes concentrações de NE-ECr utilizadas e a linha em vermelho representam NE-LECr. Os dados estão representados como média \pm E. P. M. para triplicatas. NE-ECr: nanoemulsões com extrato de cajuru, NE-LECr: nanoemulsões sem extrato de cajuru. DBF: 1,3-difenil-isobenzofurano.

5.4 Estabilidade das nanoemulsões com cloreto de alumínio-ftalocianina (NE-AIFtCl)

5.4.1 Determinação da Estabilidade Físicas das NE-AIFtCl

A determinação da estabilidade físicas das NE-AIFtCl acondicionadas em diferentes temperaturas (4 °C, ~25 °C e 37 °C) ao longo do tempo, tendo como parâmetros o diâmetro hidrodinâmico (DH), o índice de polidispersão (IPD) e o potencial zeta (Zt) foram analisados por DLS. Na Figura 17, estão representados os resultados da NE-AIFtCl. Para todos os parâmetros físicos avaliados até 365 dias, não foi observada

variações significativas nas diferentes condições armazenamento. O DH se manteve abaixo de 35 nm ao longo dos 365 dias (Figura 17A).

O IPD das NE-AIFtCl ao longo dos 365 dias se manteve abaixo de 0,2 para todas as temperaturas analisadas, variando entre 0,2 a 0,08 (Figura 17B). O IPD nessas condições representa a monodispersividade das NE-AIFtCl.

O potencial zeta (Z_t) das NE-AIFtCl ao longo dos 365 dias está representado na Figura 17C. Observa-se que em todas as temperaturas analisadas, o potencial zeta se manteve negativo.

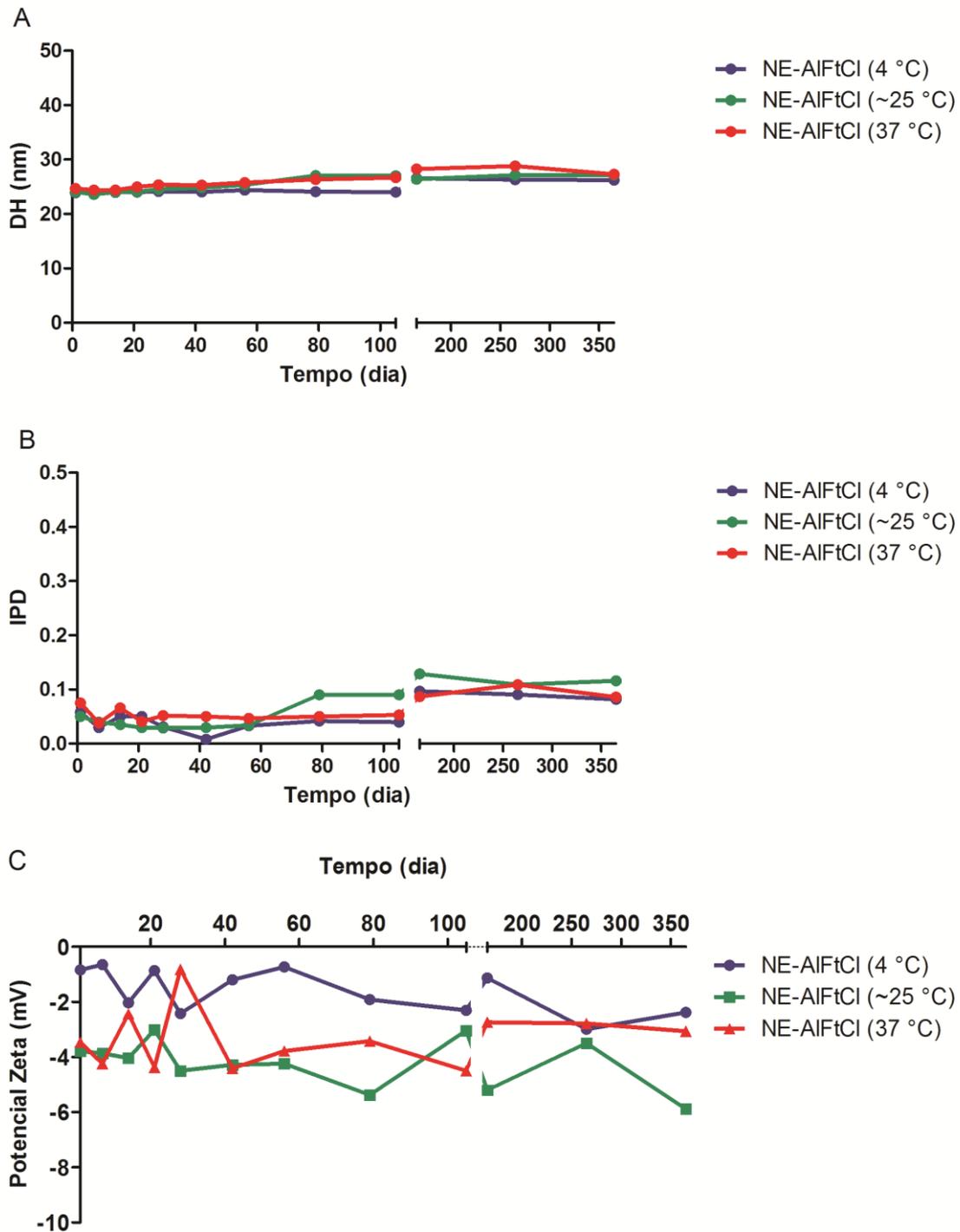


Figura 17: Avaliação da estabilidade físicas por dispersão dinâmica de luz (DLS) das nanoemulsões com cloreto de alumínio-ftalocianina (NE-AIFtCl) armazenadas sob as condições de 4 °C (linha azul), ~25 °C (linha verde) e 37 °C (linha vermelha) ao longo de 365 dias. **A** – Diâmetro Hidrodinâmico (DH). **B** – Índice de Polidispersão (IPD). **C** – Potencial Zeta (Zt). Os dados estão representados como média \pm E. P. M. para triplicatas.

5.4.2 Determinação da Estabilidade fotofísica das NE-AIFtCl

Os resultados apresentados na Figura 18 mostram a estabilidade fotofísica das NE-AIFtCl a partir da manutenção dos picos de absorção e fluorescência das nanoemulsões mantidas a 4 °C, ~25 °C e 37 °C, por 365 dias.

As amostras armazenadas nas diferentes condições de temperaturas apresentaram pico de absorção abaixo de 0,1 e não foi observada diferença significativa entre as condições analisadas (Figura 18A).

O pico de emissão de fluorescência também se manteve estável não apresentando diferenças significativas entre as temperaturas e o tempo de análise (Figura 18B).

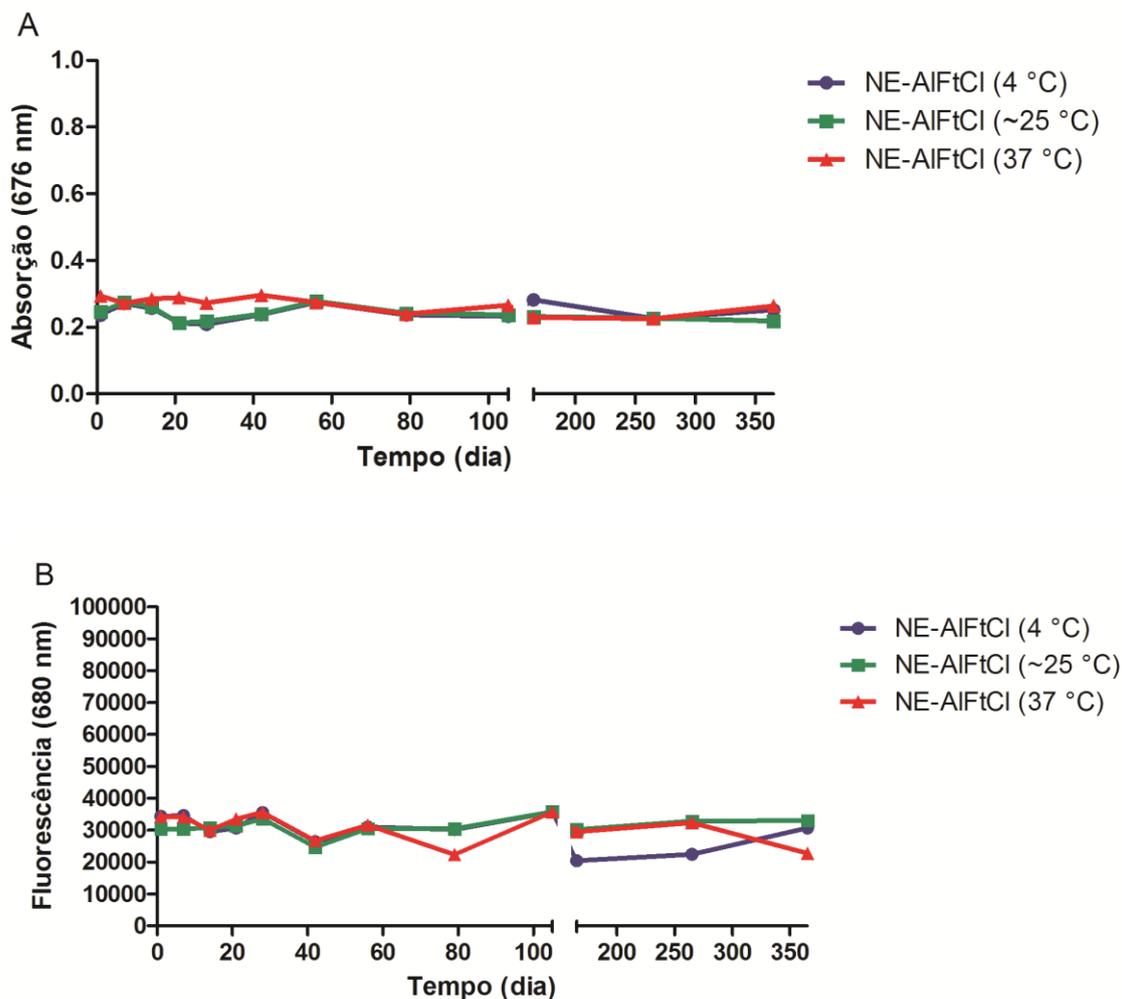


Figura 18: Espectroscopia das NE-AIFtCl **A** – Manutenção do pico de absorção (676 nm) das nanoemulsões com cloreto de alumínio-ftalocianina (NE-AIFtCl) por diferentes tempos. **B** – Manutenção do pico de emissão de fluorescência (excitação em 350 nm, emissão em 680 nm). NE-AIFtCl a 4 °C (linha azul); NE-AIFtCl a ~25 °C (linha verde); NE-AIFtCl a 37 °C (linha vermelha). Os dados estão representados como média \pm E. P. M. Eixo Y (unidade arbitrária).

5.4.3 Produção de Espécies Reativas de Oxigênio pelas NE-AIFtCl

O cloreto de alumínio-ftalocianina em nanoemulsão (NE-AIFtC) apresentou uma excelente capacidade de produzir espécies reativas de oxigênio (ERO). Na Figura 19, estão representadas as diferentes concentrações das NE-AIFtCl para a avaliação da produção de ERO. Para todas as concentrações utilizadas apresentou produção de ERO em relação ao controle utilizado, nanoemulsão sem cloreto de alumínio-ftalocianina (NE-

LAlFtCl). As concentrações de 0,31 a 20 μM apresentaram uma produção de ERO de 100 % no tempo de 80 segundos. Valendo ressaltar que amostra com 20 μM atingiu 100% com apenas 20 segundos.

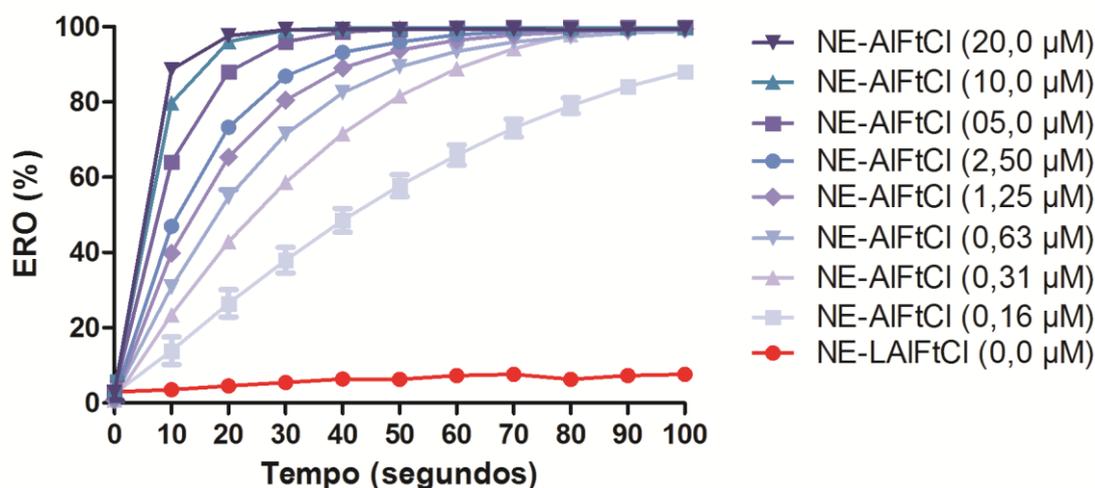


Figura 19: Produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) com diferentes concentrações das nanoformulações de NE-AIFtCl pelo decaimento de DBF. As linhas nos tons de azul representam as diferentes concentrações de NE-AIFtCl utilizadas e a linha em vermelho representa NE-LAIFtCl. Os dados estão representados como média \pm E. P. M. para triplicatas. NE-ECr: nanoemulsões com cloreto de alumínio-ftalocinina, NE-LAIFtCl: nanoemulsões sem cloreto de alumínio-ftalocinina. DBF: 1,3-difenil-isobenzofurano.

5.5 Ensaios de atividade biológicas das NE-ECr e NE-AIFtCl *in vitro*

5.5.1 Efeito do LED na viabilidade das células MCF-10A e MCF-7

Na Figura 20, estão representados os resultados referentes a viabilidade das células MCF-10A e MCF-7 pela exposição de 10 minutos ao LED (fluência de 25,9 j/cm^2). Não foi observada nenhuma diferença significativa na viabilidade celular de ambas as células, tumorais e não tumorais. As células foram incubadas por 24 horas, a viabilidade foi conferida de acordo com item 4.4.4.

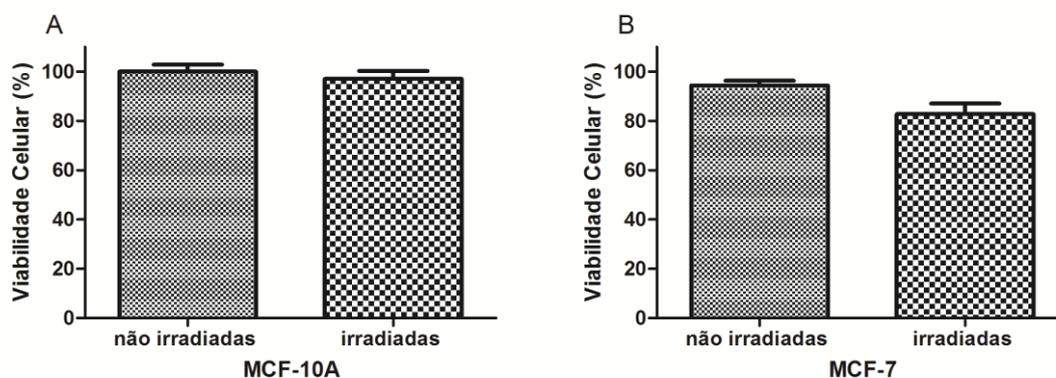


Figura 20: Viabilidade das células MCF-10A (não tumorais) e MCF-7 (tumorais) expostas apenas à luz do diodo emissor de luz com $25,9 \text{ j/cm}^2$ (LED) por 10 minutos, após análise pelo método MTT. **A** – MCF-10A. **B** - Células MCF-7. Os dados estão representados como média \pm E. P. M. Foram utilizadas sete amostras de cada concentração.

5.5.2 Visualização da incorporação intracelular nas células MCF-7 expostas a NE-ECr

Após 15 minutos de exposição a $0,125 \text{ mg/mL}$ de NE-ECr, o fotossensibilizante foi visualizado predominantemente no citoplasma das células MCF-7 (Figura 21). Na Figura 21A, células MCF-7 no campo claro. Figura 21B marcação do núcleo em azul utilizando o corante DAPI. Na Figura 21C, dispersão da molécula fotossensibilizante do ECr com coloração em vermelho no citoplasma celular. A Figura 21D representa a sobreposição das imagens anteriores.

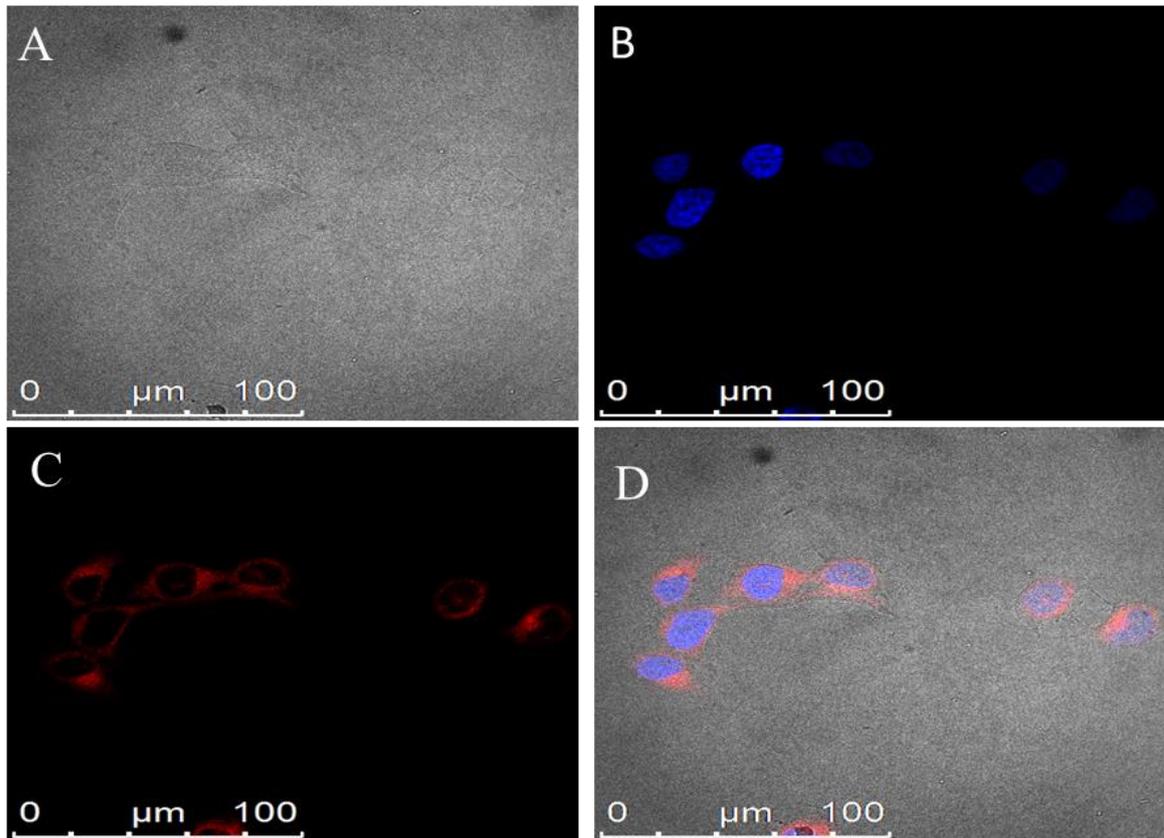


Figura 21: Visualização por microscopia confocal da incorporação intracelular pelas células MCF-7 expostas por 15 minutos a 0,125 mg/mL de NE-LECr. **A** – campo claro. **B** – marcação nuclear com DAPI. **C** – representação em vermelho da molécula fotossensibilizante no citoplasma. **D** – sobreposição das imagens A, B e C. NE-LECr: nanoemulsões com extrato de cajuru.

5.5.3 Efeito das NE-LECr e do LED na viabilidade das células MCF-10A e MCF-7

Na Figura 22A, são representados os resultados obtidos da viabilidade celular, pelo método MTT, de MCF-10A e MCF-7 expostas a diferentes concentrações das nanoemulsões sem extrato de cajuru (NE-LECr). As células MCF-10A não apresentaram morte celular significativa nas concentrações das NE-LECr testadas, não havendo diferenças nas condições não irradiadas e irradiadas (Figura 22A).

Para células MCF-7 também não foram observadas diferenças significativas na viabilidade celular nas concentrações de NE-LECr testadas, em ambas as condições do experimento, ou seja, com ou sem irradiação (Figura 22B).

Esses resultados mostraram que as NE-LECr, contendo somente tensoativo Kolliphor® e o óleo Tricilglicerois caprico/caprílico, não apresentaram citotoxicidade para as células MCF-10A e MCF-7.

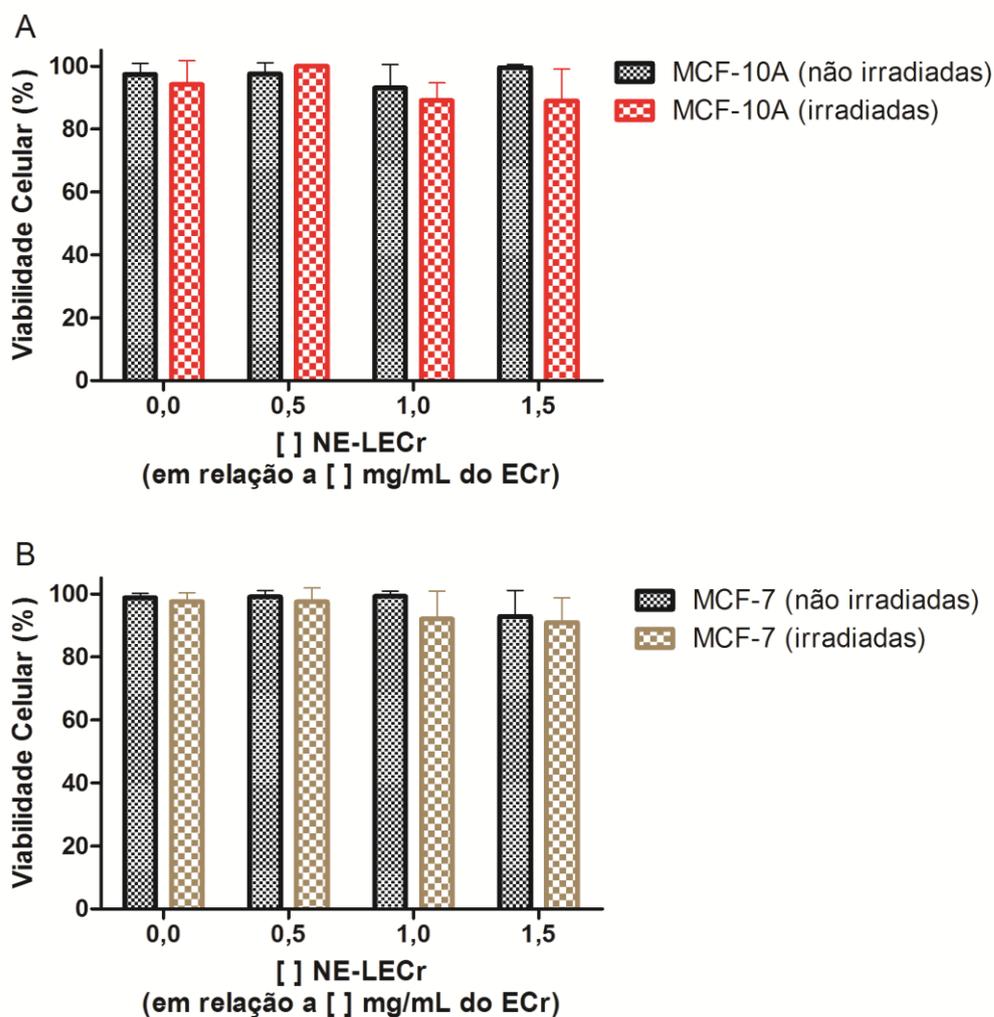


Figura 22: Viabilidade das células MCF-10A e MCF-7 expostas por 15 minutos a diferentes concentrações das NE-LECr, pelo método MTT. Células irradiadas com LED, fluência de 25,9 cm². **A** – Células MCF-10A, as barras pretas representam as células não irradiadas; as barras vermelhas representam as células irradiadas. **B** – Células MCF-7, as barras pretas representam as células não irradiadas; as barras marrons representam as células irradiadas. [] significa concentração. Os dados estão representados como média ± E. P. M. Foram utilizadas sete amostras de cada concentração.

5.5.4 Efeito da TFD mediada pelas NE-ECr na viabilidade das células MCF-10A e MCF-7

Na Figura 23, estão representados os resultados da citotoxicidade, após 24 horas, causada pela terapia fotodinâmica (TFD) nas células MCF-10A e MCF-7, mediada por diferentes concentrações das NE-ECr. A eficiência da TFD foi avaliada por meio dos valores de concentração citotóxica 50% e 100%, CC_{50} e CC_{100} , respectivamente.

Assim, uma CC_{50} de 0,0048 mg/mL e uma CC_{100} de 0,020 mg/mL foram obtidas para MCF-10A. Não foi observada morte celular significativa nas células sem irradiação, ou seja, mantidas no escuro (Figura 23A). Os valores de CC_{50} e CC_{100} encontrados para as células MCF-7 após a TFD foram de 0,0013 mg/mL e de 0,007 mg/mL, respectivamente. Da mesma forma, não foi observada morte celular significativa nas células mantidas no escuro (Figura 23B).

A CC_{50} de NE-Ecr para MCF-10A foi aproximadamente quatro vezes maior que para células MCF-7 e a CC_{100} foi aproximadamente três vezes maior. Esses resultados mostram que baixas concentrações de NE-ECr já são eficientes na terapia fotodinâmica contra as células tumorais.

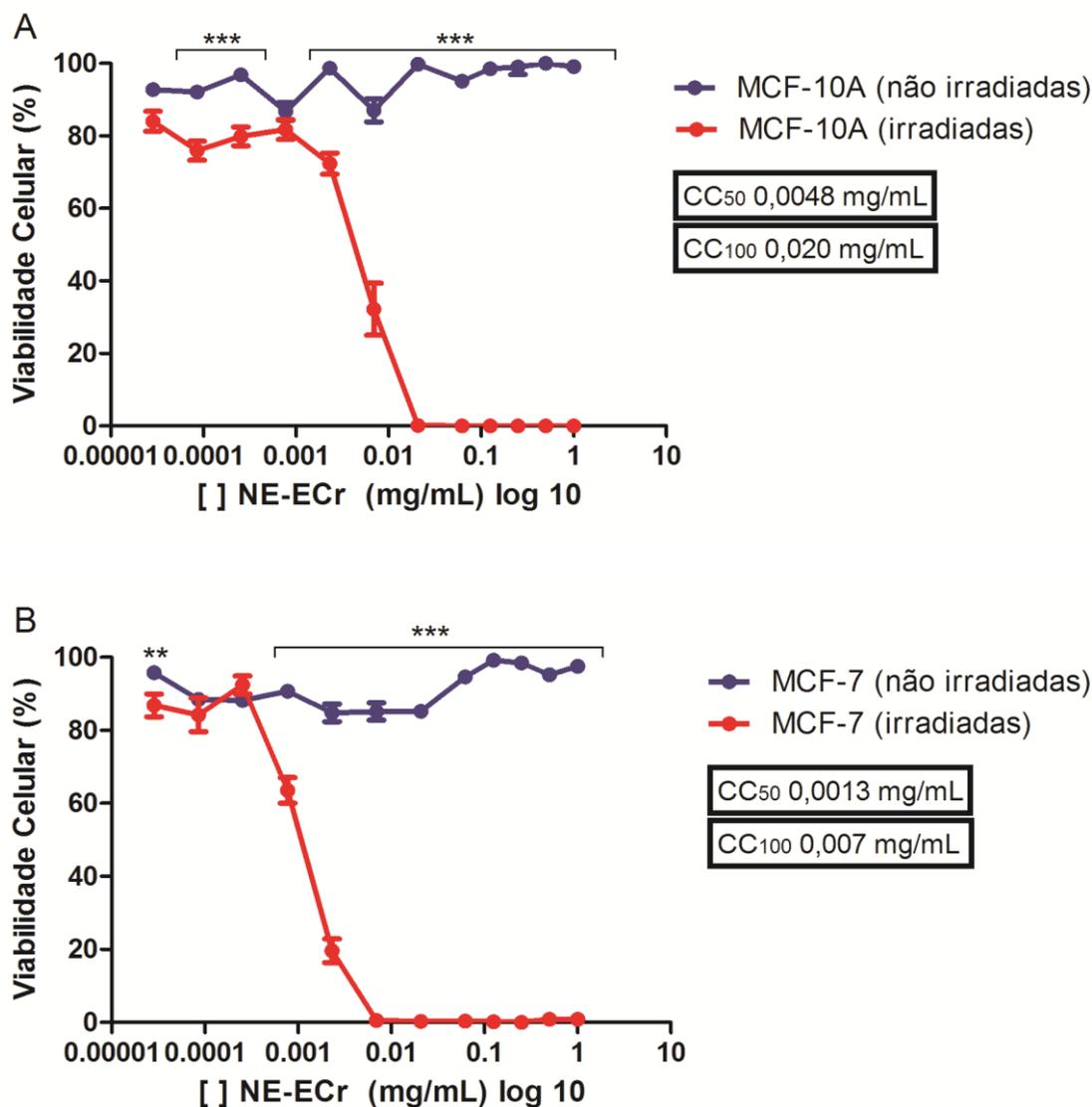


Figura 23: Viabilidade celular de MCF-10A e MCF-7 após 24 horas da TFD mediada pelas diferentes concentrações da NE-ECr. Células irradiadas com LED, fluência de 25,9 cm². **A** – Células MCF-10A expostas a diferentes concentrações da NE-ECr (CC₅₀=0,0048 mg/mL e CC₁₀₀=0,020 mg/mL), a linha azul representa células não irradiadas, a linha vermelha representa células irradiadas. **B** – Células MCF-7 expostas a diferentes concentrações da NE-ECr (CC₅₀=0,0013 mg/mL e CC₁₀₀=0,007 mg/mL), a linha azul representa células não irradiadas, a linha vermelha representa células irradiadas. TFD: terapia fotodinâmica; NE-ECr; nanoemulsões com extrato de cajuru. Os eixos Y representam os controles. Valores de X em Log 10. Os dados estão representados como média ± E. P. M. para análise de sete amostras. ** significa p<0,01 e *** p<0,001.

5.5.5 Viabilidade das células MCF-10A e MCF-7 após diferentes tempos da aplicação da TFD mediada pela NE-ECr

Na Figura 24, estão representados os resultados obtidos para a viabilidade celular de MCF-10A e MCF-7 após 24, 48 e 72 horas da aplicação da TFD mediada pelas NE-ECr utilizando as CC_{50} (0,0013 mg/mL) e CC_{100} (0,007 mg/mL) de ECr sobre as células alvo deste estudo, as MCF-7, conforme obtidas no item 5.6.4. A viabilidade celular foi determinada pelo método MTT e apresentada em relação ao controle, ou seja, as células não irradiadas.

Após 24 horas da aplicação da TFD mediada pelas NE-ECr não foi observada diferença significativa na viabilidade das células MCF-10A quando expostas a CC_{50} , porém quando expostas à CC_{100} foi observado que 24,94% ($p < 0,001$) das células se mantinham viáveis (Figura 24A). Já a viabilidade das células MCF-7 foi de 79,48% quando expostas a CC_{50} e houve 100% de morte na exposição a CC_{100} (Figura 24B).

Após 48 horas da aplicação da TFD, não foi observada mudança significativa na viabilidade das células MCF-10A expostas a CC_{50} , tendo a viabilidade se mantida similar à encontrada após 24 horas. No entanto, quando expostas a CC_{100} a viabilidade destas células foi de 41,24% ($p < 0,001$) (Figura 24C). No entanto, quando este valor é comparado com o encontrado após 24 horas da TFD, observa-se um aumento de 16,3% na viabilidade celular, indicando maior sobrevivência destas células. As células MCF-7, quando expostas a CC_{50} , apresentaram uma viabilidade de 75,7% ($p < 0,001$), o que foi 3,78% menor que a encontrada após 24 horas da TFD. Já quando estas células foram expostas a CC_{100} 1,04% das células eram viáveis ($p < 0,001$). No entanto, essa ligeira recuperação destas células quando comparado com o valor encontrado em 24 horas não é significativo (Figura 24D).

Após 72 horas da aplicação da TFD, diferentemente do observado após 24 e 48 horas, as células MCF-10A expostas a CC_{50} tiveram uma redução de 9,92% ($p < 0,001$) em sua viabilidade. Já quando expostas à CC_{100} , 56,94% ($p < 0,001$) das células ainda se mostravam viáveis. Houve uma clara recuperação de 32% destas células após 72 horas da TFD, quando comparado ao valor encontrado em 24 horas (Figura 24E). As células MCF-7 tiveram uma viabilidade de 86,63% ($p < 0,01$) quando expostas a CC_{50} , valor que 7,15% maior ao encontrado após 24 horas da aplicação da TFD. Na exposição a CC_{100} , 3,15% das células eram viáveis ($p < 0,001$) (Figura 24F). Da mesma forma, este aumento na viabilidade celular quando comparado à encontrada após 24 horas, não é significativo.

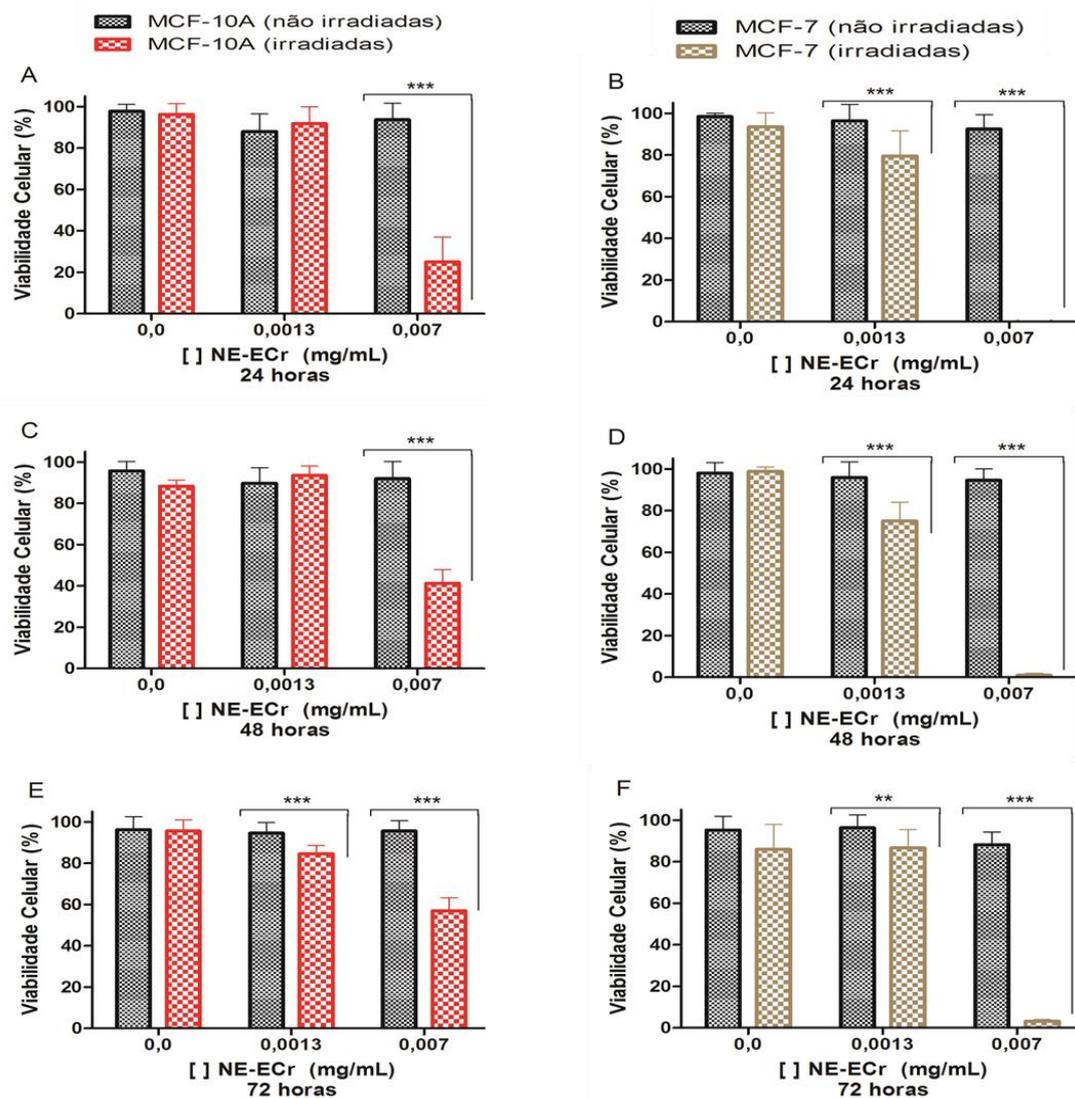


Figura 24: Viabilidade das células MCF-10A e MCF-7 após diferentes tempos da aplicação da TFD mediada por 0,0013 mg/mL (CC_{50}) e 0,007 mg/mL (CC_{100}) das NE-ECr, avaliada pelo método MTT. Células irradiadas com LED, fluência de $25,9 \text{ cm}^2$. **A, C e E** – Células MCF-10A analisadas 24(A), 48(C) e 72(E) horas após a TFD, barras pretas representam as células não irradiadas; as barras vermelhas representam células irradiadas. **B, D e F** – Células MCF-7 analisadas 24(B), 48(D) e 72(F) horas após a TFD, barras pretas representam as células não irradiadas; as barras marrons representam células irradiadas. TFD: terapia fotodinâmica; NE-ECr; nanoemulsões com extrato de cajuru. CC: concentração citotóxica. Os dados estão representados como média \pm E. P. M. para análise de sete amostras. [] significa concentração. ** significa $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

5.5.6 Visualização da incorporação intracelular nas células MCF-7 expostas a NE-AlFtCl

Após 15 minutos de exposição a 0,125 μM de NE-AlFtCl, o fotossensibilizante foi visualizado exclusivamente no citoplasma das células MCF-7 (Figura 15). Na Figura 25A, células MCF-7 no campo claro. Figura 25B marcação do núcleo em azul utilizando o corante DAPI. Na Figura 25C, dispersão da molécula fotossensibilizante do AlFtCl com coloração em vermelho no citoplasma celular. A Figura 25D representa a sobreposição das imagens anteriores.

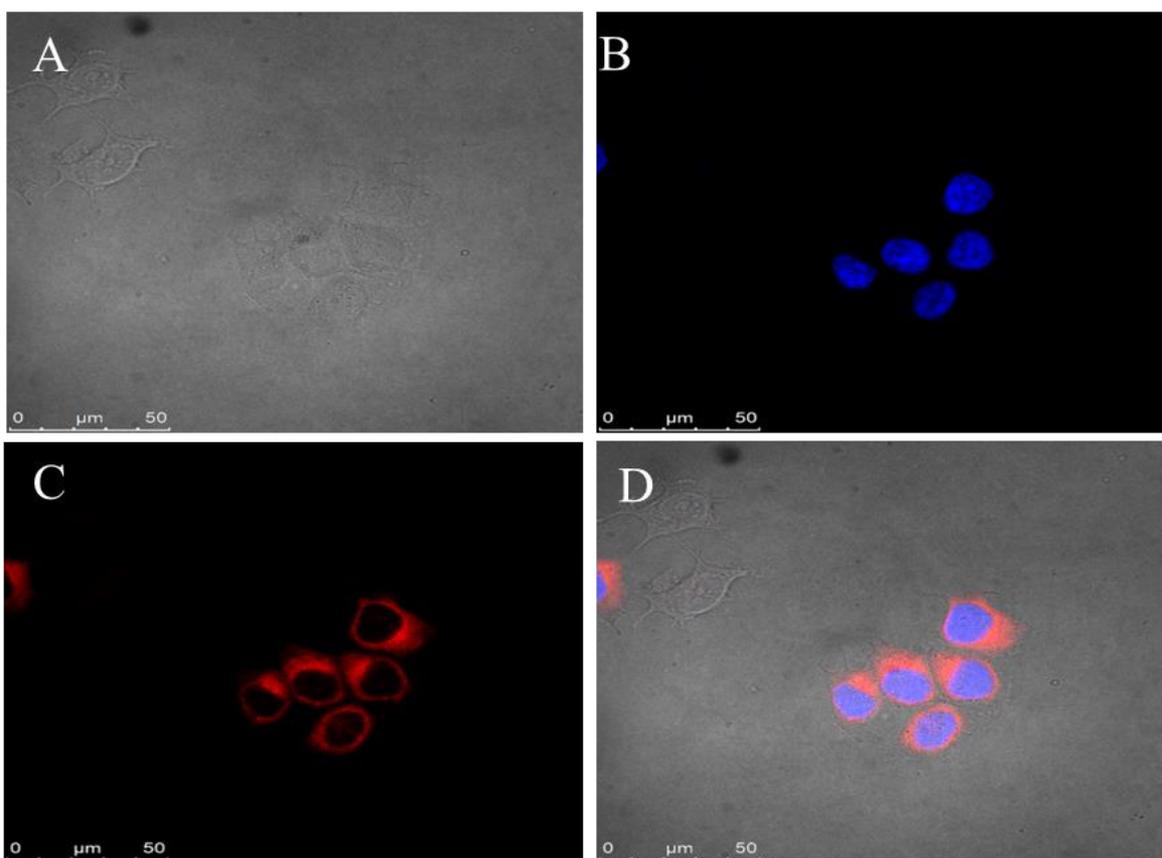


Figura 25: Visualização por microscopia confocal da incorporação intracelular pelas células MCF-7 expostas por 15 minutos a 0,125 μM de NE-AlFtCl. **A** – campo claro. **B** – marcação nuclear em azul com DAPI. **C** – representação em vermelho da molécula fotossensibilizante no citoplasma. **D** – sobreposição das imagens A, B e C. NE-AlFtCl: nanoemulsões com cloreto de alumínio-ftalocianina.

5.5.7 Efeito das NE-LAIFtCl e do LED na viabilidade das células MCF-10A e MCF-7

Na Figura 26, são representados os resultados obtidos da viabilidade celular, pelo método MTT, de MCF-10A e MCF-7 expostas a diferentes concentrações das nanoemulsões sem cloreto de alumínio-ftalocianina (NE-LAIFtCl). Não foi observada morte celular significativa tanto de MCF-10A quanto MCF-7 quando expostas a diferentes concentrações de NE-LAIFtCl, comparada com o controle não irradiado.

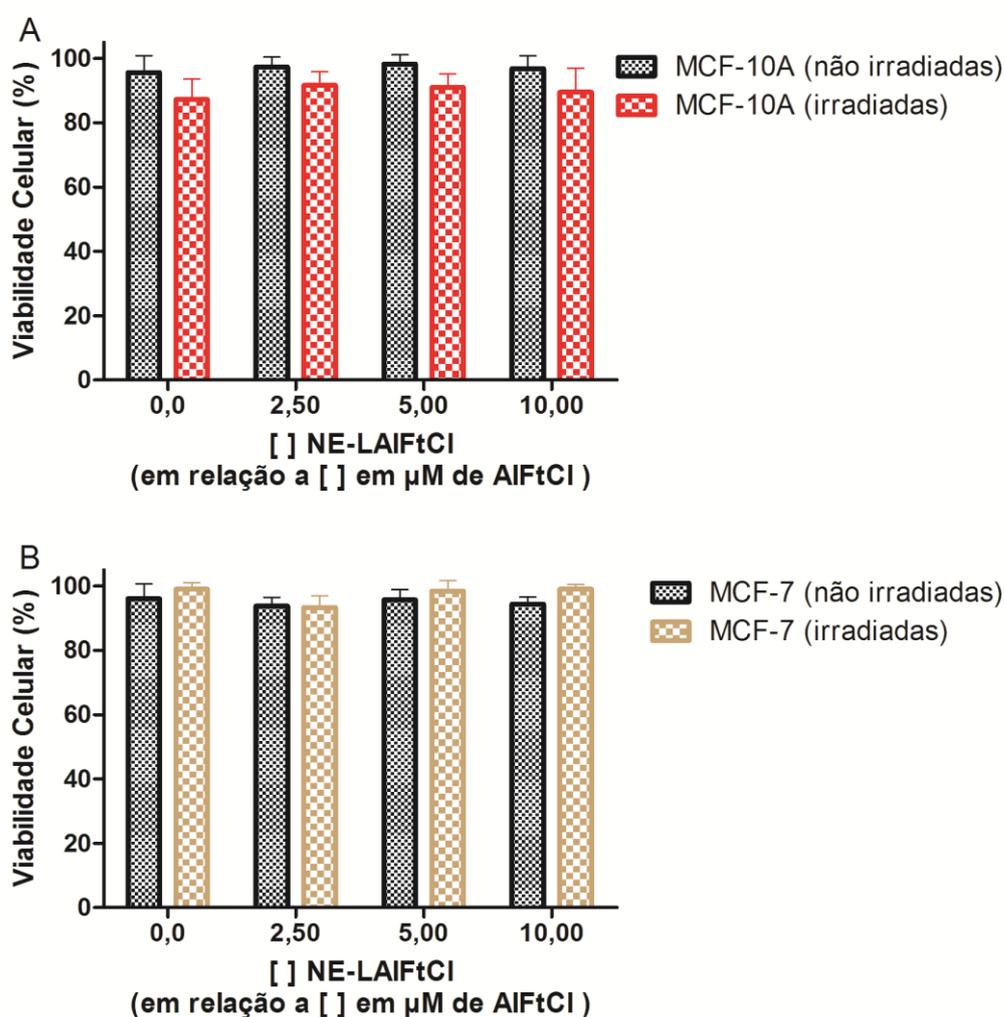


Figura 26: Viabilidade das células MCF-10A e MCF-7 expostas por 15 minutos a diferentes concentrações da NE-LAIFtCl pelo método MTT. Células irradiadas com LED, fluência de $25,9 \text{ cm}^2$. **A** – Células MCF-10A, as barras pretas representam as células não irradiadas; as barras vermelhas representam as células irradiadas. **B** – Células MCF-7, as barras pretas representam as células não irradiadas; as barras marrons representam as

células irradiadas. [] significa concentração. Os dados estão representados como média \pm E. P. M. Foram utilizadas sete amostras de cada concentração.

5.5.8 Efeito da TFD mediada pelo AlFtCl-livre na viabilidade das células MCF-10A e MCF-7

O efeito da aplicação da TFD mediada por diferentes concentrações de cloreto de alumínio-ftalocianina livre (AlFtCl) na viabilidade das células MCF-10A e MCF-7, após 24 horas, está apresentado na Figura 27. Observa-se que a viabilidade das células MCF-10A (Figura 27A) e MCF-7 (Figura 27B) não foram alteradas com a TFD mediada por diferentes concentrações de AlFtCl-livre, quando comparadas células irradiadas e não irradiadas. No entanto, nestes experimentos a viabilidade celular de MCF-10A, quando expostas apenas ao LED (controle), teve uma redução estatisticamente significativa ($p < 0,01$) de 5,64%; podendo este resultado não ter um significado biológico real, devido ao seu baixo valor.

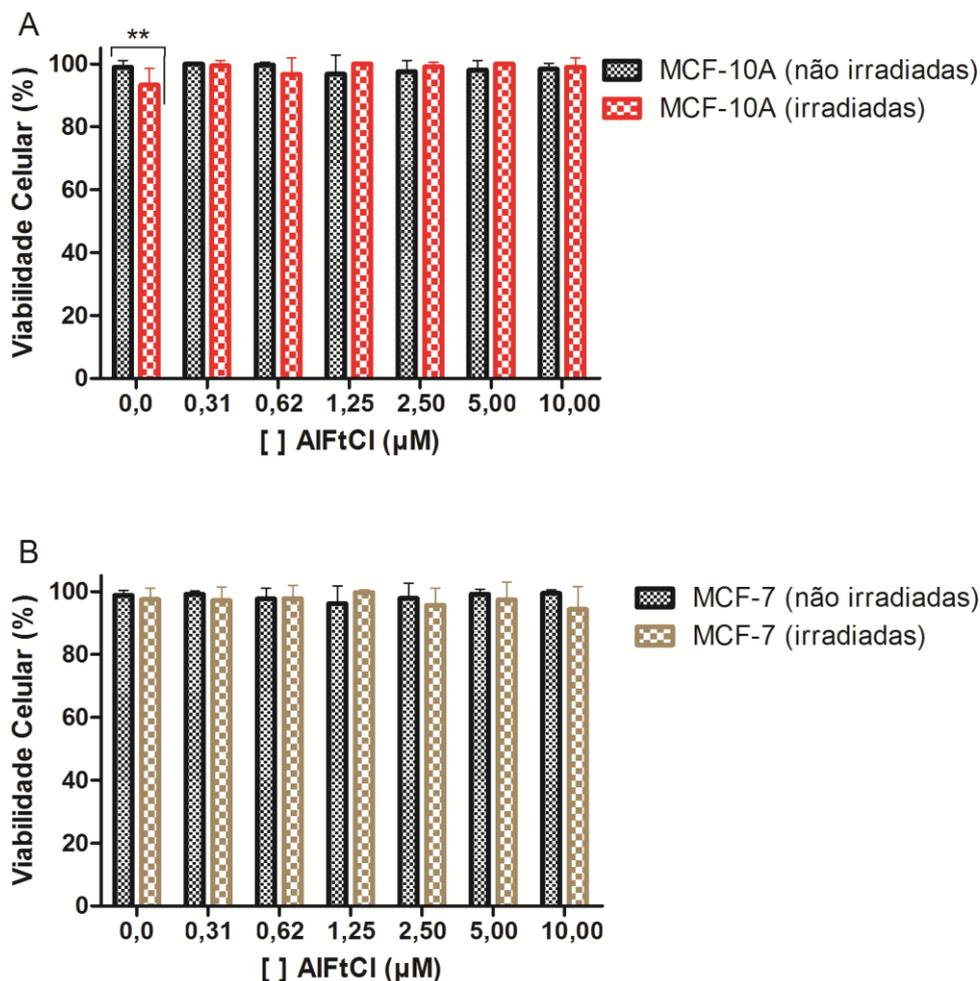


Figura 27: Viabilidade das células MCF-10A e MCF-7 expostas por 15 minutos a diferentes concentrações de AlFtCl, pelo método MTT. Células irradiadas com LED, fluência de 25,9 cm². **A** – Células MCF-10A, as barras pretas representam as células não irradiadas; as barras vermelhas representam as células irradiadas. **B** – Células MCF-7, as barras pretas representam as células não irradiadas; as barras marrons representam as células irradiadas. AlFtCl: cloreto de alumínio-ftalocianina. [] significa concentração. Os dados estão representados como média ± E. P. M.

5.5.9 Efeito da TFD mediada pela NE-AlFtCl na viabilidade das células MCF-10A e

MCF-7

Na Figura 28, estão representados os resultados da citotoxicidade, após 24 horas, causada pela terapia fotodinâmica (TFD) nas células MCF-10A e MCF-7, mediada por diferentes concentrações das NE-AlFtCl. Uma CC₅₀ de 0,0058 μM e uma CC₁₀₀ de

0,625 μM de NE-AIFtCl foram obtidas para MCF-10A. Não foi observada morte celular significativa nas células sem irradiação, ou seja, mantidas no escuro (Figura 28A). Os valores de CC_{50} e CC_{100} de NE-AIFtCl encontrados para as células MCF-7 após a TFD foram de 0,0028 μM e de 0,093 μM , respectivamente. Da mesma forma, não foi observada morte celular significativa nas células mantidas no escuro (Figura 28B).

A CC_{50} de NE-AIFtCl para MCF-10A foi aproximadamente duas vezes maior que para células MCF-7 e a CC_{100} foi aproximadamente sete vezes maior. Esses resultados mostram que baixas concentrações de NE-AIFtCl já são eficientes na terapia fotodinâmica contra as células tumorais.

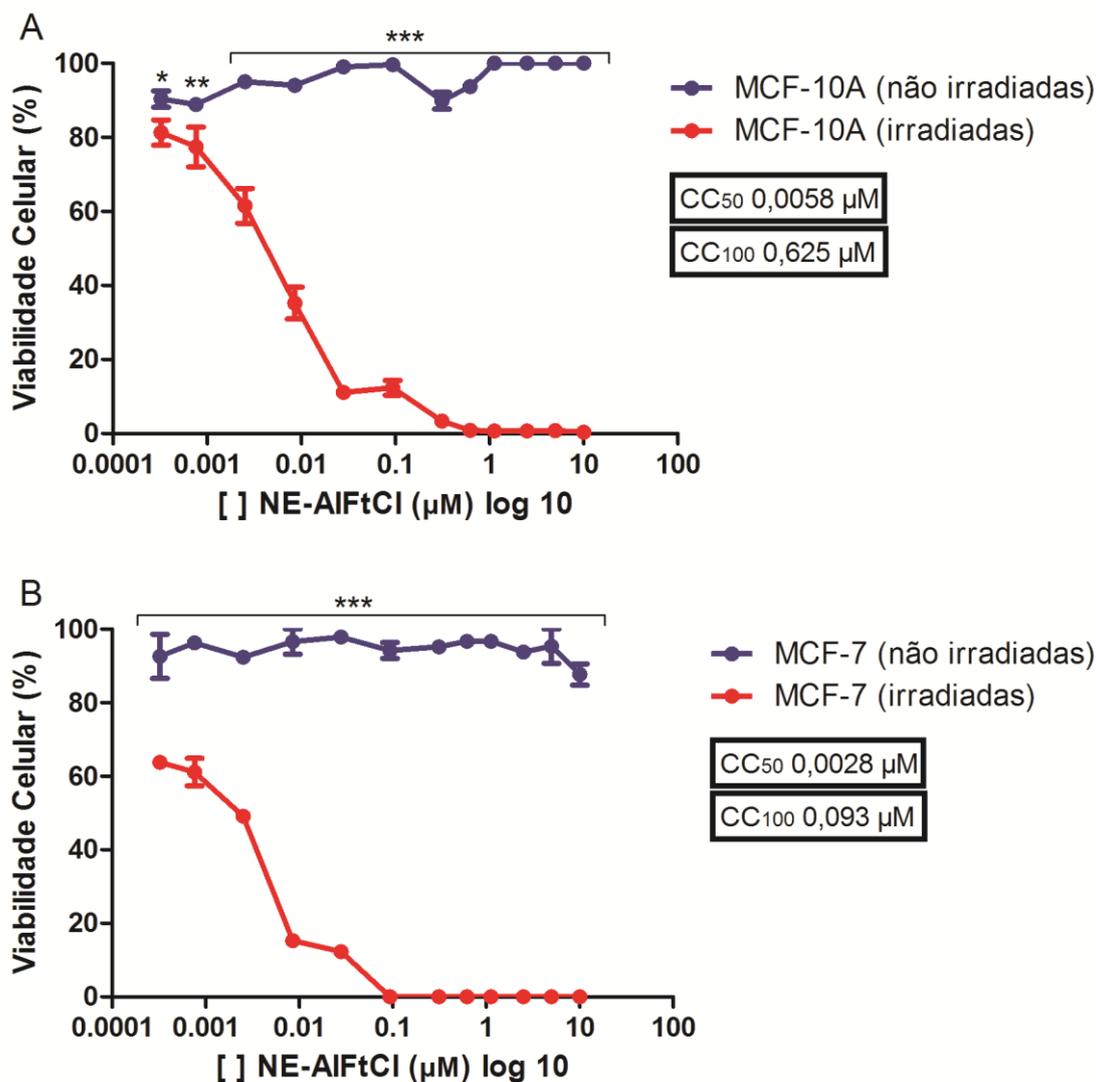


Figura 28: Viabilidade celular de MCF-10A e MCF-7 após 24 horas da TFD mediada por diferentes concentrações das NE-AIFtCl. Células irradiadas com LED, fluência de $25,9 \text{ cm}^2$. **A** – Células MCF-10A expostas a diferentes concentrações da NE-AIFtCl ($\text{CC}_{50}=0,0058 \mu\text{M}$ e $\text{CC}_{100}=0,625 \mu\text{M}$), a linha azul representa células não irradiadas, a linha vermelha representa células irradiadas. **B** – Células MCF-7 expostas a diferentes concentrações da NE-AIFtCl ($\text{CC}_{50}=0,0028 \mu\text{M}$ e $\text{CC}_{100}=0,093 \mu\text{M}$), a linha azul representa células não irradiadas, a linha vermelha representa células irradiadas. TFD: terapia fotodinâmica; NE-AIFtCl: nanoemulsões com cloreto de alumínio-ftalocianina. Os eixos Y representam os controles. Valores de X em Log 10. Os dados estão representados como média \pm E. P. M. para análise de sete amostras. ** significa $p<0,01$ e *** $p<0,001$.

5.5.10 Viabilidade das células MCF-10A e MCF-7 após diferentes tempos da aplicação da TFD mediada pela NE-AIFtCl

Na Figura 29, estão representados os resultados obtidos para a viabilidade celular de MCF-10A e MCF-7 após 24, 48 e 72 horas da aplicação da TFD mediada pelas NE-AIFtCl utilizando as CC_{50} (0,0028 μ M) e CC_{100} (0,093 μ M) de AIFtCl sobre as células alvo deste estudo, as MCF-7. A viabilidade celular foi determinada pelo método MTT e apresentada em relação ao controle, ou seja, às células não irradiadas.

Após 24 horas da aplicação da TFD mediada pelas NE-AIFtCl a viabilidade das células MCF-10A foi de 55,24% ($p < 0,001$) quando expostas a CC_{50} , porém quando expostas a CC_{100} foi observado que apenas 18,59% ($p < 0,001$) das células se mantinham viáveis (Figura 29A). Já a viabilidade das células MCF-7 foi de 61,04% quando expostas a CC_{50} e essa viabilidade caiu para 1,97% na exposição a CC_{100} (Figura 29B).

Após 48 horas da aplicação da TFD, as células MCF-10A quando não expostas às nanoemulsões, porém irradiadas pelo LED, apresentaram 10,71% ($p < 0,05$) de morte em relação ao seu controle, o que não havia sido observado após 24 horas. A viabilidade celular na exposição à CC_{50} foi de 55,53% ($p < 0,001$), valor muito similar ao encontrado após 24 horas da aplicação da TFD. Na exposição à CC_{100} foi observada uma viabilidade de 22,24% ($p < 0,001$) das células, uma diferença de 3,65% em relação ao valor encontrado após 24 horas (Figura 29C). As células MCF-7 também tiveram a sua viabilidade alterada após 48 horas da exposição apenas ao LED, apresentando 73,51% ($p < 0,05$) de células viáveis, diferentemente dos 88,87% de células viáveis após 24 horas. Houve ainda uma diminuição na viabilidade destas células quando expostas a CC_{50} , tendo sido de apenas 43,19% ($p < 0,001$), uma queda de 17,85% na viabilidade comparada com a encontrada após 24 horas da TFD. No entanto, após 48 horas as células MCF-7 tiveram

uma pequena recuperação na sua viabilidade quando expostas a CC_{100} , que foi de 2,86% ($p < 0,001$), quando comparado ao valor encontrado após 24 horas (Figura 29D).

Após 72 horas da aplicação da TFD, as células MCF-10A quando não expostas às nanoemulsões, porém irradiadas pelo LED, apresentaram morte celular de 12,86% ($p < 0,05$) em relação ao seu controle, o que não havia sido observado após 24 horas. A viabilidade destas células caiu para 35,31% ($p < 0,001$) na exposição à CC_{50} , uma diferença de 19,93% em relação à viabilidade celular encontrada após 24 horas da aplicação da TFD. A redução na viabilidade é ainda maior quando as células foram expostas à CC_{100} , tendo sido de apenas 4,06% ($p < 0,001$), uma diferença de 14,53% na viabilidade destas células, comparado ao valor observado após 24 horas (Figura 29E). Não houve diferença significativa na viabilidade das células MCF-7 após 72 horas da exposição apenas ao LED, inclusive em relação ao valor encontrado após 24 horas. A viabilidade destas células quando expostas à CC_{50} foi de 41,93% ($p < 0,001$), permanecendo muito próximo à viabilidade encontrada após 48 horas e, portanto, mantendo uma queda de 19,6% na viabilidade comparada com a encontrada após 24 horas da TFD. No entanto, após 72 horas somente 1,78% ($p < 0,001$) das células MCF-7 eram viáveis, valor similar encontrado na viabilidade celular após 24 horas (Figura 29F).

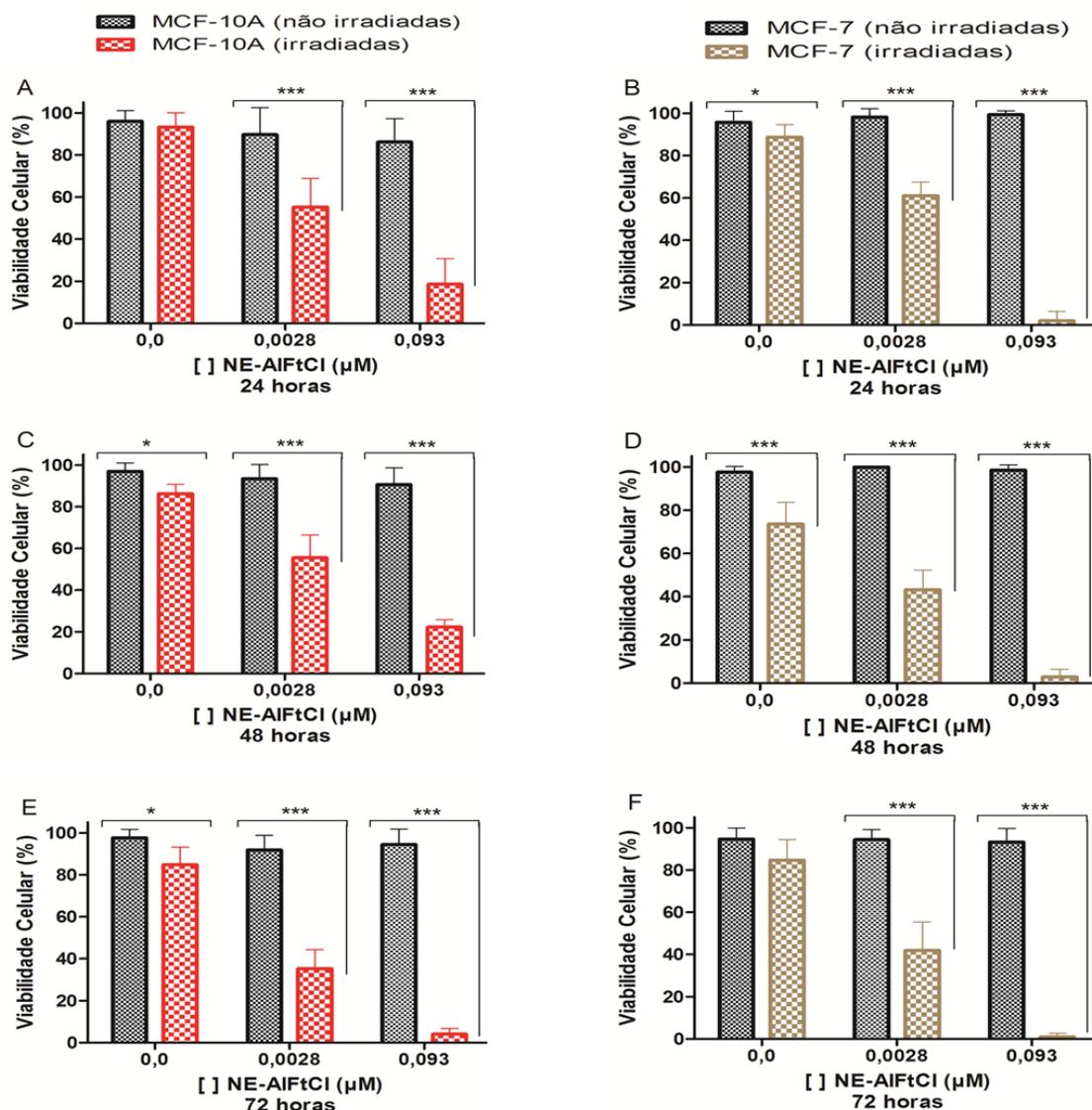


Figura 29: Viabilidade das células MCF-10A e MCF-7 após diferentes tempos da aplicação da TFD mediada por 0,0028 μM (CC_{50}) e 0,0093 μM (CC_{100}) das NE-AIFtCl, avaliada pelo método MTT. Células irradiadas com LED, fluência de 25,9 cm^2 . **A, C e E** – Células MCF-10A analisadas 24(A), 48(C) e 72(E) horas após a TFD, barras pretas representam as células não irradiadas; as barras vermelhas representam as células irradiadas. **B, D e F** – Células MCF-7 analisadas 24(B), 48(D) e 72(F) horas após a TFD, barras pretas representam as células não irradiadas; as barras marrons representam as células irradiadas. TFD: terapia fotodinâmica; NE-AIFtCl: cloreto de alumínio-ftalocianina. CC: concentração citotóxica. Os dados estão representados como média \pm E. P. M. para análise de sete amostras. [] significa concentração. * significa $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

5.5.11 Obtenção dos esferoides com as células MCF-7

Utilizando o método descrito por Perche e Torchilin (2010) com adaptações, foram obtidos esferoides com tamanhos entre 200-250 μm a partir de $1,5 \times 10^4$ células/poço de MCF-7. Na Figura 30, estão apresentadas as imagens da obtenção dos esferoides partindo do cultivo em monocamada (2D) até a obtenção do esferoide (maduro) no cultivo tridimensional (3D). Observa-se um aspecto irregular da superfície do esferoide logo após a centrifugação das células semeadas na placa (Figura 30B). Com 24 horas, a superfície do esferoide já se torna mais regular, porém o formato circular do esferoide ainda não foi estabelecido (Figura 30C). Após 48 horas (Figura 30D), o esferoide com aspecto mais denso, já adquire a forma circular e a superfície se torna regular. Este formato se mantém durante os dias seguintes e a partir do 4º dia observa-se a formação de uma membrana externa (Figura 30F), que se torna mais evidente no esferoide considerado já maduro, ao 6º dia (Figura 30H).

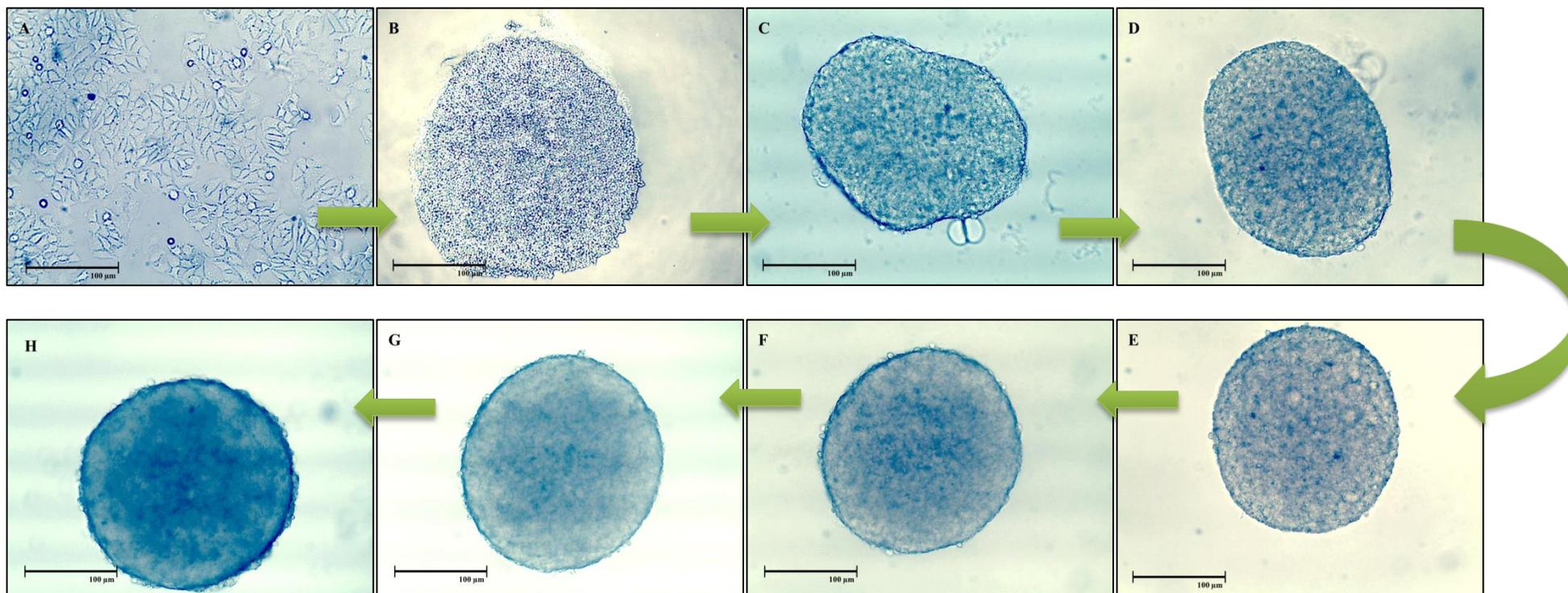


Figura 30: Esferoides de células MCF-7 obtidos a partir de $1,5 \times 10^4$ células/poço. As setas verdes indicam a sequência ao longo do tempo. **A** – imagem do cultivo de MCF-7 em monocamada. **B** – aglomerado das células MCF-7 em 3D após centrifugação da placa. **C** – primeiro dia (24 horas) de cultivo. **D** – segundo dia (48 horas) de cultivo, esferoide com aspecto mais denso. **E** – terceiro dia de cultivo, aparência mais arredondada. **F** – quarto dia de cultivo, com o aparecimento da membrana de proteção. **G** e **H** – maturação do esferoide no quinto e sexto dia, respectivamente. As imagens foram adquiridas utilizando a câmera digital Motcam 2300 3.0 MP live resolution acoplado em microscópio invertido. Método de obtenção: Perche e Torchilin (2010) com adaptações.

5.5.12 Efeito citotóxico nos esferoides de células MCF-7 após 24 horas de aplicação da TFD mediada pelas NE-ECr

Os resultados obtidos do efeito citotóxico nos esferoides de células MCF-7, após 24 horas da aplicação da TFD quando as células foram expostas por 30 e 60 minutos a diferentes concentrações das NE-ECr, estão apresentados na Figura 31. O efeito citotóxico foi determinado a partir da liberação da enzima lactato desidrogenase, utilizando o kit CytoTox 96[®] (Invitrogen). Quanto maior for a porcentagem de LDH encontrada no meio, maior é o efeito citotóxico sobre o esferoide.

Assim, os esferoides quando expostos, tanto por 30 (Figura 31A) quanto por 60 minutos (Figura 31B), a diferentes concentrações das NE-ECr, porém não irradiados com o LED, não apresentaram liberação de LDH significativa quando comparados àqueles que não tiveram contato com as NE-ECr e não foram submetidos à irradiação. O mesmo se deu com os esferoides não expostos as NE-ECr, porém irradiadas com o LED.

Entretanto, quando os esferoides foram expostos por 30 minutos a 0,06, 0,11 e 0,23 mg/mL de NE-ECr e irradiados com o LED, a porcentagem de liberação de LDH foi de 30,67, 56,23 e 75,89%, respectivamente. Valores muito maiores do que aqueles encontrados para os esferoides expostos a mesma condição porém não irradiados com o LED, a saber: 6,51, 8,65 e 12,9%, respectivamente. Observa-se claramente que há um maior efeito citotóxico quando os esferoides são expostos a concentrações maiores de NE-ECr (Figura 31A). O efeito citotóxico sobre os esferoides expostos as mesmas concentrações de NE-ECr, porém por 60 minutos, seguido da irradiação com o LED teve a liberação de LDH de 30,18, 48,05 e 75,66%, respectivamente as concentrações crescentes de NE-ECr. Valores muito similares aos encontrados com a exposição por 30 minutos. Portanto, estes resultados mostram que a exposição dos esferoides de MCF-7 a

estas concentrações de NE-ECr, seja por 30 ou 60 minutos, seguida da TFD, causou o mesmo efeito citotóxico.

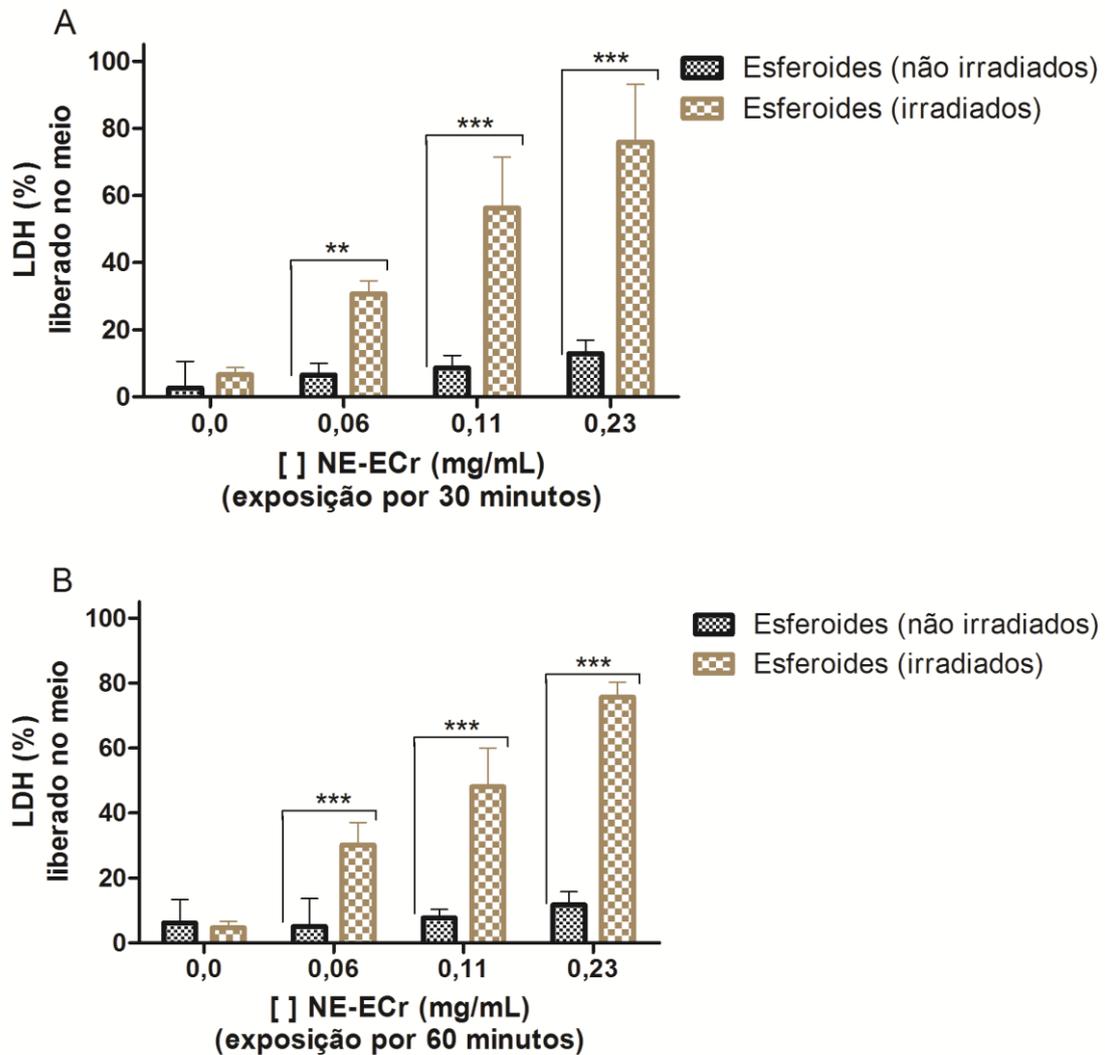


Figura 31: Quantificação de lactato desidrogenase (LDH) liberada no meio de cultivo após TFD mediada pelas NE-ECr. Esferóides irradiados com LED, fluência de 25,9 cm². **A** - esferoides mantidos em exposição pelas NE-ECr por 30 minutos. **B** - esferoides mantidos em exposição pelas NE-ECr por 60 minutos. Colunas de cor preta representam os esferoides que não foram irradiados, colunas em marrom representam os esferoides que sofreram irradiação. Eixo Y: unidade arbitrária. Os dados estão representados como média ± E. P. M. para quadruplicatas. [] significa concentração. * significa p<0,01 e ** significa p<0,001.

5.5.13 Efeito citotóxico nos esferoides de células MCF-7 após 24 horas de aplicação da TFD mediada pelas NE-AIFtCl

Os resultados obtidos do efeito citotóxico nos esferoides de células MCF-7, após 24 horas da aplicação da TFD quando as células foram expostas por 30 e 60 minutos a diferentes concentrações das NE-AIFtCl, estão apresentados na Figura 32. Da mesma forma que realizado com NE-ECr, o efeito citotóxico foi determinado a partir da liberação da enzima lactato desidrogenase, utilizando o kit CytoTox 96[®] (Invitrogen, USA).

De forma similar ao ocorrido com os esferoides expostos as NE-ECr, quando estes foram expostos, tanto por 30 (Figura 32A) quanto por 60 minutos (Figura 32B), a diferentes concentrações das NE-AIFtCl, porém não irradiados com o LED, não apresentaram liberação de LDH significativa quando comparados àqueles que não tiveram contato com as NE-AIFtCl e não foram submetidos à irradiação. O mesmo se deu com os esferoides não expostos às NE-AIFtCl, porém irradiadas com o LED.

No entanto, quando os esferoides foram expostos por 30 minutos a 0,62, 1,25 e 2,50 μM de NE-AIFtCl e irradiados com o LED, a porcentagem de liberação de LDH foi de 28,37, 36,27 e 48,09%, respectivamente. Valores muito maiores do que aqueles encontrados para os esferoides expostos as mesmas condições, porém não irradiados com o LED, a saber: 5,89, 12,75 e 17,10%, respectivamente. Observa-se claramente que há um maior efeito citotóxico quando os esferoides são expostos a concentrações maiores (Figura 32A). O efeito citotóxico sobre os esferoides expostos às mesmas concentrações de NE-AIFtCl, porém por 60 minutos, seguido da irradiação com o LED teve a liberação de LDH de 30,62, 47,60 e 73,14%, respectivamente às concentrações crescentes de NE-AIFtCl.

Vale ressaltar que a TFD mediada por NE-AIFtCl causou um maior efeito citotóxico sobre os esferoides de MCF-7 quando a exposição ao FS foi de 60 minutos, comparado com o efeito da exposição por 30 minutos. Este maior efeito é bem evidente principalmente nas concentrações maiores de 1,25 e 2,50 μM .

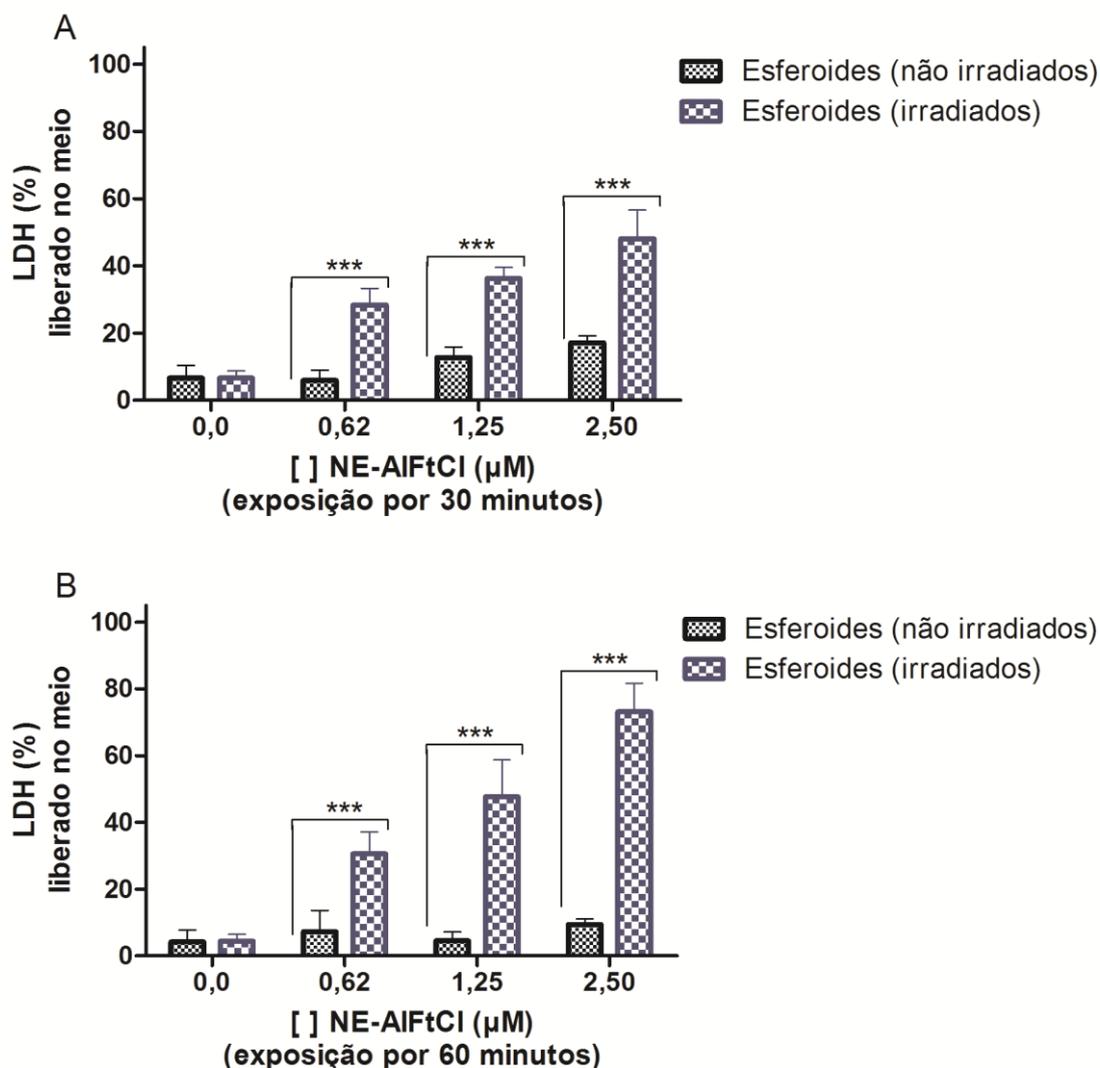


Figura 32: Quantificação de lactato desidrogenase (LDH) liberada no meio de cultivo após TFD mediada pelas NE-AIFtCl. Esferóides irradiados com LED, fluência de 25,9 cm^2 . **A** - esferoides mantidos em exposição à NE-AIFtCl por 30 minutos. **B** - esferoides mantidos em exposição à NE-AIFtCl por 60 minutos. Colunas de cor preta representam os esferoides que não foram irradiados, colunas em marrom representam os esferoides que sofreram irradiação. Eixo Y: unidade arbitrária. Os dados estão representados como média \pm E. P. M. para quadruplicatas. [] significa concentração. ** significa $p < 0,01$ e *** significa $p < 0,001$.

6 Discussão

A incessante busca por novas terapias e fármacos que visam minimizar ou eliminar quaisquer efeitos colaterais trazidos pelos tratamentos contra o câncer ainda é um paradigma. Nesse contexto, estudos pré-clínicos utilizando ensaios em sistemas celulares para a avaliação de novos agentes terapêuticos são um dos passos essenciais no estabelecimento de novos protocolos clínicos para o tratamento de doenças em humanos (Longo *et al.*, 2009). Dentre esses tratamentos a terapia fotodinâmica (TFD) vem despertando bastante atenção. Fundamentada na utilização de três componentes básicos: luz, fotossensibilizante e oxigênio (Figura 3), essa técnica é considerada bastante segura e eficaz (Mroz *et al.*, 2011; Muhelmann, 2011). Uma das limitações da TFD está relacionada à natureza hidrofóbica apresentada pela maioria dos FS. Neste cenário, esse estudo propôs a utilização de dois agentes fotossensibilizantes: extrato de cajuru (ECr) e o cloreto de alumínio-ftalocianina (AlFtCl), associados em nanoemulsões (independentemente), como mediadores da TFD aplicados em células de câncer de mama submetidas ao cultivo bi – e tridimensional.

6.1 Extrato de cajuru associado a nanoemulsões (NE-ECr)

6.1.1 Características e estabilidade coloidal

As nanoemulsões contendo ECr (NE-ECr) foram produzidas pelo Prof^o Dr. Luis Alexandre Muehmann a partir da técnica de nanoemulsificação espontânea descrita por Miller (1998). Na preparação NE-ECr foi utilizada uma mistura de triacilgliceróis

cáprico/caprílico como fase oleosa, e Kolliphor ELP[®] como surfactante, formando nanogotículas dispersas em água destilada. Verificou-se que a proporção de óleo e tensoativo (1:3) utilizada é muito importante para obtenção das NE-ECr dispersas em água com diâmetro médio abaixo de 30 nm. De acordo com Borhade e colaboradores (2012), nanoemulsões são definidas como sistemas heterogêneos formados de óleo-em-água ou água-em-óleo e estabilizadas por agentes de superfície (surfactantes), são cineticamente estáveis e não apresentam floculação ou coalescência durante o armazenamento em longo prazo. Segundo Jain e colaboradores (2013), as nanoemulsões apresentam vantagens distintas, como fácil preparação, utilização de excipientes biocompatíveis e diâmetro pequeno < 200 nm. Neste cenário, tendo as NE-ECr sido preparadas como descrito e apresentado DH de 29,56 nm, a amostra obtida trata-se realmente de nanoemulsões com ECr associado. As NE-ECr preparadas tiveram índice de polidispersão (IPD) abaixo de 0,15, o que também indica sua característica de nanoemulsão homogênea, sem floculação ou coalescência.

Adicionalmente, as NE-ECr apresentaram carga de superfície levemente negativa, potencial zeta de -3,43 mV. De acordo com Radomska-Soukharev (2007), o valor do potencial zeta (Zt) negativo é um fator determinante para estabilidade das nanoemulsões, porém pode variar sob diferentes condições, tais como diferentes composições salinas ou diferentes valores de pH da fase contínua. Segundo Honary e Zahir (2013), o valor do Zt influencia diretamente na eficiência dos nanomateriais utilizados em meios biológicos, podendo ser um determinante para suas aplicações. No caso desta preparação, o valor do potencial zeta ficou muito próximo a zero, refletindo o fato de o Cemophor ELP ser um tensoativo não iônico. Neste caso, como o potencial zeta é próximo a neutro, a estabilização da formulação ocorre principalmente pela

camada de solvatação, visto que o tensoativo usado possui grande capacidade de ligação de água em sua porção hidrofílica.

Para análise da estabilidade físicas as NE-ECr foram dispersas em solução salina (PBS). O ZP das NE-ECr se manteve negativo durante 365 dias – nas condições de 4 °C e ~25 °C – e por 105 dias – a 37 °C, o que corroboram com o descrito por Radomska-Soukharev (2007). Mishra e colaboradores (2007), acrescentam que também a utilização de diferentes dispersantes, como água ou PBS, ajuda a determinar o potencial de superfície ou a estabilidade física em longo prazo. As NE-ECr se mostraram bastantes estáveis nas condições de armazenamento a 4 °C e a ~25 °C por 365 dias, quanto ao DH e IPD. A 37 °C o DH das NE-ECr aumentou consideravelmente, porém, foi mantida a monodispersão. Esse resultado do aumento do DH também foi observado por outros pesquisadores que utilizaram extratos naturais como ECr. McClements e Rao (2011) observaram que nanoemulsões produzidas com monopalmitato (surfactante) e óleo de limão apresentaram se estáveis quanto ao diâmetro somente nas condições de 5 °C e 23 °C. A 40 °C esse diâmetro aumentou significativamente após três dias de armazenamento, ocorrendo a coalescência dessas nanoemulsões. Em outro estudo, McClements e colaboradores (2013) desenvolveram sistemas de nanoemulsões com diferentes concentrações de acetato de vitamina E (fase oleosa) e Tween[®] 80 (surfactante) e o mesmo efeito da desestabilização foi observado quando todas eram acondicionadas a 37 °C. De acordo com Walstra (1996) a desestabilização, ou melhor, a coalescência das nanogotículas que compõem as nanoemulsões ocorre com o rompimento do filme contínuo formado pelo surfactante. Esse rompimento pode ser devido a diferenças na solubilidade entre a fase móvel e contínua, ou decorrente a exposição a altas temperaturas (>37-40 °C). Dessa forma, as

gotículas de óleo se fundem formando gotículas maiores, o que muito provavelmente ocorreu com as NE-ECr na condição a 37 °C.

6.1.2 Características e estabilidade fotofísica e fotoquímica

De acordo com Datty (2004), um FS ideal deve sofrer excitação com luz no comprimento de onda entre 600-800 nm, essa faixa espectral é conhecida como janela óptica para aplicação da TFD. Após a preparação das NE-ECr, estas apresentaram um único pico de absorção no comprimento de onda de 668 nm. Portanto, as NE-ECr tornam-se passíveis de uso na TFD. De acordo com Carvalho (2013), o ECr solubilizado em óleo de patoá em nanoemulsões poliméricas (NanoECr) apresentou pico de absorção em 670 nm. No entanto, essa diferença encontrada entre os dois tipos de nanoemulsões de ECr pode estar diretamente ligada aos óleos utilizados para solubilizá-lo, sendo que nesse presente estudo o ECr foi solubilizado em óleo triacilgliceróis cáprico/caprílico. As NE-ECr apresentaram-se bastante estáveis quanto a esta propriedade fotofísica, tendo apresentado o mesmo único pico de absorção, assim como de emissão, por 365 dias nas condições de 4 °C e ~25 °C, e por 105 dias a 37 °C.

A análise da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) sob irradiação mostrou que diferentes concentrações das NE-ECr apresentaram também uma excelente capacidade de produzir ERO, indiretamente determinada pelo método de degradação do benzofurano-¹O₂-dependente, descrito por Spiller e colaboradores (1998). Resultado similar foi obtido por Carvalho (2013) para NanoECr.

Assim, com os resultados obtidos com os espectros de absorção e emissão somados com à capacidade de produzir ERRO, observa-se que as NE-ECr possuem

propriedades fotofísicas ideais para seu uso como mediador da TFD no tratamento de células neoplásicas.

6.1.3 Citotoxicidade das NE-ECr: Cultivo celular (2D)

Diante das propriedades fotofísicas apresentadas pelas NE-ECr, diferentes concentrações destas foram utilizadas para avaliar o efeito terapêutico do ECr sobre células tumorais de mama. Dessa forma, o primeiro passo foi avaliar, por meio de microscopia confocal, se as células possuem a capacidade de internalizar as NE-ECr. Valendo ressaltar que a exposição de células de adenocarcinoma mamário humano (MCF-7) à NE-ECr ainda não havia sido descrito na literatura.

Assim, foi observado que as NE-ECr distribuem-se predominantemente no citoplasma das células MCF-7, após 15 minutos de exposição ao FS. De acordo com Honary e Zahir (2013), essa incorporação está diretamente ligada à carga de superfície que as nanopartículas apresentam. Soukos e colaboradores (1997) mostraram, por meio de microscopia de fluorescência, que conjugados catiônicos são encontrados na forma de agregados, e permanecem ligados à membrana plasmática, já os neutros e aniônicos são internalizados nas organelas celulares. Ciani e colaboradores (2013) reforçam que, além da carga de superfície, o diâmetro das nanopartículas desempenha um papel fundamental nessa internalização. Segundo os autores, esse processo ocorrendo em duas etapas: primeira; o contato obrigatório à membrana, e segunda: a internalização. Carvalho (2013) mostrou, por microscopia confocal, que NanoECr é incorporado e permanece no citoplasma de células de adenocarcinoma mamário murino (células 4T1). Dessa forma, o resultado obtido nesse estudo é alinhado aos descritos acima, primeiro

pela caracterização apresentada pelas NE-ECr e segundo pela deposição intracitoplasmática.

Antes do início da TFD propriamente dita, foi analisada a viabilidade das células expostas somente ao LED (diodo emissor de luz com $25,9 \text{ j/cm}^2$) ou ao LED com diferentes concentrações das nanoemulsões sem ECr (NE-LECr). A viabilidade, tanto das células MCF-7 quanto MCF-10A, não foi significativamente alterada quando irradiadas ou não pelo LED. Monge-Fuentes (2014) apresentou resultado bem similar quando células de melanoma maligno murino (B16F10) foram expostas também somente ao LED, havendo um decréscimo na viabilidade destas células, mas não foi significativo.

As nanoemulsões sem ECr (NE-LECr) não apresentaram toxicidade nas células mesmo com irradiação pelo LED. Esse ensaio foi realizado com intuito de avaliar se o óleo triacilgliceróis caprico/caprílico e o tensoativo Kolliphor[®] estariam ocasionando morte celular significativa. Kiss e colaboradores (2013) descrevem que derivados do Kolliphor[®] apresentam toxicidade em células endoteliais e epiteliais. Entretanto, nesse estudo, o Kolliphor[®] e o óleo triacilgliceróis caprico/caprílico não apresentaram toxicidade nas células MCF-7 e MCF-10A. Esses resultados são corroborados com estudos recentes que apresentam o tensoativo Kolliphor[®] como agente atóxico em pequenas concentrações. Sood e colaboradores (2014) mostraram que o Kolliphor[®] utilizado como tensoativo de uma nanoemulsão, apresentou-se atóxico quando utilizado no tratamento de células da mucosa nasal. Chen e colaboradores (2014) reforçam essa não toxicidade do tensoativo Kolliphor[®] associado à nanoemulsão, no tratamento de células HeLa, incubando por 24 horas. A utilização desses agentes tensoativos desempenha um importante papel como proteção e potencialização de alguns fármacos anticâncer insolúveis em água (Gelderblom *et al.*, 2001). O tensoativo

Kolliphor[®] é aprovado pela agência estadunidense FDA (do inglês: *Food and Drug Administration*). Não há descrição na literatura de nenhuma toxicidade apresentada pelo óleo triacilgliceróis capríco/caprílico.

A TFD mediada por NE-ECr induziu morte nas células tumorais (MCF-7) e não tumorais (MCF-10A), conforme apresentado no ensaio colorimétrico do MTT. Entretanto, foram necessárias concentrações bem menores para ocasionar morte nas células MCF-7, mostrando uma maior sensibilidade dessa linhagem comparando com a linhagem não tumoral.

A terapia fotodinâmica mediada por NE-ECr foi eficiente sobre células tumorais de mama. As concentrações citotóxicas de NE-ECr que causaram 50% (CC₅₀) e 100% (CC₁₀₀) de morte das células MCF-7 foram de 0,0013 e 0,0070 mg/mL, respectivamente. Nas células normais foram necessárias concentrações maiores para obter o mesmo efeito, sendo obtidas CC₅₀ e CC₁₀₀ de 0,0048 e de 0,020 mg/mL, respectivamente. Portanto, as células tumorais foram mais sensíveis ao tratamento. Uma concentração de NE-ECr quase quatro vezes menor é necessária para matar 50% das células tumorais, em comparação das células normais. Para causar a morte de 100% das células tumorais basta uma concentração de NE-ECr três vezes menor que a concentração 100% citotóxica para as células normais.

No estudo realizado por Carvalho (2013), a TFD mediada por NanoECr mostrou-se também citotóxica, tanto para as células tumorais de mama murino quanto normais. A TFD causou a morte de 50% das células tumorais quando expostas a 0,054 mg/mL e densidade de energia de 4,2 J/cm². Uma concentração citotóxica de ECr muito maior do que a observada no presente estudo. Assim, pode-se inferir que o ECr em nanoemulsão do tipo óleo em água utilizando triacilgliceróis capríco/caprílico, como

fase oleosa, e estabilizadas com tensoativo Kolliphor[®] (NE-ECr) foi mais eficiente na TFD em menor concentração do que quando em nanoemulsão polimérica (NanoECr).

No estudo de Monge-Fuentes (2014), utilizando nanoemulsões com óleo de açaí (NanoA), um composto de origem vegetal também com propriedade fotossensibilizante, foi observado efeito citotóxico da TFD mediada por NanoA, tanto em células tumorais quanto em células normais, semelhante ao encontrado neste presente estudo. A concentração citotoxicidade de NanoA, que causou a morte de 50% das células de carcinoma, foi também menor que a necessária para causar o mesmo efeito nas células não tumorais. De acordo com Aizadeh e colaboradores (2014), as ERO podem causar alterações temporárias ou letais em qualquer tipo celular que apresente oxigênio (estresse oxidativo). Todo processo de vida celular, incluindo proliferação, apoptose e necrose são influenciados por essas alterações dependendo da concentração e do tempo de vida média da ERO. Dessa forma, o efeito da TFD mediada pelas NE-ECr nas células não tumorais é justificado pela literatura. Vale ressaltar que células tumorais possuem uma maior propensão para internalizar moléculas FS do que as células não tumorais (Aizadeh *et al.*, 2014), o que também pode colaborar para o resultado encontrado.

Uma vez que as células tumorais duplicam a sua população geralmente a cada 12 horas, o que não acontece com as células normais, que normalmente fazem o mesmo a cada 24 horas, foi avaliada a recuperação das células que resistiram à TFD mediada por NE-ECr após 24, 48 e 72 horas do tratamento. Nesse ensaio foram utilizadas as CC_{50} (0,0013 mg/mL) e CC_{100} (0,0070 mg/mL) referentes à linha de células tumoral, uma vez que, as células MCF-7 foram o alvo de interesse.

As células normais (MCF-10A), expostas a 0,0013 mg/mL de NE-ECr, não tiveram a sua viabilidade alterada após 24 e 48 horas da TFD. Portanto, o tratamento de células tumorais de mama (MCF-7) nestas condições, que mata 50% de MCF-7, não causou efeito citotóxico nas células normais, mesmo após 48 horas do tratamento. No entanto, a viabilidade das células normais foi reduzida em 9,92% após 72 horas do tratamento. Esta redução pode ser explicada pelo efeito da confluência celular decorrente do rápido metabolismo estas células, onde a limitação do espaço físico acabou por causar morte de parte destas células, e não como efeito citotóxico da TFD.

Após 24 horas da TFD sob as mesmas condições, foi observada a morte de pouco mais de 20% das células tumorais (MCF-7). Após 48 horas da TFD, não foi observada qualquer recuperação das células, pelo contrário, aparentemente o efeito citotóxico do tratamento permaneceu, já que 25% das células se mostraram inviáveis. Somente após 72 horas do tratamento foi observada uma recuperação de 8,15% de células tumorais. Portanto, o efeito citotóxico da TFD mediada por NE-ECr nestas condições ainda se mostra presente nas células tumorais após 72 horas, enquanto que as células normais permaneceram viáveis.

As células normais MCF-10A, expostas a 0,0070 mg/mL de NE-ECr, tiveram uma redução na viabilidade celular de quase 75% após 24 horas da TFD, porém há uma recuperação na viabilidade destas células para 16,3% após 48 horas e 32% após 72 horas. As células tumorais MCF-7, após 24 horas da TFD sob as mesmas condições, morreram quase que em sua totalidade. Somente 1% destas células se recuperou após 48 horas do tratamento. Esta recuperação é ligeiramente maior (3,18%) após 72 horas. O maior efeito citotóxico de NE-ECr nesta concentração de ECr como FS na TFD para o combate das células tumorais de mama é, portanto, evidente.

Apesar do efeito citotóxico também observado nas células normais, a sua capacidade de recuperação ao longo do tempo é bem maior quando comparado com o observado para as células tumorais. De acordo com Aizadeh e colaboradores (2014) as células tumorais possuem mecanismos de defesa e recuperação mais elevados que as células normais, porém a eficiência do tratamento é o fator determinante para obtenção de resultados promissores. Assim, este é um resultado que indica o potencial do emprego desta modalidade terapêutica, com NE-ECr como fármaco fotossensibilizante, no tratamento do câncer de mama. No entanto, um estudo avaliando tempos maiores de recuperação pode elucidar até quando a TFD afeta a viabilidade de células mamárias normais.

6.1.4 Obtenção de esferoides de células MCF-7

Diferentemente do cultivo em monocamada, o cultivo celular em 3D permite a obtenção de células no formato de esferoides (aglomerados celulares), que mimetizam tumores *in situ* (Hirschhaeuser *et al.*, 2010). Adicionalmente, segundo Perche e Torchilin (2012), a utilização dos esferoides para investigação do efeito antitumoral de combinações de nanopartículas e fármacos vem crescendo nos últimos anos. Assim, um dos desafios nesse estudo foi estabelecer o cultivo tridimensional (3D) de adenocarcinoma mamário humano (células MCF-7), no laboratório de nanobiotecnologia, como modelo de estudo para o tratamento de câncer de mama *in vitro*. A escolha desta linhagem celular se justifica pela excelente formação de seus esferoides, que segundo Debed e colaboradores (2010), as células MCF-7 apresentam

proteínas de adesão, como por exemplo, as *E-caderinas*, que conferem estabilidade aos esferoides.

Neste presente estudo, após seis dias de cultivo, foram obtidos esferoides com diâmetro de 200-250 μm a partir de $1,5 \times 10^4$ células, utilizando o método de sobreposição líquida descrito por Perche e Torchilin (2012), com adaptações. Por este método, foi possível a obtenção de um único esferoide por poço na microplaca.

A morfologia apresentada pelos esferoides obtidos neste estudo corrobora com o estudo feito por Perche e Torchilin (2012), apresentando-se arredondados e com diâmetro de aproximadamente 250 μm , além da presença de uma membrana revestindo a estrutura esferoidal. De acordo com Perche e Torchilin (2012), essa membrana serve como uma barreira de proteção, dificultando a penetração de moléculas. Essa característica é conveniente para a sua utilização em estudos pré-clínicos, uma vez que essa barreira é similar à encontrada em microtumores *in situ*. Para Hirschhaeuser e colaboradores (2010) experimentos com esferoides pode prevenir a má utilização de animais, pois a extrapolação das condições usadas no cultivo em monocamada pode ser previamente testada nos esferoides, e assim, poder ajustar melhor as condições a serem testadas nos experimentos *in vivo*. Portanto, os esferoides obtidos a partir desta técnica estão aptos a serem utilizados para o estudo do efeito da TFD mediada por NE-ECr ou por NE-AIFtCl, sobre adenocarcinoma mamário humana *in vitro* 3D.

6.1.5 Citotoxicidade de NE-ECr nos esferoides de MCF-7

Esse trabalho propôs avaliar o efeito da TFD mediada por três diferentes concentrações de NE-ECr (0,06, 0,11 e 0,13 mg/mL) sobre os esferoides de células MCF-7, após 30 e 60 minutos de exposição ao FS. Vale ressaltar que até o presente momento, a utilização de NE-ECr como mediador da TFD em cultivo de células tridimensionais nunca foi descrito na literatura. Para tanto, foi utilizado o Kit CytoTox 96[®] (Invitrogen, USA), o qual quantifica a enzima lactato desidrogenase liberada no meio, de modo diretamente proporcional à quantidade de células mortas. As concentrações de NE-ECr e os tempos de exposição testados foram escolhidos como extrapolações das condições testadas nos experimentos em monocamada.

Como observado no experimento em monocamada, a viabilidade dos esferoides, expostos por 30 ou 60 minutos às diferentes concentrações de NE-ECr, porém não irradiados com o LED, não foi alterada. Porém, quando os esferoides foram expostos, tanto por 30 quanto 60 minutos, a NE-ECr, e em seguida irradiados com LED por 20 minutos, foi observada uma citotoxicidade dose-dependente para todas as concentrações das NE-ECr, de modo muito similar em ambos os tempos de exposição. Isto mostra que o maior tempo de exposição (60 minutos) não causa diferença na eficiência da TFD, ou seja, não potencializa o efeito do tratamento. Mussi (2013) avaliou o efeito citotóxico da exposição, por diferentes tempos, da doxorrubicina associada a nanopartículas lipídicas sólidas, sobre esferoides de células MCF-7. A citotoxicidade foi determinada como efetiva somente após 48 horas de exposição ao fármaco. Portanto, comparativamente, as NE-ECr são potentes candidatas para o tratamento do câncer de mama por TFD, cuja eficiência pode ser atingida em menor tempo de exposição ao FS, minimizando também o efeito sobre as células normais.

De acordo com Perche e colaboradores (2012), esferoides de células MCF-7 incorporam elevadas taxas de doxorrubicina, quando este fármaco está associado a

micelas poliméricas com DH de 14 nm, de forma mais eficiente do que a forma livre do fármaco. Mussi (2013) também verificou essa incorporação em esferoides de MCF-7, porém utilizando nanopartículas lipídicas sólidas, de DH de 100 nm, como carreadora da DOX. Em ambos os trabalhos citados, o efeito citotóxico só foi efetivo após 48 horas de incubação com o fármaco. No presente estudo, o DH das NE-ECr é de 29 nm, um tamanho que permite uma rápida e eficiente incorporação pelas células MCF-7. Apesar de não ter sido quantificada a capacidade de incorporação das NE-ECr pelas células MCF-7, a grande concentração deste FS no citoplasma destas células em monocamada, após sua exposição por 15 minutos a 0,125 mg/mL de NE-ECr, mostra que esta formulação também teve uma alta eficiência de incorporação pelos esferoides de MCF-7, o que é corroborado pelo resultado da citotoxicidade causadas nos esferoides após 24 horas da TFD.

6.2 Cloreto de alumínio-ftalocianina associado à nanoemulsão (NE-AlFtCl)

6.2.1 Características e estabilidade coloidal

As nanoemulsões contendo AlFtCl (NE-AlFtCl) foram produzidas pelo Prof^o Dr. Luis Alexandre Muehmann a partir da técnica de emulsificação espontânea descrita por Miller (1998). Na preparação foi utilizado óleo de rícino, como fase oleosa, e estabilizadas com tensoativo Kolliphor[®] (NE-AlFtCl), formando nanogotículas dispersas em água destilada. Verificou-se que a proporção de óleo e tensoativo (1:3) utilizada é muito importante para obtenção das NE-AlFtCl dispersas em água com diâmetro médio abaixo de 30 nm.

As NE-AIFtCl apresentaram carga de superfície negativa, com potencial zeta de -6,245 mV. O valor do potencial zeta influencia diretamente na estabilidade de nanopartículas. Segundo Shaw (1975), configura-se boa estabilidade das nanopartículas, carga de superfície com valor entre +30 mV ou menor que - 30 mV. Vale ressaltar que o valor do potencial zeta não é contínuo, podendo este variar em diferentes condições.

As NE-AIFtCl se mostraram bastantes estáveis nas condições de armazenamento a 4 °C, ~25 °C e 37 °C por 365 dias, quanto ao DH, IPD e potencial zeta. Rossetti e colaboradores (2011) observaram resultados bem semelhantes quanto a estabilidade física de nanoemulsões (óleo de canola e Span 80[®] e Tween 80[®] (3:1)) como carreadora do cloreto de zico-ftalocianina (ZnFtCl) que permaneceram estáveis por três meses em temperatura ambiente. Muehlmann (2011) avaliou a estabilidade de nanopartículas poliméricas como carreadora da AIFtCl (AIFtCl-NP). As AIFtCl-NP eram estáveis somente quando congeladas, sendo que essa estabilidade foi observada em apenas dois meses.

De acordo com Bhaskar e colaboradores (2010) os nanocarreadores ideais devem apresentar diâmetro <999 nm, os componentes utilizados para produção devem ser atóxicos, garantir as propriedades do fármaco carreado, apresentar uma excelente estabilidade em sistemas biológicos, fácil manuseio e baixo custo. Sendo assim, a NE-AIFtCl utilizada nesse estudo atende esses pré-requisitos para várias aplicações biológicas, dentre essas o tratamento de câncer.

6.2.2 Características e estabilidade fotofísica e fotoquímica

O AIFtCl é um FS de 2^a geração que apresenta um único pico de absorção e emissão nos comprimentos de onda entre 600-800 nm. Vale apenas ressaltar que,

segundo Datty (2004), essa faixa espectral é conhecida como janela óptica para aplicação da TFD. Essas propriedades do AlFtCl foram mantidas após a nanoemulsificação. Muehlmann (2011) demonstrou que a associação do AlFtCl a nanoestruturas também permitiu a avaliação das propriedades fotofísica e fisicoquímica em meio aquoso. Melo (2012) reforça essa capacidade utilizando lipossomas para nanoestruturar o AlFtCl.

Segundo Muehlmann (2011) o AlFtCl-livre disperso em PBS ou etanol apresentam um pico máximo de absorção no comprimento de onda de 670 nm e 668 nm, respectivamente. Quando o AlFtCl foi associado a nanopartículas de poli(vinil, metil-co-anidrido maleico) (AlFtCl-NP), foi observado um pico máximo de absorção no comprimento de onda entre 678 nm. A emissão de fluorescência sob excitação em 350 nm também não mudou muito, apresentando um único pico máximo de emissão de 688 nm para AlFtCl-NP e de 678 nm quando solubilizada em etanol. Esses resultados demonstraram que a nanoestruturação do FS AlFtCl não altera suas propriedades fotofísicas. Desta forma esse presente estudo é corroborado pelos resultados apresentados por Muehlmann (2011), apresentando um único pico de absorção e de emissão de fluorescência (excitação em 350 nm) no comprimento de onda de 676 e de 680 nm, respectivamente.

De acordo com Gupta e colaboradores (2011) a estabilidade das nanopartículas é essencial para preservar as propriedades de FS carregados. Essa informação corrobora os resultados apresentados pelas NE-AlFtCl, uma vez que, os picos de absorção (676 nm) e emissão da fluorescência (680 nm) apresentada pelas NE-AlFtCl não apresentaram diferença significativa nas condições de 4 °C, ~25 °C e a 37 °C avaliados por 365 dias. O estudo realizado por Melo (2012) não teve o mesmo sucesso, visto que o AlFtCl associado com lipossomas não se manteve estável para

avaliação da emissão de fluorescência (680 nm), observando uma queda na fluorescência da amostra. As NE-AIFtCl apresentaram excelente estabilidade demonstrando que a nanoestruturação do FS AIFtCl por nanoemulsões do tipo óleo-em-água não altera suas propriedades fotofísicas.

Segundo Dougherty (1996) FS que absorvem luz em comprimentos de onda entre 600-800 nm possuem maior poder de penetração em tecidos biológicos, conferindo assim uma das vantagens das NE-AIFtCl. O AIFtCl possui excelente capacidade de produzir espécies reativas de oxigênio (ERO). Cerny e colaboradores (2010) descreveram a excelente capacidade de produzir ERO em oito tipos de ftalocianinas, dentre estas a AIFtCl-livre em etanol, utilizando o método de degradação do benzofurano-¹O₂-dependente, descrito por Spiller e colaboradores (1998).

A capacidade de produção de ERO das NE-AIFtCl foi avaliada pelo método de degradação do benzofurano-¹O₂-dependente. Observou-se que todas as concentrações utilizadas nesse experimento apresentaram capacidade de produzir as ERO eficientemente. Outros estudos mostraram resultados similares utilizando AIFtCl em diferentes estruturas nanométricas. Segundo Muehlmann (2011), as nanopartículas poliméricas além de preservar as propriedades fotofísicas das AIFtCl, também permitiram a produção de ERO por este FS em meio aquoso sob irradiação. Da mesma forma Melo (2012) observou essa eficiência da produção de ERO pelo FS AIFtCl associado a lipossomas.

As NE-AIFtCl apresentaram uma excelente capacidade de produzir ERO, corroborando os resultados apresentados. O diferencial desse estudo foi a utilização de uma série de concentrações das NE-AIFtCl, assim, pôde-se avaliar de acordo com a concentração de AIFtCl. Foi observado que essa produção é dependente da

concentração de AlFtCl, ou seja, quanto maiores eram as concentrações maiores era a produção de ERO.

6.2.3 Citotoxicidade das NE-AlFtCl: Cultivo celular (2D)

Diante das propriedades fotofísicas apresentadas pelas NE-AlFtCl, diferentes concentrações destas foram utilizadas para avaliar o efeito terapêutico do AlFtCl sobre células tumorais de mama. Assim, o primeiro passo foi avaliar, por meio de microscopia confocal, se as células possuem a capacidade de internalizar as NE-AlFtCl.

Dessa forma, foi observado que as NE-AlFtCl distribuem-se exclusivamente no citoplasma das células MCF-7, após 15 minutos de exposição ao FS. Resultados similares foram observados por Muehlmann (2011), que observou a internalização do AlFtCl-NP no citoplasma de células de adenocarcinoma mamário murinho (4T1). Breymayer e colaboradores (2014) observaram que moléculas de AlFtCl são internalizadas por macrófagos murinos (J774A.1) e se apresentam uniformemente distribuídas no citoplasma destas células. Dessa forma, o resultado obtido nesse estudo é corroborado pelos descritos acima.

A TFD mediada por diferentes concentrações de AlFtCl (0,31-10 μM) foi avaliada em células MCF-7 e MCF-10A. De acordo com Muehlmann (2011) o FS AlFtCl possui alta hidrofobicidade, assim, quando em meio aquoso tende a formar agregados que reduzem sua atividade fotodinâmica. Cronjé e colaboradores (2012) observaram que a TFD mediada pela AlFtCl-livre apresentou citotoxicidade significativa apenas quando utilizada uma concentração de 35 μM e exposição por 24

horas, o que justifica a ausência de citotoxicidade apresentada nesse estudo utilizando AlFtCl-livre. As condições testadas, tanto concentração de AlFtCl quanto o tempo de exposição, não foram suficientes para ocasionar morte celular significativa.

As nanoemulsões sem AlFtCl (NE-LAlFtCl) não apresentaram toxicidade nas células mesmo com irradiação pelo LED. Esse ensaio foi realizado com intuito de avaliar se o óleo rícino e o tensoativo Kolliphor[®] estariam ocasionando morte celular significativa. De acordo com Bruxel (2012) os derivados do Kolliphor[®] podem causar hemólise e citotoxicidade. Nesse estudo não foram observadas citotoxicidade causada pelas NE-LAlFtCl nas células MCF-7 e MCF-10A. A não citotoxicidade do Kolliphor[®] pode estar diretamente ligada às baixas concentrações que foram utilizadas nesse estudo.

A terapia fotodinâmica mediada por NE-AlFtCl foi eficiente sobre células tumorais de mama. As concentrações citotóxicas de NE-AlFtCl que causaram 50% (CC₅₀) e 100% (CC₁₀₀) de morte das células MCF-7 foram de 0,0028 e 0,093 µM, respectivamente. Nas células normais foram necessárias concentrações maiores para obter o mesmo efeito, sendo obtidas CC₅₀ e CC₁₀₀ de 0,0058 e de 0,625 µM, respectivamente. Portanto, as células tumorais foram mais sensíveis ao tratamento. Uma concentração de NE-AlFtCl quase duas vezes menor é suficiente para matar 50% das células tumorais, em comparação às células normais. Para causar a morte de 100% das células tumorais, basta uma concentração de NE-AlFtCl sete vezes menor que a concentração 100% citotóxica para as células normais. Ma (2012) utilizando AlFtCl-NP como mediadora da TFD observou que as células MCF-7 apresentaram maior sensibilidade que MCF-10A; a CC₅₀ encontrada para as células MCF-7 foi quatro vezes menor que a para as células MCF-10A.

As células tumorais duplicam a sua população geralmente a cada 12 horas, o que não acontece com as células normais, que normalmente o fazem a cada 24 horas. Dessa forma foi avaliada a recuperação das células que resistiram à TFD mediada por NE-AIFtCl após 24, 48 e 72 horas do tratamento. Nesse ensaio utilizamos as CC_{50} (0,0028 μ M) e CC_{100} (0,093 μ M) referentes à linhagem de células tumoral, uma vez que, as células MCF-7 foram o alvo de interesse.

De acordo com Casas e colaboradores (2008) TFD mediada pelo ácido aminolevulinico (ALA) induz dano nas proteínas do citoesqueleto, acarretando problemas na adesão e na organização dos elementos do citoesqueleto. Segundo Siqueira e Pacheco (2009), as células neoplásicas submetidas à TFD mediada por cloreto de zinco-ftalocianina apresentam um comprometimento na recuperação das células após o tratamento. De acordo com Muehlmann (2011) o AIFtCl causa morte nas células por apoptose e necrose, dependendo da dose de irradiação.

As células normais (MCF-10A) apresentaram um decréscimo na viabilidade quando avaliadas somente com a exposição ao LED. Não foram observadas diferenças na viabilidade 24 horas após a TFD, porém foi verificado um decréscimo de 7,06% ($p < 0,01$) após 48 horas e de 8,49% ($p < 0,01$) após 72 horas da TFD. A redução pode ser explicada pelo efeito da confluência celular, decorrente do rápido metabolismo destas células, onde a limitação do espaço físico acabou por causar morte de parte destas células, e não como efeito citotóxico da TFD.

As células MCF-10A, expostas a 0,0028 μ M (CC_{50}) de NE-AIFtCl, apresentaram uma redução da viabilidade de 34,39% após 24 horas da TFD. Essa redução foi mantida após 48 horas, ou seja, não foi observada uma recuperação das

MCF-10A. Quando avaliada após 72 horas a viabilidade apresentou uma queda de 19,92% comparada ao resultado encontrado no tempo de 24 horas após a TFD.

Quando utilizada a concentração de 0,093 μM (CC_{100}) de NE-AIFtCl, as células MCF-10A, 24 horas após a TFD, apresentaram uma viabilidade de 18,59%. Em avaliação 48 horas após, foi observada uma recuperação de 3,65% destas células. No entanto, após 72 horas houve uma queda de 14,46% na viabilidade. Dessa forma, não foi observada uma recuperação dessa linhagem nessas condições.

As células MCF-7 não apresentaram diferenças na viabilidade na ausência de NE-AIFtCl após 24 e 48 horas da irradiação com LED. Após 72 horas foi observada uma redução da viabilidade das MCF-7 exposta somente ao LED de 9,16% quando comparada com 24 horas. Essa redução ocasionada somente com LED pode ser decorrente do superaquecimento apresentado pelo equipamento após muitas seções de irradiação.

As MCF-7 expostas a 0,0028 μM das NE-AIFtCl apresentaram uma viabilidade de 61,04% após 24 horas da TFD. Essa viabilidade reduziu após 48 horas da TFD para 43,29%, demonstrando que as células MCF-7 não apresentaram recuperação. Quando avaliada 72 horas depois o valor caiu para 41,98%.

Quando avaliada a exposição à concentração de 0,093 μM das NE-AIFtCl, as células MCF-7 apresentaram morte de quase 100% das células, nos tempos de 48 e 72 horas após a TFD, comprando com o tempo de 24 horas não foram observadas recuperação das células MCF-7. Esse resultado mostra a eficiência da TFD mediada pelas NE-AIFtCl em células tumorais comprando com as células não tumorais.

6.2.4 Citotoxicidade de NE-AIFtCl nos esferoides de MCF-7

Esse trabalho propôs avaliar o efeito da TFD mediada por três diferentes concentrações de NE-AIFtCl (0,62, 1,25 e 2,5 μ M) sobre os esferoides de células MCF-7, após 30 e 60 minutos de exposição ao FS.

As concentrações de NE-AIFtCl e os tempos de exposição testados foram escolhidos como extrapolações das condições testadas nos experimentos em monocamada. O efeito citotóxico foi avaliado nos esferoides das MCF-7 tratados com TFD mediada pelas diferentes concentrações NE-AIFtCl. Não foi observada toxicidade significativa quando os esferoides foram submetidos à exposição por 30 e 60 minutos com diferentes concentrações de NE-AIFtCl, mantidos no escuro. Esse resultado corrobora o apresentado no cultivo em monocamada MCF-7 exposta a diferentes concentrações das NE-AIFtCl.

Porém, quando expostos por 30 minutos e em seguida irradiados por 20 minutos, foi observada uma citotoxicidade significativa ($p < 0,001$). Quando essa exposição foi de 60 minutos, observou-se uma maior eficiência da TFD mediada pela NE-AIFtCl, conferida pela liberação de LDH. De acordo com Perche e Torchilin (2012) a concentração do fármaco e o tempo de exposição são fatores importantes para eficiência no tratamento. Souza (2004) demonstrou a erradicação de esferoides feitos a partir de células Hep-2da utilizando TFD mediada por AIFtCl-livre (10 μ M), nesse estudo os esferoides foram expostos ao AIFtCl por uma hora. Barbugli (2010) obteve resultados bem similares utilizando esferoides obtidos de células melanoma metastáticos (WM 2617). Naquele estudo, a TFD foi eficiente contra esferoides, diminuindo a formação de colônias das células, se mostrando potencialmente anti-

metastático. Esses resultados reforçam o encontrado nesse estudo para os esferoides tratados com NE-AlFtCl.

7 Conclusão

Diante dos resultados obtidos no presente estudo pode-se chegar às seguintes conclusões:

➤ ***Cultivo tridimensional de células:***

✓ Foram obtidos, com sucesso, esferoides com diâmetro de 200-250 μm de células de adenocarcinoma mamário humano (MCF-7);

➤ ***Nanoemulsões associadas ao extrato de cajuru (NE-ECr):***

✓ Apresentaram DH menor que 30 nm, são monodispersas, com carga de superfície negativa, pico único de absorção de 668 nm e pico único de fluorescência de 676 nm (excitação a 350 nm);

✓ Permaneceram estáveis nas condições de 4 °C e ~25 °C ao longo de 365 dias, mantendo sua atividade fotodinâmica e suas características físicas;

✓ Excelente capacidade de produzir espécies reativas de oxigênio em baixas concentrações de ECr;

✓ São internalizadas por células tumorais, concentrando-se no citoplasma;

✓ Não apresentam citotoxicidade no escuro nas células tumorais e não tumorais;

✓ Este veículo do ECr (NE-LECr) não foi citotóxico nas células tumorais e não tumorais, assim como somente a irradiação do LED;

✓ A TFD mediada pelas NE-ECr foi citotóxica contra células tumorais com maior intensidade do que a exercida sobre células não tumorais. Sendo que as células não

tumorais possuem maior capacidade de recuperação após a aplicação da TFD, enquanto que a viabilidade das células tumorais, após 72 horas da TFD, ainda é baixa;

✓ A TFD mediada pelas NE-ECr foi citotóxica contra esferoides de células MCF-7.

➤ ***Nanoemulsões associadas ao cloreto de alumínio-ftalocianina (NE-AIFtCl):***

✓ Apresentaram DH menor que 30 nm, são monodispersas, com carga de superfície negativa, pico único de absorção de 676 nm e pico único de fluorescência de 680 nm (excitação a 350 nm);

✓ Permaneceram estáveis nas condições de 4 °C, ~25 °C e 37 °C ao longo de 365 dias, mantendo sua atividade fotodinâmica e suas características físicas;

✓ Excelente capacidade de produzir espécies reativas de oxigênio em baixas concentrações de AIFtCl;

✓ A TFD mediada pelo AIFtCl livre não apresentou citotoxicidade;

✓ São internalizadas por células tumorais e permanecem dispersas no citoplasma;

✓ Não apresentou citotoxicidade no escuro nas células tumorais e não tumorais;

✓ Este veículo do AIFtCl (NE-LAIFtCl) não foi citotóxico nas células tumorais e não tumorais;

✓ A TFD mediada pelas NE-AIFtCl foi citotóxica contra células tumorais com maior intensidade do que a exercida sobre células não tumorais. Sendo que as células não tumorais possuem maior capacidade de recuperação após a aplicação da TFD, enquanto que a viabilidade das células tumorais, após 72 horas da TFD, ainda é baixa;

✓ A TFD mediada pelas NE-AIFtCl foi citotóxica contra esferoides de células MCF-7;

Referências

Amaral J. B.; Machado-Santelli G. M. A cultura de células em 3 dimensões e a sua aplicação em estudos relacionados a formação do lúmen. **Naturalia**. v. 34, p. 1-20, 2011.

Anderson J. W.; Smith B. M.; Washnock C. S. Cardiovascular and renal benefits of dry bean and soybean intake. **The American Journal of Clinical Nutrition**. v.70, p. 464 - 74, 1999.

Albuquerque J. Plantas tóxicas no jardim e no campo. Belém: **FCAP**. P. 1-120, 1980.

Allison R. R.; Downie G. H.; Cuenca R.; Hu X-H.; Childs C. J. H. Sibata C. H. Photosensitizers in clinical PDT. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**. v. 1, p. 27-42, 2004.

Arumainayagem N.; Moore C. M.; Ahmed H. U.; Emberton M. Photodynamic therapy for focal ablation of the prostate. **World journal of urology**. v. 28, p. 571-6, 2010.

Aton N.; Benoit J. P.; Saulnier P. Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates – A review. **Journal os Controlled Release**. v.128, p. 185-99, 2008.

Barnes L. D.; Giuliano E. A.; Ota J., Cohn L. A.; Moore C. P. The effect of photodynamic therapy on squamous cell carcinoma in a murine model: evaluation of time between intralesional injection to laser irradiation. **Vet J**. v. 180, p. 60-5, 2009.

Battle X.; Labarta A. Finite-size effects in fine particles: magnetic and transport properties. **J. Phys. D: Appl. Phys.** v. 35, p. 15-42, 2002.

Berlanda N.; Vercellini P.; Fedele L. The outcomes of repeat surgery for recurrent symptomatic endometriosis. **Curr Opin Obstet Gynecol**. v. 22, p. 320-325, 2010.

Bhaskar S.; Tian F.; Stoeger T.; Kreyling W.; de la Fuente J. M.; Grazú V.; Borm P.; Estrada G.; Ntziachristos V.; Razansky D. Multifunctional Nanocarriers for diagnostics, drug delivery and targeted treatment across blood-brain barrier: perspectives on tracking and neuroimaging. **Part. Fibre Toxicol**. v. 3, p. 1-52, 2010.

Biel, M. A. Photodynamic therapy treatment of early oral and laryngeal cancers. **Photochem Photobiol**. v. 83, p.1063-8, 2007.

Borhade V.; Pathak S.; Sharma S.; Patravale V. Clorimazole nanoemulsion for malária chemotherapy. Part I: Preformulation studies, formulation design and physicochemical evaluation. **Internationl Journal of Pharmaceutics**. v. 143, p. 138-48, 2012.

Breymayer J.; Rück A.; Ryabova A. V.; Loschenov V. B.; Steiner R. W. Fluorescence Investigation of the Detachment of Aluminium Phthalocyanine Molecules from Aluminium Phthalocyanine Nanoparticles in Monocytes/Macrophages and Skin Cells and their Localization in Monocytes/Macrophages. **Photodiagnosis and Photodynamica Therapy**. p. 1-43, 2014.

Brown S.B.; Brown E. A.; Walker I. The present and future role of photodynamic therapy in cancer treatment. **Lancet Oncol.** v.5, p.497-508, 2004.

Bruxel F.; Laux M.; Wild L. B.; Fraga M.; Koester L. S.; Teixeira H. F. Nanoemulsões como sistemas de liberação parenteral de fármacos. **Química Nova**. v. 35, p. 1827-40, 2012.

Bargugli P. A. Estudo dos efeitos da terapia fotodinâmica na progressão tumoral e em modelos celulares tridimensionais. **Tese** (Doutorado em Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010

Casas A.; Di Venosa G.; Vanzulli S.; Perotti C.; Mamome L.; Rodriguez L.; Simian M.; Juarranz A.; Pontiggia O.; Hasan T.; Batlle A. Decreased metastatic phenotype in cells resistant to aminolevulinic acid-photodynamic therapy. **Cancer Letters**. v. 271, p. 342-51, 2008.

Calzavara-Pinton P. G.; Venturini M. Sala R. Photodynamic therapy: update 2006. Part 1: Photochemistry and photobiology. **J. Eur. Acad. Dermatol Venereol.** v. 21, p. 293-302, 2007.

Ciani L.; Ristori S.; Bonechi C.; Rossi .; Martini G. Effect of the preparation procedure on the structural properties of oligonucleotide/cationic liposome complexes (lipoplexes) studied by electron spin resonance and Zeta potential. **Biophys. Chem.** v. 131, p. 80–7, 2007.

Corrêa M. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas **cultivadas**. **Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura**. 1984.

Carvalho R. S. Fototoxicidade de nanoemulsão de extrato de crajiru (*Arrabidaea chica*) em linhagem de células de adenocarcinoma Mamário murino (4T1). **Tese** (Doutorado em Biologia Animal) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília. 2013.

Castano, A.P., Demidova T. N.; Hamblin M.R. Mechanism in photodynamic therapy: Part one-photosensitizers, photochemistry and cellular localization. **Photodiag. Photodynam. Ther.** v. 1, p. 279-93, 2004.

Chen Y.; Yang X.; Zhao L.; Almásy L.; Garamus V. M.; Willumeit R.; Zou A. Preparation and characterization of a nanostructured lipid carrier for a poorly soluble

drug. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**. v. 455, p. 36-43, 2014.

Colditz, G.A.; Wolin, K.Y.; Gehlert, S. Applying what we know to accelerate cancer prevention. **Sci Transl Med**. v. 4, p. 1-9, 2012.

Date A. A.; Nagarsenker M. S.; Design and evaluation of microemulsions for improved parenteral delivery of propofol. **AAPS PharmSciTech**. v. 9, p. 138-45, 2008.

Debeb B. G.; Xu W.; Mok.; Li L.; Robertson.F; Ueno N. T.; Reuben J.; Lucci A.; Cristofanilli M.; Woodward W. A. Differential radiosensitizing effect of valproic acid in differentiation versus self-renewal promoting culture conditions. **Molecular Cancer**. v. 9, p. 1-12, 2010.

Delmas T.; Piraux H.; Couffin A.-C; Texier I.; Vinet F.; Poulin P.; Cates M. E.; Bibette J. How prepare and stabilize very small nanoemulsions. **Langmuir**. v. 27, p. 1683-92, 2011.

DeSantis C.; Siegel R.; Bandi P.; Jemal A. Breast Cancer Statistics. **A Cancer Journal for Clinicians**. v. 61, p. 409-18, 2011.

Detty M. R.; Gibson S. L; Wagner S. J. Current clinical and preclinical photosensitizers for use in photodynamic therapy. **J. Med. Chem**. v. 47, p.3897-915, 2004.

DeVita F.; Orditura M.; Martinelli E.; Vecchione L.; Innocenti R.; Sileni V .C.; Pinto C.; DiMaio M.; Frella A.; Troiani T.; Napolitano V.; Ancona E.; DiMartino N.; Ruol A.; Galizia G.; DelGenio A.; Ciardiello F. A multicenter phase II study of induction chemotherapy with FOLFOX-4 and cetuximab followed by radiation and cetuximab in locally advanced oesophageal cancer. **British Journal of Cancer**. v. 104, p. 427-32, 2011.

Dietrich J.; Bledowski C.; Kaiser J. Neural correlates of chemotherapy-related cognitive impairment. **Cortex**. v. 54, p. 33-50, 2014.

Dougherty D. A. Cation- π interactions in chemistry and biology: A new view of benzene. **Phe. Tyr. and Trp.Science**. v. 271, p.163-8, 1996.

Falleiros J. P. B.; Brandl A. L.; Fonseca A. R. A. Aplicações da nanotecnologia no diagnóstico e tratamento de câncer. **Nucleus**. v. 8, p. 151-69, 2011.

Farokhzad O. C.; Cheng J.; Teply B. A.; Sherifi I.; Jon S.; Kantoff P. W.; Richie J. P. Langer R. Targeted nanoparticle-aptamer bioconjugates for cancer chemotherapy *in vivo*. **CrossMark**. v. 103, p. 6315-20, 2006.

Firczuk M.; Nowis D.; Golab J. PDT-induced inflammatory and host responses. **Phortochemical and Photobiological Sciences**. v.5, p. 653-63, 2011.

Gelderblom H.; Verweij J.; Nooter K.; Sparreboom A. Kolliphor EL: the drawbacks and advantages of vehicle selection for drug formulation. **European Journal of Cancer**. v. 37, p. 1590-8, 2001.

Gianni L.; Bianchini G. The immune system and response to HER2-targeted treatment in breast cancer. **Lancet Oncol**. v.15, p.58-68, 2014.

Graebner I. B.; Mostardeiro M. A.; Ethur E. M.; Burrow R. A.; Dessoy E. C.; Morel A. F. Diterpenoids from *Humirianthera ampla*. **Phytochemistry**. v. 53, p. 955-9, 2000.

Greenberger J. S.; Berhane H.; Shinde A.; Rhieu H. B.; Bernard M.; Wipf P.; Skoda E. M.; Epperly M. W. Can Radiosensitivity associated with defects in RNA repair be overcome by mitochondrial-targeted antioxidant radioprotectors. **Frontiers in Oncology**. v. 4, 2014.

Guarneri V.; Conte P. F. The curability of breast cancer and the treatment of advanced disease. **Eur. J. Nucl. Me. Mol. Imaging**. P.149-61, 2004.

Gupta A. K.; Gupta M. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. **Biomaterials**. v. 18, p.3995-4021, 2005.

Han J.; Chang H.; Giricz O.; Lee G.Y.; Baehner F. L.; Gray J. W.; Bissell M. J.; Kenny P. A.; Parvin B. Molecular predictors of 3d morphogenesis by breast cancer cell lines in 3D culture. **PLOS: Computational Biology**. v. 6, 0. 1-12, 2010.

Hanahan, D.; Weinberg, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v.100, p. 57-70, 2011.

Hirschhaeuser F.; Menne H.; Dittfeld C.; West J.; Mueller-Klieser W.; Kunz-Schughart L. A. Multicellular tumor spheroids: an underestimated tool is catching up again. **Journal Biotechnology**. v. 148, p. 3-15, 2010.

Honary S.; Zahir R. Effect of zeta potential on the properties of nano-drug delivery systems - A review (part 1). **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**. v. 12, p. 255-64, 2013.

Horne T. K.; Abrahamse H.; Cronjé M J. Investigating the efficiency of novel metallo-phthalocyanine PDT-induced cell death in MCF-7 breast cancer cells. **Photodiagnosis and Photodynamica Therapy**. v. 9, p. 215-24, 2012.

Hutchinson E. K.; Pao W. Chipping away at the lung cancer genome. **Nature Medicine**. v. 18, p. 349-51, 2012.

Instituto Nacional De Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). **Estimativa 2014:** incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro (2014).

Ivascu A.; Kubbies M. Diversity of cell-mediated adhesions in breast cancer spheroids. **International Journal Of Oncology**. v. 31, p. 1403-13, 2007.

Jain K.; Kumar R. S.; Sood S.; Gowthamarajan K. Enhanced oral bioavailability of Atorvastatin via oil-in-water nanoemulsion using aqueous titration method. **Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**. v. 5 p. 18-25, 2013.

Jeong H.; Huh M. S.; Lee S. J.; Koo H.; Kwon I. C.; Jeong S.; Kim K. Photosensitizer-conjugated human serum albumin nanoparticles for effective photodynamic therapy. **Theranostics**. v. 1, p. 230-9, 2011.

Kardeh S.; Ashkani-Esfahani S.; Alizadeh A. M. Paradoxical action of reactive oxygen species in creation and therapy of cancer. **Europeaqn :Journal Pharmacology**. v. 735, p. 150-68, 2014.

Kenny P. A.; Lee G. L.; Myers C. A.; Neve R. M.; Semeiks J. R.; Spellman P. T.; Lorenz K.; Lee E. H.; Barcellos-Hoff M. H.; Petersen O. W.; Gray J. W.; Bissell M. J. The morphologies of breast cancer cell lines in three-dimensional assays correlate with their profiles of gene expression. **Mol. Oncol**. v. 1, p. 84-96, 2007.

Kim H. S.; Cho D. H.; Kim H. .; Lee J. Y.; Cho B. K.; Park H. J. Immunoreactivity of corticotropin-releasing hormone, adrenocorticotrophic hormone and alpha-melanocyte-stimulating hormone in alopecia areata. **Exp Dermatol**. v. 15, p. 515–22 , 2006.

Kirshner J.; Schumann D.; Shively J. E. CEACAM1-4S, a cell-cell adhesion molecule, mediates apoptosis and reverts mammary carcinoma cells to a normal morphogenic phenotype in a 3D culture. **PNAS**. v. 100, p. 521-6, 2003.

Kiss A.; Walter F. R.; Bocsik A.; Veszelka S.; Ózsvári B.; Puskás L. G.; Szabo-R évész P.; Deli M. A. Kinetic Analysis of the Toxicity of Pharmaceutical Excipients Kolliphor EL and RH40 on Endothelial and Epithelial Cells. **Journal of Pharmaceutical Sciences**. p. 1-10, 2013.

Krause, S.; Maffini M. V.; Soto A. M.; Sonnenschein C. The microenvironment determines the breast cancer cells phenotype: organization of MCF7 cells in 3D cultures. **BMC Cancer**. v. 10, 2010.

L´Azou B.; Jorly J. On D. *In vitro* effects of nanoparticles on renal cells. **Part. Fibre Toxicol**. v. 5, 2008.

Lee M.S.; Finch W. Mahmud E. Cardiovascular complications of radiotherapy. **Am J. Cardiol**. v.112, p. 1688-96, 2013.

Lee B.; Lee S.; sung J.; Yoon M. Radiotherapy-induced secondary cancer risk for breast cancer: 3D conformal therapy versus IMRT versus VMAT. **Journal of Radiological Protection**. v. 34, p.325, 2014.

Longo J. P. F.; Lozzi S. P.; Simioni P. C.; Tedesco R. B.; Azevedo R. B. Photodynamic therapy with aluminum-chloro-phtalocyanine induces necrosis and vascular damage in mice tongue tumors. **Journal of Phorochemistry and Photobiology B: Biology**. v. 94, p. 143-46, 2009.

Lohmann L.; Ulloa C. Bignoniaceae. **Plants Prototype Checklist**. 2008.

Ma B. C. Eficácia do Alumínio-cloro ftalocianina associado a nanopartículas de poli(vinil metil éter-co-anidrido maleico) ba terapia fotodinâmica contra células tumorais *in vitro*. **Dissertação** (Mestrado em Biologia Animal) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília. 2012.

Macdonald I. J.; Dougherty T. J. Basic principles of photodynamic therapy. **The Journal of Peptide Research**. v. 5, p. 105-29, 2001.

McClements D. J.; Rao J. Food-grade nanoemulsions: formulation, fabrication, properties, performance, biological fate, and potential toxicity. **Crit Rev Food Sci Nutr**. v. 51, p. 285-330, 2011.

Melo L. N. D. Perfil transcricional de células derivadas de carcinoma epidermóide bucal após terapia fotodinâmica mediada por alumínio-cloro-ftalocianina. **Dissertação**(Mestrado em Biologia Animal) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília.

Miller J. D.; Baron E. D.; Scull H.; Hsia A.; Berlin J. C.; McCormick T. *et al*. Photodynamic therapy with the phthalocyanine photosensitizer Pc 4: the case experience with preclinical mechanistic and early clinical-translational studies. **Toxicology and Applied Pharmacology**. v. 224, p. 290-9, 2007.

Mishra P. R.; Al Shaal L.; Müller R.H.; Keck C. M. Production and characterization of Hesperetin nanosuspensions for dermal delivery. **Int. J. Pharm**. v. 37, p.182-89, 2009.

Monge-Fuentes V. Terapia fotodinâmica mediada por fotossensibilizante à base de óleo de açaí em nanoemulsão para o tratamento de melanoma *in vitro* e *in vivo*. **Tese** (Doutorado em Biologia Animal) – Instituto de Biologia, Universidade de Brasília, Brasília. 2011.

Moscana A. The development in vitro of chimeric aggregates of dissociated embryonic chick and mouse cells. **PNAS**. v. 43, p. 184-94, 1957.

Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal Immunol. Methods.** v. 16, p. 55-63, 1983.

Mroz P.; Yaroslavsky A.; Kharkwal G. B.; Hamblin M. R. Cell death pathways in photodynamic therapy of cancer. **Cancers.** v. 3, p. 2516-39, 2011.

Muehlmann L. A. Cloreto de alumínio-ftalocianina associado a nanopartículas de poli(vinil,metil-éter-co-anidrido maleico) como potencial fotossensibilizante de terceira geração Para terapia fotodinâmica antineoplásica .**Tese.** (Doutorado em Ciências da Saúde) – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília. 2011.

Muehlmann L. A.; Joanitti G.A.; Silva J.R.; Longo J.P.F.; Azevedo R.B. Liposomal photosensitizers: potential platforms for anticancer photodynamic therapy. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research.** v. 44, p. 729-37, 2011.

Mueller-Klieser W. F.; Sutherland R. M. Oxygen tensions in multicell spheroids of two cell lines. **British Journal of Cancer.** v. 45, p. 256-64, 1982.

Mussi S. V. Desenvolvimento e avaliação de nanopartículas lipídicas carregadas com doxorubicina e ácido docosahexaenóico para o tratamento do câncer. **Tese** (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal De Minas Gerais, Belo Horizonte.

Natarajan, N.; Thamaraiselvan R. ; Lingaiah, H.; Srinivasan, P.; Periyasamy, B. M. Effect of flavonone hesperidin on the apoptosis or human mammary carcinoma cell line MCF-7. **Biomedicine e Preventive Nutrition.** v.1, p. 207-15.

Nguyen T.; Chen C-J.; Shively J. E. Phosphorylation of CEACAM1 Molecule by Calmodulin Kinase IID in a Three-dimensional Model of Mammary Gland Lumen Formation **Biol. Chem.** v. 289 p. 2934-45, 2014.

Noori S.; Hassan Z. M. Tehranolide inhibits cell proliferation via calmodulin inhibition, PDE, and PKA activation. **Tumor Biol.** v. 35, p. 257-64, 2014.

Nunes S. M.; Sguilla F. S.; Tedesco A. C. Photophysical studies of zinc phthalocyanine and chloroaluminum phthalocyanine incorporated into liposomes in the presence of additives. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research.** v. 37, p. 273-84,2004.

Odunsi K.; Matsuzaki J.; Karbach J.; Neumann A.; Mhaweche-Fauceglia P.; Miller A.; Beck A.; Morrison C. D.; Ritter G.; Godoy H.; Lele S.; DuPont N.; Edwards R.; Shrikant P.; Old L. J.; Gnjatic S.; Jäger E. Efficacy of vaccination with recombinant vaccinia and fowlpox vectors expressing NY-ESO-1 antigen in ovarian cancer and melanoma patients. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** v. 109, p. 5797-802, 2012.

O'Connor C. M.; Whellan D. J.; Lee K. L.; Keteyian S. J.; Cooper L. S.; Ellis S. J.; Leifer E. S.; Kraus W. E.; Kitzman D. W.; Blumenthal J. A.; Rendall D. S.; Miller N. H.; Fleg J. L.; Schulman K. A.; McKelvie R. S.; Zannad F.; Piña I. L. Efficacy and safety of exercise training in patients with chronic heart failure: HF-ACTION randomized controlled trial. **JAMA**. v.14, p. 1439-50, 2009.

Paszko E.; Ehrhardt C.; Senge M.O.; Kelleher D.P.; Reynolds J.V. Nanodrug applications in photodynamic therapy, **Photodiagn. Photodyn.** v. 8, p.14–29, 2011.

Park S-H.; Zarrinpar A.; Lim W. A. Rewiring MAP kinase pathways using alternative scaffold assembly mechanisms. **Science**. v. 299, p. 1061-64, 2003.

Passos A. K.; Souza P. E. N.; Soares P. K. P.; D. R. M.; Primo F. L.; Tedesco A. C.; Lacava Z. G. M.; Morais P. Quantitative approach to skin field cancerization using a nanoencapsulated photodynamic therapy agent: a pilot study. **Clin Cosmet Investig Dermatol**. v. 6, p. 51-9, 2013.

Perche F.; Patel N. R.; Torchilin V. P. Accumulation and toxicity of antibody-targeted doxorubicin-loaded PEG-PE micelles in ovarian cancer cell spheroid model. **Journal Controle Reseale**. v.164, p. 95-102, 2012.

Perche F.; Torchilin V. P. Cancer cell spheroids as a model to evaluate chemotherapy protocols. **Cancer Biol Ther**. v. 13, p. 1205-13, 2012.

Pitot, H. C. Pathway of progression in hepatocarcinogenesis. **Lancet**. v.358, p. 859-60, 2011.

Polom K.; Adamczyk B.; Murawa D.; Murawa P. Breast cancer: Actual methods of treatment and future trends. **Oncology and Radiotherapy**. v. 9, p. 165-72, 2014.

Plaetzer K.; Krammer B.; Berlanda, J.; Berr F.; Kiesslich T. Photophysics and photochemistry of photodynamic therapy: fundamental aspects. **Laser Med. Sci**. v. 24, p. 259-68, 2009.

Radomska-Soukharev A. Stability of lipid excipients in solid lipid nanoparticles. **Adv. Drug Deliv. Rev**. v. 59, p. 411-18, 2007.

Ragelle H.; Crauste-Manciet S.; Seguin J.; Brossard D.; Scherman D.; Arnaud P.; Chabot G. G. Nanoemulsion formulation of fisetin improves bioavailability and antitumour activity in mice. *International Journal of Pharmaceutics*. p. 1-35, 2012

Ramsden J.; Freeman J. This is a provisional upper limit of the nanoscale. More careful considerations suggest that the nanoscale is, in fact, property dependent. **The nanoscale. Nanotechnol Perceptions**. v.5, p.3–26. 2009.

Ramsden J. Nanotechnology-the most interdisciplinary technology. **Leicester's Centre for Interdisciplinary Science**. 2014.

Rosseti F. C.; Lopes L. B.; Carolho A. R. H.; Thomazini J. A.; Tedesco A. C.; Lopes B. B.; Vitoria A. A delivery system to avoid self-aggregation and to improve *in vitro* and *in vivo* skin delivery of a phthalocyanine derivative used in the photodynamic therapy. **Journal Controlled Release**. v. 155, p. 400-8, 2011.

Saberi A. H.; Fang Y.; McClement D, J. Fabrication of vitamin E-enriched nanoemulsions: Factors affecting particle size using spontaneous emulsification. **Journal of Colloid and Interface Science**. v. 391, p. 95-02, 2013.

Setchell K. D.; Cassidy A. Dietary isoflavones: biological effects and relevance to human health. **Journal Nutr**. v. 129, p. 758-67, 1999.

Shaw A. Image and symbol in jonh 21. **The Expository Times**. v. 86, p. 311, 1975.

Silva-Siqueira A.C.; Mangolin J.F.; Siqueira E.E.; Pacheco S. C. Avaliação da citotoxicidade de cloro-alumínio-ftalocianina lipossomal (alpcc1) em células hep-2. **XV INIC**. São Paulo, 2011.

Sood S.; Jain K.; Gowthamarajan K. Optimization of curcumin nanoemulsion for intranasal delivery using design of experimente and its toxicity assessment. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. v. 113, p. 330-37, 2014.

Soule, H.D., Vazquez, J., Long, A., Albert, S. & Brennan, M. A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. **J. Natl Cancer Inst**. v. 51, 1409-16, 1973.

Soukos N. S.; Hamblin M. R.; Hasan T. The effect or charge on cellular uptake and phototoxicity of polylysine chlorin(e6) conjugates. **Photochemistry and Photobiology**. v. 65, p. 723-29, 1997.

Souza C. O. Obtenção de cultura de células 3D em substrato definido. **Dissertação** (Mestrado em Engenharia Biomédica) – Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, 2004.

Spiller W.; Kliesch H.; Wohrele D.; Hackbarth S.; Roder B. Singlet oxygen quantum yields os diferente photosensitizers in polar solvents and micellar solution, **Journal of Porphyrins and Phtalocyanine**. v. 2, p. 145, 1998.

Takemura O. S.; Inuma M.; Tosa H.; Miguel O. G.; Moreira E. A.; Nozawa Y. A flavone from leaves of *Arrabidaea chica* f. *cuprea*. **Phytochemistry**. v. 38, p. 1299-300, 1995.

Torchilin V. P. Targeted pharmaceutical nanorriers for cancer therapy and imaging. **AAPS jornal**. v. 9, p. 128-47, 2007.

- Triesscheijn M.; Baas P.; Schellens J. H.; Stewart F. A. Photodynamic therapy in oncology. **The oncologist**. v. 11 p. 1034-44, 2006.
- Van de Velde C. J.; Boelens P. G.; Borras J. M.; Coebergh J. W.; Cervantes A.; Blomqvist L.; Beets-Tan R. G.; Van den Broek C. B.; Brown G.; Van Cutsem E.; Espin E.; Haustermans K.; Glimelius B.; Iversen L. H.; Van Krieken J. H.; Mariinen A. A.; Henning G.; Gore-Booth J.; Meldolesi E.; Mroczkowski P.; Naqtegaal I.; Naredi P.; Ortiz H.; Pahlman L.; Quirke P.; Rodel C.; Roth A.; Rutten H.; Schmoll H. J.; Smith J. J.; Tanis P. J.; Taylor P. J.; Wibe A.; Wiqqers T.; Gambacorta M. A.; Aristei C. Valentini V. EURECA colorectal: multidisciplinary management: European consensus conference colon e rectum. **Eur. Journal Cancer**. v. 50, 2014.
- Walstra P. Encyclopedia of Emulsion Technology . **P. Becher**. v. 4, p 1, 1996
- Wang K.;Zhang H.;Ma D.;Bucan M.;Glessner J. T.; Abrahams B. S.; Salyakina D.; Imielinski M.; Bradfield J. P.; Sleiman P.M.; Kim C. E.; Hou C.; Frackelton E.; Chiavacci R.; Takahashi N.; Sakurai T.; Rappaport E.; Lajonchere C. M.; Munson J.; Estes A.; Korvatska O.; Piven J.; Sonnenblick L. I.; Alvarez Retuerto A. I.; Herman E. I.; Dong H.; Hutman T.; Sigman M.; Ozonoff S.; Klin A.; Owley T.; Sweeney J. A.; Brune C. W.; Cantor R. M.; Bernier R.; Gilbert J. R.; Cuccaro M. L.; McMahon W. M.; Miller J.; State M. W.;Wassink T. H.; Coon H.; Levy S. E.; Schultz R. T.; Nurnberger J. I.; Haines J. L.; Sutcliffe J. S.; Cook E. H.; Minshew N. J.; Buxbaum J. D.; Dawson G.; Grant S. F.; Geschwind D. H.; Pericak-Vance M. A.; Schellenberg G. D.; Hakonarson H. Common genetic variants on 5p14.1 associate with autism spectrum disorders. **Nature**. v. 459, p. 528-33, 2009.
- Wang M.; Thanou M. Targeting nanoparticles to cancer. **Pharmacological Research**. v. 62, p. 90-9, 2010.
- WHO – World Health Organization. Disponível em: <http://www.who.int/cancer/en/>. Acessado dia 06/06/2014.
- Wöhrle , D.; Hirth, A.; Bogdahn-Rai T.; Schnurpfeil G.; Shopova M. Photodynamic therapy of cancer: second and third generations or photosensitizers. **Russ Chem Bull**. v. 47, p. 807-16, 1998.
- Xiao H.; McClements A. J.; Cao Y.; Fang X.; Song M.; Li.; Zheng J. Improving intracellular uptake of 5-demethyltranylcypresin by food grade nanoemulsions. **Food Research International**. v.62, p. 98-103, 2014.
- Yanot.; Hatogai K.; Morimoto H.; Yoda Y.; Kaneko K. Photodynamic therapy for esophageal cancer. **Photodynamic therapy for esophageal cancer**. v. 2, 2014.
- Yigit M. H.; Moore A.; Medarova Z. Magnetic nanoparticles for cancer diagnosis and therapy. **Pharm. Res**. v. 89, p.1180-88, 2012.

Yoo D.; Lee J. H.; Shin T. H.; Cheon J. Theranostic magnetic nanoparticles. **Acc. Chem. Res.** v. 44, p. 863-74, 2011.

Yoo S. J.; Kim J.; Lee C-S.; Nam Y. Mechanical properties of nylon micro-mesh as a three dimensional cell culture scaffold. *Exp. Neurobiol.* v. 20, p.110-15, 2011.

Yu B.; Fu Y-J.; Duan, M-H.; Sun Y.; Yao x-H.; Wang P.; Zou Y-P.; Ma W-P. Chimaphilin induces apoptosis in human breast cancer MCF-7 cells through a ROS-mediated mitochondrial pathway. **Food and Chemical Toxicology.** v. 20, 1-8; 2014.

Zorn B.; Garcíá -Piñeres A. J.; Castro V.; Murillo R.; Mora G.; Merfort I. 3-Desoxyanthocyanidins from *Arrabidaea chica*. **Phytochemistry.** v. 56, p. 831-5, 2001.

Zhu Q.; Pao G. M.; Huynh A. M.; Suh H.; Tonnu N.; Nederlof P. M.; Gage F. H.; Verma I. M. BRCA1 tumor suppression occurs via heterochromatin-mediated silencing. **Nature.** v. 477, p. 179-84, 2011.