

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MOLECULAR

**CITOTOXICIDADE INDUZIDA POR
NANOEMULSÕES DE SELOL EM CÉLULAS DE
ADENOCARCINOMA DE PULMÃO HUMANO**

MAYARA SIMONELLY COSTA DOS SANTOS

ORIENTADOR: PROF^a. SÔNIA NAIR BÁO

Brasília, 22 de Fevereiro de 2013

**CITOTOXICIDADE INDUZIDA POR NANOEMULSÕES DE
SELOL EM CÉLULAS DE ADENOCARCINOMA DE
PULMÃO HUMANO**

Por

Mayara Simonelly Costa dos Santos

Dissertação de Mestrado apresentada
ao Programa de Pós-Graduação em
Biologia Molecular do Instituto de
Ciências Biológicas da Universidade de
Brasília como parte integrante dos re-
quisitos para a obtenção do título de
Mestre em Biologia Molecular.

“Sem sonhos, a vida não tem brilho. Sem metas, os sonhos não têm alicerces. Sem prioridades, os sonhos não se tornam reais. Sonhe, trace metas, estabeleça prioridades e corra riscos para executar seus sonhos. Melhor é errar por tentar do que errar por omitir!”

Augusto Cury

Agradecimentos

A Deus, pela vida e pelas grandes razões para viver que ele meu deu. Minha família. Meu pai, minha mãe, meu irmão e meu noivo, meus quatro grande amores, pessoas que mais parecem anjos, que me acompanham e partilham de minha caminhada.

Aos meus pais Ribamar dos Santos e Genize Costa dos Santos, meus maiores amores e exemplos, amigos, parceiros, fontes de admiração, força e determinação, pela vida, amor imenso e incondicional, carinho e incontáveis minutos de incentivo e força. Ao papai pelo exemplo de trabalho, esforço, foco e força, mas também pelo exemplo de alegria e doçura. À mamãe, fonte inesgotável de carinho, pelo seu exemplo de mulher, humildade e simplicidade, pela sua doçura infinita, pela dedicação de uma vida a minha educação e pelo seu esforço tamanho em me ver sorrir.

Ao meu irmão, Eduardo Fellipe Costa dos Santos, pessoa incrível, pelo exemplo de amizade incondicional, carinho, atenção e pelo amor e paciência de uma vida a mim dedicados.

À minha avó Dinorá dos Santos Costa, por todos os bons momentos partilhados e lembranças felizes da infância. Pelo exemplo de mulher guerreira, pelo apoio, amor, orações e bênçãos diárias.

À toda a minha família, que tem me apoiado durante todo esse longo caminho.

À minha mestra, Professora Sônia Nair Bão, pelo exemplo de responsabilidade, trabalho e determinação. Agradeço pelos sábios ensinamentos e pela orientação dedicada desses quase seis anos de estrada juntas.

Ao Professor Ricardo Bentes de Azevedo, pelo acolhimento e oportunidade de trabalhar em seu laboratório.

À Ludmilla Regina de Souza David (Flor), pela sua chegada em Brasília. Por promover a descoberta de um novo mundo de perspectivas e possibilidades na pesquisa. Pela imensa ajuda na escrita deste texto. Pelo apoio constante e maternal, pela orientação incansável, a qualquer hora, por telefone, de madrugada, à distância. Pelos ensinamentos de busca constante pelo conhecimento e aperfeiçoamento. Pelo exemplo de esforço,

dedicação e determinação. Pela amizade, carinho e bons momentos partilhados.

Ao Dr. Luis Alexandre Muehlmann pela amizade, ajuda, momentos de descontração e desenvolvimento das nanoemulsões utilizadas neste trabalho.

Aos amigos e colegas do laboratório de Microscopia Eletrônica e do Laboratório de Genética e Morfologia, mas principalmente à Ingrid e Lauro pela amizade, ajuda, conselhos, carinho, pelos momentos agradáveis e de descontração.

À Dona Zélia, por toda sua eficiência e dedicação em proporcionar um ótimo local de trabalho. Também por toda a sua prestatividade, atenção e disposição na hora de ajudar.

À Ana, pela ajuda sempre eficiente, e sorridente, que me prestou na secretaria do Programa de Pós Graduação em Biologia Molecular- UnB.

Aos membros da banca examinadora, Andrea, Ricardo e Marcella pelas valiosas considerações e contribuições ao trabalho e ao texto desta dissertação.

Ao meu grande amor, meu amigo, meu Príncipe, meu noivo e futuro esposo para compartilhar toda uma vida, Pedro Henrique de Oliveira Neto. Você, meu presente mais inesperado, é minha fonte de amor, força, inspiração, humildade e admiração. Obrigada por todos os minutos de carinho, ajuda, paciência e incentivo. Obrigada por toda a ajuda despendida na escrita da dissertação. Sem você esse sonho não seria possível. Agradeço a Deus pela sua existência e pela grande sorte de encontrar você. Obrigada por fazer a minha vida tão maravilhosa de se viver.

Agradeço a todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

À Universidade de Brasília pelo fornecimento da estrutura para a realização deste estudo. À CAPES, ao CNPq, a Finep, a FAP-DF, ao INCT de Nanobiotecnologia e ao National Science Centre na Polônia pelos auxílios concedidos, sem os quais este trabalho não poderia ter sido realizado.

Resumo

As neoplasias de pulmão constituem uma das principais causas de morte por câncer no mundo. São classificadas em dois principais grupos histológicos: carcinoma de pulmão de células pequenas (CPCP) e carcinoma de pulmão de células não-pequenas (CPCNP), sendo o último o principal causador de carcinomas e foco deste trabalho. O tratamento de CPCNP apresenta baixa eficiência e segurança e, deste modo, novos potenciais quimioterápicos estão sendo estudados para melhorar os protocolos terapêuticos. Neste contexto, o selol, um selenitotriacilglicerídeo derivado do óleo da semente de girassol, contendo selênio a nível de oxidação IV, tem mostrado propriedades antioxidantes e anticarcinogênicas, rápida absorção pelo organismo e menor toxicidade cumulativa, quando comparado aos compostos selênicos clássicos. Entretanto, sua alta hidrofobicidade faz necessária a associação dessa droga a um sistema de entrega de drogas. Esse sistema pode ser desenhado para se acumular, passiva ou ativamente no tecido tumoral e interagir fortemente com as células cancerígenas. Isto pode ser alcançado pelo carreamento do selol dentro de nanoestruturas e pelo controle de suas propriedades de superfície, como pela cobertura das nanoestruturas com o copolímero PVM/MA, que possui como principais características a atoxicidade e alta bioadesividade. O presente estudo teve por objetivo o desenvolvimento de nanoemulsões (NEs) de selol, cobertas ou não com o copolímero PVM/MA, a fim de avaliar sua eficácia como sistemas de entrega de drogas e investigar a citotoxicidade dessas nanoemulsões frente células de adenocarcinoma de pulmão humano (linhagem A549) *in vitro*. As nanoemulsões de selol foram estabilizadas pelo tensoativo Cremophor ELP[®] e cobertas ou não com diferentes quantidade do copolímero PVM/MA. As NEs resultantes foram caracterizadas para diâmetro hidrodinâmico, potencial zeta e estabilidade por espalhamento de luz dinâmica. A morfologia das gotículas foi determinada por microscopia eletrônica de transmissão e varredura. A viabilidade das células foi analisada por ensaio colorimétrico (MTT). Os parâmetros de morte celular e fragmentação de DNA foram avaliados por citometria de fluxo. As alterações morfológicas foram analisadas

em microscopia de contraste de fase. As NEs de selol, cobertas ou não com o copolímero PVM/MA, mostraram-se nanossistemas de entrega de drogas estáveis pelo período de até 150 dias após o desenvolvimento das nanogotículas, armazenadas a 25°C e 4°C. As nanogotículas foram citotóxicas e promoveram morte em células A549, apresentando, contudo, menor toxicidade frente as células normais. Todas essas características evidenciam o potencial das NEs de selol de serem utilizadas como agentes quimioterápicos, sozinhas ou em associação com outras drogas, no tratatmento do adenocarcinoma de pulmão humano.

Abstract

Lung cancers are the leading causes of cancer death worldwide. They are classified into two main histological groups: small cell lung cancer and non-small cell lung cancer (NSCLC). NSCLC is the most prevalent and this study focused on its adenocarcinoma subtype. The treatment of NSCLC presents low efficiency and safety and, thus, new potential chemotherapies are being studied in order to improve therapeutical protocols. In this context, selol, a selenium (IV)-containing compound has shown to be an efficient anticancer drug and to be safer than classical selenium compounds. However, its high hydrophobicity makes it necessary to load this drug in a drug delivery system. This drug delivery system may also be designed to accumulate, passively and/or actively, in the tumor tissue and to strongly interact with cancer cells; this can be achieved by loading selol into nanostructures and by controlling its surface properties. Therefore, the aim of the present study was to develop selol nanoemulsions (NEs) as drug delivery systems and test their anticancer efficiency against human pulmonary adenocarcinoma cells (A549 lineage) *in vitro*. Selol nanodroplets were stabilized by the surfactant Cremophor ELP[®] and covered or not with different amounts of the bioadhesive copolymer PVM/MA. The resulting NEs were characterized by size, charge, and stability in dynamic light scattering (DLS) and morphology in transmission (TEM) and scanning electron microscopy. The cells viability was measured by the colorimetric assay (MTT). Parameters of cell death and DNA fragmentation were assessed by flow cytometry and the morphological changes were analyzed in phase contrast microscopy. The selol NEs, uncovered or covered with PVM/MA copolymer, were drug delivery nanosystems stable for up to 150 days after the development of droplet, stored at 4°C and 25°C. The nanodroplets were cytotoxic and promoted death in A549 cells, showing, however, lower toxicity against normal cells. All these features demonstrate the potential of the selol NEs be used as chemotherapeutic agents, alone or in combination with other drugs, in the treatment of human pulmonary adenocarcinoma.

Sumário

Lista de Tabelas	p. xii
Lista de Figuras	p. xiii
1 Introdução	p. 1
1.1 Referencial Teórico	p. 3
1.1.1 Câncer	p. 3
1.1.1.1 Processo de Carcinogênese	p. 4
1.1.2 Câncer de Pulmão	p. 5
1.1.2.1 Estadiamento, Diagnóstico e Tratamento da Doença	p. 7
1.1.2.2 Sobrevida e Estatísticas	p. 9
1.1.3 Nanotecnologia e Sistemas de Entrega de Drogas	p. 10
1.1.4 Nanoemulsões (NEs)	p. 11
1.1.4.1 Métodos de Preparação das NEs	p. 13
1.1.5 Selol e Compostos Selênicos	p. 13
1.1.6 Cremophor [®] ELP	p. 15
1.1.7 Copolímero PVM/MA	p. 16
1.2 Justificativa	p. 18
1.3 Objetivos Gerais	p. 20
1.4 Objetivos Específicos	p. 20

2	Materiais e Métodos	p. 21
2.1	Desenvolvimento das Nanoemulsões (NEs)	p. 21
2.2	Caracterização e Estabilidade das NEs	p. 22
2.3	Morfologia das NEs	p. 23
2.4	Cultura e Manutenção Celular	p. 23
2.5	Tratamentos das Células com NEs	p. 24
2.6	Ensaio de Viabilidade Celular	p. 25
2.7	Alterações na Morfologia Celular	p. 25
2.8	Avaliação dos Padrões de Morte Celular	p. 26
2.9	Fragmentação de DNA e Análise do Ciclo	p. 26
2.10	Análise Estatística	p. 27
3	Resultados	p. 28
3.1	Caracterização e Estabilidade das NEs de Selol	p. 28
3.2	Microscopia Eletrônica de Transmissão	p. 34
3.3	Microscopia Eletrônica de Varredura e EDS	p. 36
3.4	Ensaio de Viabilidade e Citotoxicidade Celular	p. 39
3.5	Eficiência Citotóxica das Nanoemulsões	p. 42
3.6	Avaliação dos Padrões de Morte Celular	p. 43
3.7	Fragmentação de DNA e Ciclo Celular	p. 48
3.8	Alterações Morfológicas	p. 51
4	Discussão	p. 53
5	Conclusão	p. 59

6 Perspectivas

p. 60

Referências

p. 61

Lista de Tabelas

- 1 Estabilidade termodinâmica das NEs P0, P5 e P15.

Lista de Figuras

1	Anatomia do sistema respiratório.	p. 6
2	Estrutura da molécula de selol.	p. 15
3	Estrutura do Copolímero PVM/MA.	p. 17
4	Distribuição de diâmetro hidrodinâmico por intensidade das nanoemulsões P0, P5 e P15 frescas.	p. 29
5	Caracterização morfológica das nanoemulsões frescas (A, C e E) e 120 dias após a formulação (B, D e F) por MET.	p. 35
6	Esquema da nanoemulsão de selol.	p. 36
7	Caracterização morfológica das nanoemulsões frescas por MEV.	p. 37
8	Espectroscopia de energia dispersiva de raio-x das NEs P0, P5 e P15 frescas em MEV.	p. 38
9	Viabilidade celular em fibroblasto e A549 após tratamento com NV (nanopartícula vazia) por 24, 48 e 72h.	p. 40
10	Viabilidade celular em fibroblasto e A549 após tratamento com diferentes concentrações de solução de Cremophor ELP [®] por 24, 48 e 72h.	p. 40
11	Viabilidade celular em fibroblasto e A549 após tratamento com as diferentes concentrações da nanoemulsão P0 por 24, 48 e 72h.	p. 41
12	Viabilidade celular em fibroblasto e A549 após tratamento com as diferentes concentrações da nanoemulsão P5 por 24, 48 e 72h.	p. 41
13	Viabilidade celular em fibroblasto e A549 após tratamento com as diferentes concentrações da nanoemulsão P15 por 24, 48 e 72h.	p. 42

14	Eficiência das NEs de selol na redução da viabilidade das células A549 em 0, 30, 60, 120, 150 e 210 dias após a formulação e armazenamento a 4°C.	p. 43
15	Influência das NEs de selol P0, P5 e P15 (50 µg Se/ml) na permeabilidade da membrana plasmática dos fibroblastos.	p. 45
16	Influência das NEs de selol P0, P5 e P15 (50 µg Se/ml) na permeabilidade da membrana plasmática das células A549.	p. 46
17	Processos de morte celular em fibroblasto e A549 após tratamento com as NEs P0, P5 e P15 (50 µg Se/ml) por 72h.	p. 47
18	Fragmentação de DNA em células A549 tratadas com as NEs P0, P5 e P15 (50 µg Se/ml).	p. 49
19	Fragmentação de DNA em células A549 controle e tratadas com NEs de selol (50 µg Se/ml) por 72h.	p. 50
20	Morfologia de fibroblasto (A, B, C, D) e células A549 (E, F, G, H) após exposição às NEs P0, P5 e P15 a concentração de 50 µg Se/ml por 72h.	p. 52

1 *Introdução*

As neoplasias de pulmão constituem uma das principais causas de morte por câncer no mundo, apresentando um aumento na sua incidência mundial de 2% ao ano (INCA, 2013). São classificadas em dois principais grupos histológicos: carcinoma de pulmão de células pequenas (CPCP) e carcinoma de pulmão de células não pequenas (CPCNP). Nove de dez neoplasias de pulmão são CPCNP (LCNSCO, 2011). Devido a dificuldade no diagnóstico, a maioria dos pacientes é diagnosticada em estágio avançado da doença, e portanto, não são candidatos a tratamentos curativos e sim, apenas paliativos, que têm como opções terapêuticas a quimioterapia, a radioterapia ou ambos (JAMNIK et al., 2009). Atualmente, esses métodos convencionais proporcionam um teto máximo de sobrevivência de 5 anos para o CPCP e CPCNP (ONN et al., 2003). Neste sentido, a busca por novas metodologias e fármacos capazes de promover morte das células cancerígenas e remissão, ainda quando a doença for diagnosticada em estágio avançado, faz-se necessária.

Neste contexto, uma alternativa aos métodos convencionais é a utilização de nanodispositivos como sistemas de entrega de drogas. Estes podem promover liberação controlada e sustentada de fármacos, possibilidade de adsorção de ligantes tumor específicos, redução dos efeitos adversos e da toxicidade sistêmica, como consequência da menor quantidade da droga utilizada e/ou direcionamento dos nanodispositivos para as células-alvo (PATIL & PANYAM, 2009).

O selol, um selenitotriacilglicerídeo derivado do óleo da semente de girassol, tem propriedades antioxidantes e anticarcinogênicas, rápida absorção pelo organismo e baixa toxicidade cumulativa, diferentemente dos compostos selênicos inorgânicos (SUCHOCKI et al., 2010). No entanto, eles requerem a administração de doses elevadas para garantir

uma potente atividade antitumoral (JASTRZEBSKI et al., 1997; SUCHOCKI et al., 2007). A administração do selol em sistemas biológicos em sua forma livre, torna-se inviável, devido a sua alta hidrofobicidade. A emulsificação desse composto, para o desenvolvimento de um sistema de entrega de drogas, que apresentam maior solubilidade em meio aquoso, como por exemplo as nanoemulsões (NEs), possibilitaria sua administração por quaisquer vias de interesse além de garantir entrega do fármaco no sítio de ação.

Sendo assim este estudo teve como objetivo: o desenvolvimento de nanoemulsões (NEs) de selol; a co-adsorção de um copolímero à superfície dessas gotículas; a caracterização das NEs em termos de seus diâmetros hidrodinâmicos (DH), índices de polidispersão (PDI), potenciais zeta (ζ -potencial) e características morfológicas por microscopia eletrônica de transmissão e varredura; o estudo de citotoxicidade frente às células tumorais A549 (adenocarcinoma humano de células epiteliais basais alveolares) por meio de ensaio colorimétrico (MTT); determinação dos parâmetros de morte celular (apoptose e necrose) e análise fragmentação de DNA em citometria de fluxo e, por último a análise das possíveis alterações morfológicas por microscopia de contraste de fase.

1.1 Referencial Teórico

1.1.1 Câncer

Câncer é um grupo de doenças caracterizado pelo crescimento e espalhamento descontrolado de células anormais (CF&F, 2012). Esse comportamento é atribuído a múltiplas alterações na expressão gênica levando a desregulação no balanço de proliferação e morte celular. O câncer evolui para uma população de células capazes de invadir tecidos e provocar metástase em tecidos distantes, causando significativa morbidez e em alguns casos a morte. Essas células alteradas podem se multiplicar e formar nódulos ou massas de tecido, os chamados tumores. O tumor é chamado benigno quando é constituído por células semelhantes as do tecido de origem e quando não há invasão dessas células em tecidos adjacentes. As características que delineiam um câncer maligno de um tumor benigno, são a capacidade de invadir tecidos adjacentes, se espalhar para linfonodos locais, vasos linfáticos e/ou corrente sanguínea e provocar metástase em órgãos distantes do corpo (RUDDON, 2007; INCA, 2013).

O câncer é a principal causa de morte nos países desenvolvidos e a segunda principal causa de morte nos países em desenvolvimento, após as doenças cardiovasculares (CF&F, 2012). Nos Estados Unidos da América (EUA), uma em cada 4 mortes, é devido ao câncer. O câncer é também a segunda principal causa de morte no mundo, ficando atrás apenas das doenças cardiovasculares. Foram estimados 1.638.910 e 518.510 novos casos de câncer em 2012 para os EUA e Brasil, respectivamente (RUDDON, 2007; SIEGEL et al., 2012).

No Brasil, as estimativas de 2012 também são válidas para 2013, portanto, são esperados 257.870 novos casos de câncer para o sexo masculino e 260.640 para o sexo feminino. Os cânceres mais incidentes na população brasileira serão o câncer de pele do tipo não melanoma, tumores de próstata, mama feminina, cólon e reto, pulmão, estômago e colo do útero (INCA, 2012).

Em muitos casos, as causas do câncer não são definidas, mas fatores endógenos — defeitos no sistema imune, hereditariedade, predisposição genética — e exógenos — radiação e substâncias químicas no ambiente — desempenham papéis importantes. Cla-

ramente, o fumo de cigarros é o principal fator causador relacionado com a indução da carcinogênese (RUDDON, 2007).

1.1.1.1 Processo de Carcinogênese

A formação do câncer é um processo lento no qual pode-se levar anos para que uma célula cancerígena prolifere e dê origem a um tumor clinicamente diagnosticável. Os processos que eventualmente levam ao surgimento do tumor são divididos em três etapas: iniciação, promoção e progressão (RUDDON, 2007).

- **Iniciação:** primeiro estágio da carcinogênese, onde as células são expostas aos agentes carcinogênicos que provocam alterações genéticas cumulativas nas células. As células encontram-se “preparadas” para a ação dos agentes oncogênicos promotores da próxima fase. Nesta fase não é possível detectar o tumor clinicamente;
- **Promoção:** sob o efeito dos agentes oncopromotores, as células alteradas tornam-se malignas em processo lento e gradual, que pode levar anos. Tem-se início a expansão clonal dessas células sob a ação dos agentes oncopromotores. Esses agentes podem atuar como mitógenos para a transformação das células. A suspensão desses agentes pode, eventualmente, interromper a transformação das células iniciadas, em malignas. Substâncias presentes nos alimentos, exposição excessiva e prolongada a hormônios, são exemplos de fatores que podem promover essa transformação;
- **Progressão:** neste estágio ocorrem as primeiras manifestações clínicas da doença e torna-se possível o seu diagnóstico. As células malignas se multiplicam de forma descontrolada e irreversível, levando a formação de uma massa tumoral (RUDDON, 2007; INCA, 2013).

O surgimento do câncer está fortemente relacionado a fatores ambientais. E esse depende da intensidade e duração da exposição das células aos agentes carcinogênicos. Os hábitos e o estilo de vida podem determinar as causas dos diferentes tipos de câncer (RUDDON, 2007). O cigarro, por exemplo, é um agente carcinógeno completo, pois possui componentes que atuam nos três estágios da carcinogênese (INCA, 2013).

1.1.2 Câncer de Pulmão

Os pulmões são um par de órgãos esponjosos em formato de cone que encontram-se no interior da cavidade torácica. Eles realizam o processo chamado de respiração, onde o oxigênio é inspirado para os pulmões e passa através da fina membrana dos alvéolos para a corrente sanguínea. O dióxido de carbono, produzido pelas células, é expirado. Os pulmões são divididos em lobos. O pulmão direito possui 3 lobos e o esquerdo somente 2, pois este divide espaço com o coração neste lado do corpo. Dois tubos chamados brônquios levam a traquéia ao pulmão direito e esquerdo. O pulmão é composto por pequenos túbulos e sacos de ar, chamados de bronquíolos e alvéolos, respectivamente (Figura 1). Os pulmões são envolvidos por uma fina membrana chamada pleura, que também reveste internamente a cavidade torácica. O líquido contido na cavidade pleural auxilia na suave movimentação dos pulmões na cavidade torácica durante a respiração. Abaixo dos pulmões, o diafragma, um músculo em forma de cúpula, separa o tórax do abdômen. Pela sua movimentação, para cima e para baixo, o diafragma força a entrada e a saída de ar dos pulmões durante a respiração (LCNSCO, 2011; NCINIH, 2012).

Dentre todos os tipos de câncer, o de pulmão é o principal causador de mortes no mundo e o segundo mais comum em homens e mulheres, seguido do câncer de próstata e mama, respectivamente. Ocorrem mais mortes por câncer de pulmão do que por câncer de mama, próstata e cânceres coloretais combinados. Este carcinoma ocorre comumente em pessoas idosas, sendo que apenas 2% dos casos ocorre em pessoas com idade abaixo dos 45 anos (LCNSCO, 2011; CF&F, 2012). Existem dois principais grupos histológicos de carcinoma de pulmão, o carcinoma de pulmão de células pequenas (CPCP) e o carcinoma de pulmão de células não-pequenas (CPCNP). Esses dois tipos de carcinoma são tratados de formas muito diferentes. Os CPCNP constituem de 85-90% dos cânceres de pulmão. O CPCNP subdivide-se em outros subtipos. As células dos subtipos diferem em tamanho, forma e composição química, mas são agrupadas juntas devido ao tratamento e prognóstico serem semelhantes (LCNSCO, 2011). Os subtipos de CPCNP são:

- Carcinoma de células escamosas (Epidermóide): corresponde de 25-30% dos cânceres de pulmão. Esse câncer tem início nas células escamosas iniciais, que são achatadas e revestem as vias aéreas dos pulmões. Este carcinoma está relacionado ao histórico

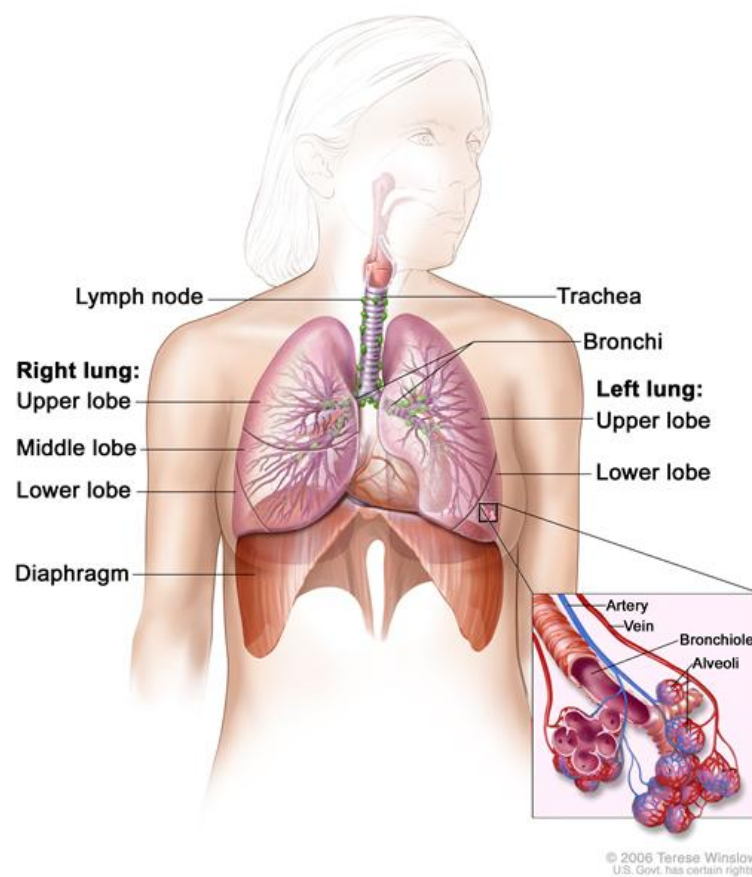


Figura 1: Anatomia do sistema respiratório.

São mostrados a traquéia, os pulmões, seus lobos e as vias aéreas. Observam-se os linfonodos e o diafragma. National Cancer Institute- NCI (NCINIH, 2012).

de fumo e tende a ser encontrado no centro do pulmões, próximo aos brônquios;

- Adenocarcinoma: representa aproximadamente 40% dos cânceres de pulmão. Surge a partir de células que normalmente secretam muco. Pode estar relacionado ao tabagismo, mas é o tipo mais comum em não fumantes. Mais frequente em mulheres do que em homens, podendo ocorrer em pessoas jovens. Geralmente são encontrados na parte externa do pulmão. Tendem a se desenvolver mais devagar, quando comparado aos outros tipos de câncer e o diagnóstico é possível antes de se espalhar pelo órgão. Pacientes que possuam este tipo de adenocarcinoma *in situ* possuem um melhor prognóstico quando comparados a aqueles com os demais tipos de câncer de pulmão;
- Carcinoma de grandes células (indiferenciadas): por volta de 10-15% dos casos. Pode começar em qualquer parte do pulmão. Tende a crescer e a se espalhar rapidamente, sendo o tipo mais difícil de ser tratado. Um subtipo de carcinoma de grandes células chamado de carcinoma neuroendócrino, é um carcinoma de crescimento rápido muito similar ao de pulmão de células pequenas;
- Outros subtipos: Carcinoma adenoescamoso e carcinoma sarcomatóide apresentam menor incidência (LCNSCO, 2011).

1.1.2.1 Estadiamento, Diagnóstico e Tratamento da Doença

O estadiamento descreve no momento do diagnóstico, a extensão e o espalhamento da doença. O correto estadiamento é essencial para a escolha da terapia e avaliação do prognóstico. O estágio no qual o câncer encontra-se é baseado no tamanho do tumor primário e se este se espalhou para outras áreas do corpo. O sistema de estadiamento TNM (tumor, linfonodo e metástase) avalia o tumor de três formas: extensão do tumor primário (T), ausência ou presença de envolvimento de linfonodo (N), e ausência e presença de metástase distante (M). Após a determinação de T, N e M, o estágio I, II, III e IV é atribuído a doença, sendo I o estágio inicial e IV o último e mais avançado estágio da doença (CF&F, 2012).

O tratamento adequado para os diversos tipos de neoplasias depende do tipo, da localização e do estágio clínico da doença. Para o tratamento de cânceres em estágio inicial

a remoção cirúrgica, quando possível, pode aumentar as chances de cura. A radioterapia e quimioterapia — aplicadas separadamente ou em associação — geralmente são utilizadas antes da remoção cirúrgica do tumor, na tentativa de redução do seu tamanho ou como única alternativa no tratamento da doença.

O diagnóstico precoce do câncer de pulmão e a sobrevida são altamente relacionados. Porém, na maioria das vezes, devido a dificuldade para o diagnóstico precoce, a maior parte dos pacientes apresentam estágios III e IV da doença no momento do diagnóstico. Apenas um terço desses pacientes retiram cirurgicamente o tumor. Com isso, o câncer do pulmão permanece como uma doença altamente letal, tendo a razão mortalidade/incidência de, aproximadamente, 86% (INCA, 2012). Sendo assim, para a maioria dos pacientes, os tratamentos não são curativos e sim paliativos, consistindo em: quimioterapia, radioterapia, terapias alvo tais como bevacizumabe (Avastin), cloridrato de erlotinibe (Tarceva), e crizotinibe (Xalkori), ou terapias combinadas, baseado no tipo e estágio do câncer de pulmão. A sobrevida dos pacientes pode ser aumentada com o uso de quimioterapia adjuvante (após a cirurgia) (RUDDON, 2007).

Quimioterapia paliativa baseada em platina é considerada uma terapia padrão para CPCNP em estágio avançado (CUFER et al., 2012). O papel da quimioterapia em CPCNP avançado evoluiu recentemente para uso de rotina de tratamentos de primeira, segunda e terceira linha (JASSEM, 2012). Nestes casos, o tratamento à base de platina é a terapia de primeira linha mais recomendado, no entanto as taxas de resposta são de 20-40% e sobrevida média de 7 a 12 meses, com apenas 5% dos pacientes vivos em 2 anos (PFISTER et al., 2004; WAKELEE & BELANI, 2005; DAS et al., 2009; CUFER et al., 2012). Uma interrupção no tratamento da quimioterapia com platina, para uso de outro tipo de tratamento, após um curso fixo de quimioterapia inicial, prolongou a sobrevivência dos indivíduos (AZZOLI et al., 2011; PAZ-ARES et al., 2012)

Pacientes com CPCNP em estágio avançado geralmente são tratados com quimioterapia, terapias alvo, ou a combinação das duas. A quimioterapia sozinha ou associada à radioterapia é o tratamento escolhido para CPCP. Neste regime, uma grande porcentagem dos pacientes experimenta remissão, embora, frequentemente, o câncer retorne (CF&F, 2012).

A maioria dos tratamentos convencionais utilizados induzem danos tanto às células normais quanto às células tumorais, tal fato gera morte de células saudáveis e toxicidade sistêmica ao organismo. Destes tratamentos resultam inúmeros efeitos adversos tais como fraqueza, diarreia, perda de sensibilidade nas extremidades do corpo, perda/ganho de peso, queda de cabelo e outros pêlos do corpo, feridas na boca, enjôos, vômitos e tontura. Com isso, áreas que visem o desenvolvimento de novas alternativas para o tratamento de neoplasias têm ganhado destaque. O desenvolvimento de sistemas que permitam a entrega específica de agentes antitumorais, reduzindo os efeitos adversos nos tecidos saudáveis e sendo capazes ao mesmo tempo de tratar a neoplasia de forma menos invasiva, é o grande foco da atualidade no que concerne as pesquisas no tratamento contra o câncer (FERRARI, 2005).

1.1.2.2 Sobrevida e Estatísticas

A sobrevida relativa de 1 ano para o câncer de pulmão aumentou de 37% (1975-1979) para 43% (2003-2006), principalmente devido a melhoria das técnicas cirúrgicas e terapias combinadas. Entretanto a taxa de sobrevida de 5 anos, para todos os estágios combinados, é de apenas 16%. A taxa de sobrevida de 5 anos é de 52% quando a doença é diagnosticada em estágio inicial, no entanto, somente 15% dos carcinomas de pulmão são diagnosticados neste estágio. Esta sobrevida para CPCP (6%) é menor do que para CPCNP (17%) (CF&F, 2012). A reincidência de CPCNP e CPCP, é de 14% e 5%, respectivamente (ONN et al., 2003). Inúmeros fatores prognósticos como estadiamento da doença, tipo histológico, marcadores tumorais, entre outros, parecem exercer forte influência no tempo de sobrevida, sendo que uns de maneira mais efetiva que outros (NCINIH, 2012).

Na grande maioria dos casos diagnosticados, o câncer de pulmão está associado ao consumo de derivados do tabaco. Para 2012, no Brasil, estimou-se 27.320 casos de câncer de pulmão, sendo 17.210 homens e 10.110 mulheres (INCA, 2013).

Com a industrialização, no início do século XX, o câncer do pulmão deixou de ser uma doença rara e passou a ser a neoplasia de maior frequência na população mundial e a causa mais importante de morte por câncer no mundo. Cerca de 90% dos casos dessa doença estão relacionados ao consumo de derivados do tabaco. No Brasil, o câncer de

pulmão foi responsável por 20.622 mortes em 2008, sendo o tipo que mais fez vítimas fatais. Altamente letal, a sobrevivência média cumulativa total em cinco anos varia entre 13 e 21% em países desenvolvidos e entre 7 e 10% nos países em desenvolvimento. Existem inúmeros outros fatores de risco para o câncer do pulmão. Como exemplo, temos a exposição a carcinógenos ocupacionais e ambientais como amianto, arsênico, radônio e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. Acredita-se que esse tipo de exposição esteja relacionada a até 10% dos casos de câncer do pulmão nos países industrializados. O desenvolvimento dessa neoplasia também pode estar relacionada a infecções pulmonares, tuberculose, deficiência e excesso de vitaminas (INCA, 2012).

Embora o câncer de pulmão apresente uma alta incidência, ao final do século XX, este tornou-se uma causa de morte evitável. Uma alimentação farta em frutas e vegetais ricos em carotenoides (pigmentos vermelhos e amarelos, com propriedades antioxidantes) tem se mostrado uma grande aliada na proteção contra o desenvolvimento do câncer de pulmão. Ainda assim, o controle do fumo de cigarros é a principal medida para evitar a ocorrência dessa neoplasia (INCA, 2012).

1.1.3 Nanotecnologia e Sistemas de Entrega de Drogas

O sistema de entrega de drogas por meio de nanodispositivos pode proporcionar o reconhecimento de células-alvo específicas. Isto gera a redução da quantidade de droga necessária para causar uma resposta satisfatória e/ou a redução da concentração de drogas em sítios não alvos. Sendo assim os efeitos adversos da terapia podem ser minimizados (PATIL & PANYAM, 2009). Atualmente, uma diversidade de composições antineoplásicas são utilizadas no tratamento do câncer de pulmão como, por exemplo, a cisplatina, doxorubicina, paclitaxel e docetaxel (RAMALINGAM & BELANI, 2013). No entanto, as terapias usuais não têm se mostrado amplamente eficazes, enquanto induzem toxicidade tanto em células tumorais quanto em células normais. Promovendo apenas uma pequena sobrevivência ao paciente e não a cura da neoplasia. Neste sentido, a busca por novos fármacos, assim como, o desenvolvimento de formulações nanotecnológicas crescem como alvo de investigação tecnológica e científica (KIM et al., 2012; WANG et al., 2012).

Com a disponibilidade de novos quimioterápicos, mais efetivos e com melho-

rias nos sistemas de administração — com o uso de nanopartículas —, a quimioterapia apresenta-se como uma das mais importantes modalidades de tratamento (FENG, 2004). Neste contexto, as nanopartículas (NPs) podem proporcionar liberação controlada e sustentada de drogas, além de reduzir efeitos adversos sistêmicos. Isso porque possuem a capacidade de serem direcionadas para células-alvo. Inúmeras modalidades para vetorização de agentes terapêuticos contra o câncer estão disponíveis atualmente, sendo eles os lipossomos, micelas, dendrímeros, nanopartículas poliméricas, nanocápsulas de ouro, nanopartículas superparamagnéticas, nanoemulsões e nanotubos de carbono. Dentro dessa grande variedade de nanossistemas, as nanoemulsões têm apresentado características de importância singular, como biodisponibilização de drogas lipofílicas, alta estabilidade e liberação controlada (FERRARI, 2005; PATIL & PANYAM, 2009; LIU, SOLOMON & ACHILEFU, 2010).

1.1.4 Nanoemulsões (NEs)

Nanoemulsões (NEs) são sistemas coloidais de dois líquidos imiscíveis dispersos em uma fase aquosa ou em uma fase oleosa (SHAH et al., 2010). As NEs podem apresentar tamanho no intervalo de 50 a 200 nm (TADROS et al., 2004) ou de 50 a 1000 nm (SHAH et al., 2010). As NEs podem existir nas formas água em óleo (W-O) e óleo em água (O-W), sendo o núcleo da partícula água ou óleo, respectivamente. As NEs são feitas utilizando tensoativos aprovados para consumo humano e substâncias alimentares comuns que são geralmente reconhecidas como seguras, “Generally Recognized as Safe-GRAS” pela FDA (*Food and Drug Administration*) (SHAH et al., 2010). As micro e nanoemulsões diferem em relação a estabilidade. As NEs são somente cineticamente estáveis, enquanto as microemulsões são também termodinamicamente estáveis. No entanto, quando não aparentam floculação e coalescência, as NEs possuem a vantagem da estabilidade a longo prazo. Isso torna-as únicas e faz com que às vezes sejam referidas como tendo uma estabilidade termodinâmica aproximada. Essa alta estabilidade coloidal das NEs pode ser compreendida a partir de sua estabilização estérica (fazendo-se uso de tensoativos não-iônicos e/ou polímeros). Essa estabilidade é afetada pela razão entre a espessura da camada de tensoativo adsorvida e o raio da gotícula. Para a manutenção da transparência ao longo do tempo, as NEs devem ser adequadamente preparadas e estabilizadas evitando

o efeito “Ostwald ripening”, processo de difusão molecular que ocorre quando o óleo tem uma solubilidade finita em meio contínuo. É importante ressaltar que a distribuição de tamanho das gotículas é controlada durante a formulação das NEs (TADROS et al., 2004). Estes sistemas têm atraído atenção para uso em cosméticos, produtos de cuidados pessoais e área da saúde. Isto deve-se a algumas características particulares, tais como:

1. Devido a pequena massa das gotículas, a força gravitacional tem pouco efeito sobre as mesmas, fazendo com que o movimento Browniano seja suficiente para manter a estabilidade. Assim, não há processos de cremagem ou sedimentação durante o armazenamento;
2. O tamanho nanométrico da gotícula previne a floculação em pequena escala, permitindo que o sistema permaneça disperso sem que haja separação;
3. O pequeno tamanho das gotículas também previne sua coalescência, desde que as gotículas não sejam deformáveis. Assim, as flutuações de superfície são prevenidas. Além disso, a espessura do filme de tensoativo (em relação ao raio da gotícula), previne qualquer desgaste ou ruptura do filme líquido entre gotículas;
4. NEs são adequadas para a entrega de princípios ativos na pele. A grande superfície de contato desse tipo de emulsão permite a rápida penetração e conseqüentemente aumentam a entregas dos ativos;
5. A transparência do sistema, fluidez (quando utilizadas quantidades razoáveis de óleo), bem como a ausência de agentes espessantes, proporcionam um caráter estético agradável e boa sensação na pele;
6. As NEs, ao contrário das microemulsões, necessitam de baixa concentração de tensoativos na formulação;
7. O pequeno tamanho das gotículas permitem que as mesmas se depositem uniformemente em substratos. As baixas tensões superficial e interfacial aumentam a molhabilidade, espalhabilidade e penetração das gotículas;
8. As NEs podem ser aplicadas na entrega de fragâncias, principalmente em produtos de cuidados pessoais onde deseja-se formulações livres de álcool;

9. NEs podem ser aplicadas como substitutas para lipossomas e vesículas (as quais são menos estáveis). Em alguns casos é possível a construção de fases cristalinas líquidas lamelares ao redor das gotículas da NEs (TADROS et al., 2004).

1.1.4.1 Métodos de Preparação das NEs

Alguns métodos podem ser aplicados para a preparação de NEs (cobrindo a faixa de tamanho da gotícula de raio de 50-200 nm), são eles: (I) homogeneização a alta pressão (auxiliada pela escolha apropriada de agente tensoativos e co-tensoativos), (II) método de emulsificação de baixa energia em temperatura constante ou a aplicação do conceito de temperatura de inversão de fase (PIT) (TADROS et al., 2004). Essas emulsões são facilmente produzidas em grandes quantidades pela mistura de uma fase óleo imiscível a água em uma fase aquosa com alto estresse em um processo de extrusão mecânica disponível em todo o mundo (SHAH et al., 2010).

1.1.5 Selol e Compostos Selênicos

O papel do selênio(Se) como agente antioxidante e antitumoral tem sido bem documentado na literatura (HIRAOKA et al., 2001; WEI et al., 2001; TAPIERO et al., 2003; GHOSH, 2004). Uma pesquisa recente mostrou que mais de 50% dos pacientes com câncer de pulmão que receberam radioterapia, utilizavam medicinas complementares e alternativas, sendo que 12% deles reportaram o uso de selênio especificamente (FRITZ et al., 2011). O selênio é um oligoelemento (elemento que encontra-se em baixa concentração no organismo) essencial para animais e humanos. O seu papel biológico foi estabelecido após a descoberta de que o selênio é um componente estrutural do centro ativo de muitas enzimas (SUCHOCKI, JAKONIUK & FITAK, 2003).

O selênio participa em sistemas antioxidantes humanos como selenocisteína (SeCys) incorporado a várias selenoproteínas. Existem pelo menos 25 selenoproteínas conhecidas em humanos, incluindo a glutathiona peroxidase, tioredoxina redutase, iodotironina deiodinase, e selenoproteínas P, W, e R. As enzimas glutathiona peroxidase e selenoproteína P, juntas contam até 80% do selênio no plasma sanguíneo. Estas enzimas protegem as células de danos por radicais livres, regulam a transcrição de DNA e a proliferação celular. Os

sistemas de glutathione e tioredoxina em particular, têm sido considerados as principais vias através das quais o selênio exerce o seu potencial efeito quimiopreventivo. Novas investigações também sugerem inibição do crescimento celular, atividade pró-apoptótica dos selenometabólitos em células pré-malignas. O selênio também está envolvido na função da tireóide, na imunidade das células T, espermatogênese, e é um antagonista competitivo de metais pesados potencialmente carcinogênicos, tais como arsênio e cádmio (FRITZ et al., 2011). O selênio é considerado importante para a proteção contra o câncer e também para o metabolismo de proteção contra o estresse oxidativo, especialmente em doenças do músculo cardíaco (SUCHOCKI, JAKONIUK & FITAK, 2003). Além disso, foi comprovado que concentrações ideais de selênio podem restaurar a sensibilidade de células malignas resistentes a citostáticos para agentes quimioterápicos (SUCHOCKI et al., 2007).

Compostos selênicos contendo Se a nível de oxidação +4, possuem maior atividade como agente antioxidante e antitumoral (SUCHOCKI et al., 2010). A atividade anticarcinogênica dos compostos selênicos está relacionada a sua ação pró-oxidante (DRAKE et al., 2006). Selenitotriacilglicerídeos são um novo grupo de compostos semi-sintéticos contendo Se (+4). O selol é uma mistura de selenitotriacilglicerídeos sintetizados a partir da esterificação do óleo da semente de girassol com ácido selenioso (Figura 2) (JASTRZEBSKI et al., 1995, 1997). Compostos de diferente estrutura e grau de atividade podem ser obtidos dependendo da concentração de selênio utilizada na preparação. Concentrações de selol entre 2-20% foram produzidas, o que significa que 1 ml de selol contém entre 20-200 mg de Se (IV). A estrutura selol foi determinada por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (NMR) 1H e ^{13}C (SUCHOCKI, JAKONIUK & FITAK, 2003). Por conter o elemento selênio (Se) em sua estrutura, sugere-se que ele apresente atividade quimiopreventiva e antitumoral (JASTRZEBSKI et al., 1995).

A farmacocinética e toxicidade do selol foram estabelecidas. O selol sofre rápida reabsorção a partir do sistema digestório e devido a sua propriedade lipofílica, é altamente distribuído por todo o corpo, atravessando facilmente a barreira hemato encefálica. Há indícios de que ele seja metabolizado no fígado e excretado pelos rins. Sendo completamente eliminado do organismo, pela urina, 24h após a administração (STANCZYK et al., 2010). Estudos de toxicidade dose-única feitos em ratos, mostram que a dose letal (DL_{50}) do selol 2% foi de 100 mg Se/kg de massa corporal após a administração oral. Enquanto

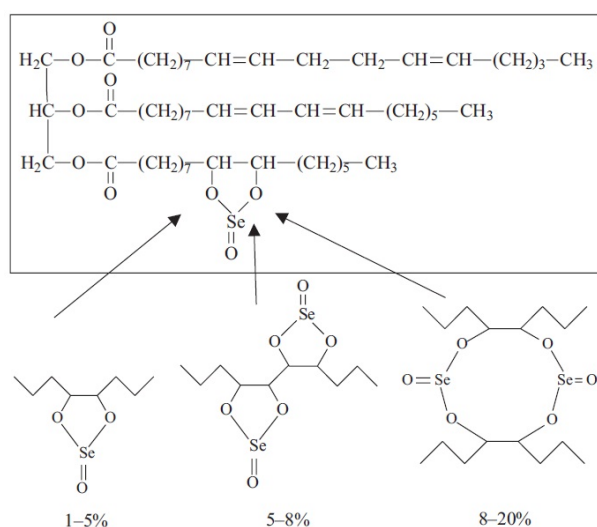


Figura 2: Estrutura da molécula de selol.

O selol (Octadeca-9,11-dienoic acid 1-[7-(5-non-3-enyl-2-oxo-2 λ^4 - [1, 3, 2] dioxaselenolan-4-yl)-heptanoyloxymethyl]-2-octadeca -9, 13-dienoyloxy -ethyl ester), quadro em destaque, dependendo do conteúdo de Se (IV), como resultado da dimerização, possui várias estruturas como indicado pelas setas. Estruturas baseadas nos estudos de espectroscopia de ressonância magnética nuclear (NMR) 1H e ^{13}C (SUCHOCKI et al., 2010).

para selol 10% este valor foi de 68 mg Se/kg de massa corporal (JASTRZEBSKI et al., 1995). O selol 2% é 30 vezes menos tóxico do que o selenito de sódio (IV) (DL_{50} de 3 mg/kg de massa corporal), o composto inorgânico contendo Se (IV). Isso faz com que o selol possa ser administrado em doses muito mais elevadas, o que levaria a uma atividade antitumoral mais potente (SUCHOCKI et al., 2007; STANCZYK et al., 2010). A administração subcutânea e intraperitoneal apresentam toxicidade extremamente baixa (JASTRZEBSKI et al., 1997). O teste Ames realizado em *Salmonella typhimurium* demonstrou ausência de atividade mutagênica (STANCZYK et al., 2010).

1.1.6 Cremophor $ELP^{\text{®}}$

O Cremophor $ELP^{\text{®}}$, marca de uma gama de detergentes não iônicos polietoxilados, é um surfactante composto de óleo de castor polietoxilado. Ele tem sido utilizado comercialmente para preparo de emulsões óleo e água, sendo capaz de produzir emulsões estáveis de biomoléculas hidrofóbicas farmacologicamente ativas. Foi desenvolvido para uso como solubilizante e emulsificante para preparações orais, tópicas e parenterais. O

seu principal componente é o glicerol-poli(etilenoglicol) ricinoleato, o qual, juntamente com os ésteres de ácidos graxos do poli(etilenoglicol), representa a parte hidrofóbica do produto. A parte hidrofílica é composta de poli(etileno) e glicerol etoxilado (BASF, 2012). O uso do surfactante não iônico, anfifílico, é importante para que haja a incorporação do selol na partícula. A porção hidrofóbica do surfactante liga-se ao selol e a hidrofílica se mantém em contato com o meio hidrossolúvel, propiciando a formação de nanogotículas estáveis e com menor agregação.

1.1.7 Copolímero PVM/MA

Durante as últimas décadas, tem sido investigados vários tipos de sistemas de entrega de drogas locais nos quais são empregados inúmeros biomateriais poliméricos. Sistemas de entrega de drogas locais bioadesivos baseados em materiais mucoadesivos têm recebido significativa atenção devido a capacidade de aumentar o tempo de permanência no sítio de administração (LI & LEE, 2010). Microesferas de polianidrido apresentaram alta afinidade por mucosa nasal e intestinal (JIANG & ZHU, 2002; LI et al., 2005). Os polianidridos com ligações anidrido na cadeia principal do polímero são de natureza extremamente hidrofóbica e com características de erosão da superfície. Apesar do grande interesse nesse tipo de polianidrido, as pobres propriedades mecânicas devida a rápida degradação hidrolítica das ligações anidrido ligadas a cadeia principal limitaram essa classe de polímeros para a aplicação de entrega de drogas a curto prazo. Entretanto, em uma outra classe de polianidridos, as ligações anidrido se apresentam como uma cadeia lateral cíclica e não como parte da cadeia principal do polímero, com isso não se observa redução do peso molecular do polímero mesmo após a quebra hidrolítica dos grupos anidrido. O uso desse tipo de polímero torna-se mais adequado para aplicações onde a degradabilidade do mesmo não seja essencial (LI & LEE, 2010).

O copolímero PVM/MA (Poli (metil eter vinil-co-anidrido maleico)) apresenta biodegradabilidade, biocompatibilidade, liberação sustentada e segurança, não apresentando toxicidade frente às células (TADROS et al., 2004; SHAH et al., 2010). A propriedade mais interessante desse copolímero é a sua alta bioadesividade (capacidade de interagir fortemente com células e/ou tecidos biológicos). Quando os polianidridos da molécula de PVM/MA são degradados hidroliticamente, o produto de cada anidrido contém dois gru-

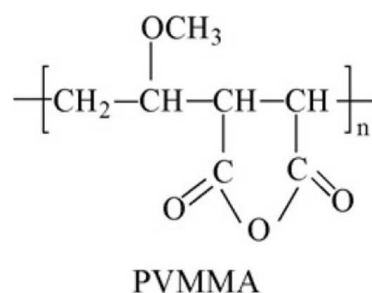


Figura 3: Estrutura do Copolímero PVM/MA.

pamentos ácido carboxílicos (COOH^-) que aumentam a capacidade do polímero formar ligações de hidrogênio com componentes da membrana plasmática das células (ARBÓS et al., 2002). Ou seja, o copolímero promove um maior tempo de permanência das nanoemulsões com as células, interferindo diretamente na sua eficiência de ação (Figura 3).

Baseando-se nas afirmações anteriores, sugere-se um produto tecnológico como alternativa para a reposição de selênio na dieta e tratamento de neoplasias. Este produto seria uma nanoemulsão constituída de selol, tensoativo Cremophor ELP[®] e o copolímero PVM/MA.

1.2 Justificativa

O carcinoma de pulmão de células não pequenas (CPCNP) representa grande parte dos carcinomas de pulmão e sua alta incidência constitui grave problema de saúde pública mundial. A alta agressividade dessa neoplasia, associada ao elevado índice de diagnóstico tardio, fazem com que doses elevadas de agentes terapêuticos sejam administradas nos pacientes sem finalidade curativa, e sim, apenas paliativa (JAMNIK et al., 2009; INCA, 2012). A carência de métodos terapêuticos mais eficazes em promover a remissão da neoplasia, aumento da sobrevida do paciente e eventualmente a cura, suscita a busca de novas modalidades quimioterápicas. O selol é um composto organoselênico que se destaca por menor toxicidade cumulativa, quando comparado com os compostos selênicos inorgânicos, e alto potencial antitumoral e quimiopreventivo (JASTRZEBSKI et al., 1997; SUCHOCKI et al., 2007). No entanto, na intenção de contornar sua alta hidrofobicidade, faz-se necessário o seu carregamento em um nanossistema de entrega de drogas. A emulsificação desse composto, daria origem a nanoemulsões. As quais pode ou não ser adsorvido o copolímero PVM/MA em sua superfície para a formação de NEs poliméricas que eventualmente representariam uma importante terapia para o câncer de pulmão.

As nanoemulsões, diferentemente do selol em sua forma livre, poderão ter maior interação e fluidez pelos sistemas biológicos, podendo também se movimentar por vasos de menor calibre e interstício tumoral. O Cremophor ELP[®], tensoativo não iônico, é um componente de elevada importância quanto a capacidade de modular o tamanho das nanoemulsões. Possibilitando assim, que essas gotículas de tamanho nanométrico sejam mais interiorizadas pelas células tumorais. O copolímero PVM/MA terá o papel de se co-adsorver à superfície das NEs, conferindo maior estabilidade, além de aumentar o tempo de contato das mesmas com as células, em razão da sua alta bioadesividade (LI & LEE, 2010).

Atualmente existem poucos estudos que abordem aspectos morfológicos e ultraestruturais decorrentes da utilização do selol como agente antitumoral e quimiopreventivo, bem como do seu uso na forma de NEs. Um melhor entendimento sobre a ação das NEs de selol na viabilidade das células A549 poderá beneficiar os portadores de carcinoma de pulmão de células não pequenas como uma nova modalidade terapêutica na forma de

sistema de entrega de drogas.

1.3 Objetivos Gerais

O presente trabalho tem como objetivo o desenvolvimento de nanoemulsões de selol, estabilizadas com tensoativo Cremophor ELP[®] e cobertas com o copolímero PVM/MA. Estudar a citotoxicidade das NEs de selol, revestidas ou não por cobertura polimérica de PVM/MA, frente às células não tumorais e da linhagem A549 (adenocarcinoma humano de células epiteliais basais alveolares) *in vitro*.

1.4 Objetivos Específicos

- Proceder o desenvolvimento e a caracterização das nanoemulsões de selol, estabilizadas com Cremophor ELP[®] e cobertas ou não com o copolímero PVM/MA;
- Avaliar a estabilidade termodinâmica das NEs de selol mediante diferentes temperaturas de armazenamento;
- Avaliar a possível citotoxicidade das NEs de selol em células normais (fibroblasto) e em linhagem de adenocarcinoma de pulmão humano (A549);
- Avaliar a eficiência da redução da viabilidade celular das NEs de selol a longo prazo;
- Avaliar possíveis processos de morte celular, desencadeados pelas NEs, e seus mecanismos (apoptose e necrose);
- Avaliar a possível ocorrência de fragmentação do DNA celular e as possíveis alterações no ciclo celular das células tratadas;
- Avaliar as possíveis alterações morfológicas advindas do tratamento com as NEs de selol nas células estudadas.

2 *Materiais e Métodos*

2.1 Desenvolvimento das Nanoemulsões (NEs)

O selol (5% de Selênio) foi fornecido pelo *Department of Drugs Analysis da Warsaw Medical University (Warsaw, Poland)* e produzido de acordo com a patente (FITAK et al., 1999). As NEs foram obtidas pelo método da emulsificação espontânea por adição de água. O procedimento foi realizado pelo Dr. Luis Alexandre Muehlmann no Laboratório de Nanobiotecnologia - Instituto de Ciências Biológicas - UnB. Foram dissolvidos 100 mg de selol, 200 mg de tensoativo Cremophor[®]ELP e 0, 5 ou 15 mg do copolímero PVM/MA em 5 ml de solvente orgânico acetona. Em seguida, adicionou-se, sob agitação magnética intensa, 10 ml de etanol e 10 ml de água ultra-pura. Neste momento foram formadas as nanoemulsões. O etanol e acetona utilizados foram de grau analítico. Os solventes orgânicos da suspensão foram removidos por destilação sob pressão reduzida (100 mbar, à 45 °C) no evaporador rotativo Rotavapor RII (Buchi, Switzerland). Adicionou-se água ultra-pura à suspensão obtida até o volume de 10 ml. Alíquotas das NEs foram armazenadas a temperatura ambiente (25 °C), refrigeradas a 4 °C, congeladas a -20 °C e submetidas a ciclos de congelamento/descongelamento.

Foram preparadas NEs com diferentes quantidades de copolímero em sua composição, sendo elas:

- NE P0 - nanoemulsão constituída de selol e Cremophor ELP[®] (ausência de PVM/MA).
- NE P5- nanoemulsão constituída de selol, Cremophor ELP[®] e 5 mg/ml de PVM/MA.
- NE P15- nanoemulsão constituída de selol, Cremophor ELP[®] e 15 mg/ml de PVM/MA.

As formulações diferem somente quanto a quantidade do copolímero PVM/MA utilizado, sendo que as quantidades de selol e Cremophor ELP[®] são constantes nas três formulações.

2.2 Caracterização e Estabilidade das NEs

As nanoemulsões foram caracterizadas em termos de seus diâmetros hidrodinâmicos (DH), índices de polidispersão (PdI), morfologia e potenciais zeta (ζ -potencial). O PdI é uma medida da distribuição de tamanho derivada da análise cumulativa de Espalhamento de Luz Dinâmica (Dynamic light scattering - DLS). O PdI descreve a qualidade da dispersão. Valores de PdI iguais ou menores que 0,1 descrevem medidas aceitáveis e suspensões de boa qualidade, para valores próximos de 1 têm-se suspensões de baixa qualidade, quer para tamanhos de gotículas fora da gama coloidal ou com polidispersão elevada (ANTON et al., 2008). O potencial zeta é o potencial elétrico no “plano de corte”, o qual é definido como a distância da superfície da gota, abaixo do qual os contra-íons permanecem fortemente ligado a gota quando esta move-se em um campo elétrico. Neste sentido essa grandeza é a melhor representação das características elétricas de uma emulsão (MCCLEMENTS et al., 2007).

O DH e o PdI foram determinados por espectroscopia de correlação de fótons e anemometria laser Doppler eletroforética, respectivamente, utilizando Zetasizer[®] NanoZS (Malvern Instruments, Malvern, UK). As medições foram realizadas a 25 °C e ângulo de dispersão fixo de 90 °, após diluição das NEs em solução tampão fosfato (PBS, pH=7,4) a concentração de 1%. O índice de polidispersão foi calculado pelo programa do equipamento a partir das medidas de DLS. O ζ -potencial foi determinada pelo modo eletroforético do aparelho supracitado. As amostras foram colocadas em célula eletroforética (ângulo de dispersão 90° e temperatura de 25 °C). Os valores potenciais foram calculados como a média dos valores da mobilidade eletroforética utilizando a Equação de Smoluchowski e o laser foi operado a 633 nm. Os DH, PdI e (ζ -potencial) foram medidos para todas as NEs nos períodos de 0, 7, 15, 30, 45, 60, 90, 120 e 150 dias. As medições foram realizadas para as condições de armazenamento: temperatura ambiente (25 °C), refrigeradas a 4 °C, congeladas a -20 °C (as NEs eram descongeladas apenas no

dia da medição) e submetidas a ciclos de congelamento/descongelamento (as NEs eram descongeladas no dia da medição, retornavam ao congelador e tornavam a serem medidas no próximo período). Todas as medidas foram realizadas em triplicata.

2.3 Morfologia das NEs

A morfologia das NEs foi avaliada por microscopia eletrônica de transmissão (MET), em microscópio eletrônico JEOL JEM-1011 (JEOL). As NEs frescas foram diluídas em água ultrapura a concentração de 5%. Posteriormente, 3 μl da solução foram transferidas para telas de cobre de 300 “mesh” (malhas), cobertas com o filme Formvar[®] 0,4%. Para fixação e contrastação do material, foram utilizados 20 μl de tetróxido de ósmio (1%) colocados diretamente em placa de petri fechada e no escuro, juntamente com as telas, por 20 minutos. As NEs foram analisadas em MET a 100 kV. As imagens foram processadas em câmera UltraScan[®] conectada ao programa Digital Micrograph 3.6.5[®] (Gatan, USA). A forma e a morfologia da superfície das NEs também foram investigadas em microscopia eletrônica de varredura (MEV) em microscópio eletrônico JEOL JSM-700 1F (JEOL). As NEs frescas foram diluídas em água ultrapura a concentração de 5%, 40 μl da solução foram colocados em “stubs”, suportes de latão, previamente limpos com acetona. Para fixação e contraste do material, foram utilizados 40 μl de tetróxido de ósmio (1%) colocados diretamente em placa de petri fechada e no escuro, juntamente com os stubs, por 1 hora. Após 24h, as amostras foram metalizadas com ouro em Balzers SCD 050[®] Sputter Coater (Balzers Union AG, Liechtenstein) e observadas em MEV com câmera UltraScan[®] conectada ao programa Digital Micrograph 3.6.5[®] (Gatan, USA). Para a espectroscopia de energia dispersiva de raios-X (EDS) as medidas foram realizadas em MEV na configuração “Point-and-Shoot” com voltagem de 15 keV.

2.4 Cultura e Manutenção Celular

Cultura primária de células de tecido conjuntivo (fibroblastos) foram utilizadas como controle as células normais. Os fibroblastos foram colhidos a partir de polpa dentária de dentes normais, e gentilmente cedidas pelo Laboratório de Nanobiotecnologia da Uni-

versidade de Brasília, Brasil. As células A549 (adenocarcinoma humano de células epiteliais basais alveolares) foram compradas da American Type Culture Collection, ATCC, USA ¹.

As células fibroblasto e A549, armazenadas em nitrogênio líquido no Laboratório de Genética e Morfologia — UnB, foram descongeladas uma semana antes do experimento e aclimatadas em frascos de 25 cm² (TPP, USA). Fibroblasto foi cultivado em meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) e A549 em uma mistura (1:1) de DMEM e DMEM HAN'S F12, suplementados com 1% de solução antibiótica (100 unidades/ml de penicilina e 100 mg/ml estreptomicina) e 20% de soro fetal bovino (SFB) em incubadora úmida à 37 °C com 5% de CO₂ e 80% de umidade. Após a aclimação das células, elas foram transferidas para frascos de 75 cm² (TPP,USA) e cultivadas em meios de cultura suplementados com 1% de de solução antibiótica e 10% de SFB em incubadora úmida nas condições supracitadas.

A densidade celular foi determinada pela exclusão com azul de tripan, utilizando a câmara de Neubauer para contagem. Aliquotas de 1 × 10³ células/ml de fibroblasto e A549 foram plaqueadas em placas de poliestireno de 96 poços (TPP, USA). As células foram incubadas por 24h à 37 °C, 5% de CO₂ e 80% de umidade antes do tratamento com as NEs.

2.5 Tratamentos das Células com NEs

Foram preparadas soluções das NEs P0, P5 e P15 em meio DMEM e DMEM HAN'S F12, suplementados com 10% de SFB, nas concentrações de 25, 50 e 100 µg de selênio/ml. Após o preparo das soluções, as mesmas tiveram o pH ajustado para o pH fisiológico (7,2) com ácido clorídrico 1 M (HCl) e hidróxido de sódio 1M (NaOH). Foram realizados tratamentos adicionais para verificar eventual citotoxicidade do copolímero PVM/MA e do tensoativo Cremophor ELP[®]. Para isso foi desenvolvida uma nanopartícula composta somente pelo copolímero PVM/MA (NV- nanopartícula vazia), utilizada somente na concentração de 150 µg/ml. Para o ensaio com tensoativo Cremophor

¹A A549 é amplamente usada como modelo *in vitro* para epitélio pulmonar do tipo II para o metabolismo de drogas e transfecção (JASTRZEBSKI et al., 1995, 1997).

ELP[®], o mesmo foi utilizado diluído em água nas concentrações de 6,25; 12,5; 25; 50; 100 e 200 $\mu\text{g/ml}$, concentrações essas que correspondem as concentrações de 3,1; 6,25; 12,5; 25; 50; 100 μg de selênio/ml das nanoemulsões. Os tratamentos foram realizados 24h após o plaqueamento para permitir a adesão das células as placas. Cada tratamento foi realizado em triplicata. O meio de cultura original das placas foi removido e as células incubadas com 200 μl das soluções contendo as NEs, as NVs e o Cremophor ELP[®]. As células foram mantidas em incubadora úmida à 37 °C com 5% de CO_2 e 80% de umidade pelos períodos de 24, 48 e 72h. Para analisar a atividade biológica das NEs P0, P5 e P15 armazenadas à 4 °C a longo prazo, a viabilidade da célula A549 foi avaliada nos tempos 0, 30, 60, 120, 150 e 210 dias após o desenvolvimento das nanogotículas.

2.6 Ensaio de Viabilidade Celular

Para determinação da viabilidade celular, 5×10^3 células normais e tumorais, foram plaqueadas em placas de 96 poços e tratadas como descrito acima. Posteriormente, as células foram incubadas com 150 μl de solução de meio de cultura contendo brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT) (5 mg/ml em 0,15 M de PBS, pH 7,4) por duas horas e meia em incubadora úmida. Removida a solução, foram adicionados 200 μl de dimetilsulfóxido para solubilização dos cristais de formazano, formados somente pelas células viáveis. A absorbância foi determinada em espectrofotômetro (SpectraMax M2, Molecular Devices, USA) utilizando comprimento de onda de 595 nm, com o auxílio do programa SoftMax Pro (Molecular Devices). Para cada amostra, a viabilidade celular foi calculada a partir de dados de três poços ($n=3$) e expressa como porcentagem, comparada com as células do controle de 24h. Os resultados finais foram mostrados como médias de três experimentos independentes.

2.7 Alterações na Morfologia Celular

A morfologia celular foi analisada com microscópio de contraste de fase (Zeiss, Germany) utilizando o programa AxioVision[®] (Zeiss, Germany).

2.8 Avaliação dos Padrões de Morte Celular

As mortes celulares por apoptose e necrose, resultantes da exposição da fosfatidilserina e a perda da integridade da membrana plasmática, respectivamente, foram avaliadas com kit duplamente marcado com anexina-V conjugada a FITC e iodeto de propídio (PI). As células foram lavadas com tampão PBS, centrifugadas e ressuspensas em 100 μl de tampão de ligação contendo 10 mM HEPES/NaOH (pH 7,4), 140 mM NaCl and 2.5 mM CaCl_2 . Em seguida, foram adicionados 5 μl de anexina-V/FITC e 10 μl de PI (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) as células por 15 min, no escuro, e a temperatura ambiente. As células foram então analisadas em citômetro de fluxo CyFlow[®] Space (Partec, Germany) e foram contados 10.000 eventos por amostra. As células não tratadas e não incubadas com fluoróforos, foram utilizadas como controles e controles negativos. Células tratadas com 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de selenito de sódio por 24, 48 e 72 h foram utilizadas como células positivamente marcadas para anexina-V. Células mortas por aquecimento à 60 °C por 5 min foram utilizadas como células positivamente marcadas para PI. Os dados foram analisados com o auxílio do programa WindowsTM Flow Max[®].

2.9 Fragmentação de DNA e Análise do Ciclo

O ciclo celular foi avaliado pela quantificação do DNA total. Células A549 controle e tratadas foram desadheridas dos poços, lavadas com PBS, centrifugadas e fixadas com etanol 70% por 2h a 4 °C. Em seguida, as células foram lavada com PBS, incubadas com 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de RNase A por 30 min em estufa a 37 °C e marcadas com 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de PI por 30 min e a temperatura ambiente. Foram contados 10.000 eventos por amostra em citômetro de fluxo CyFlow[®] Space (Partec, Germany). Somente as células que apresentaram conteúdo de DNA na faixa de 2n-4n foram consideradas na análise do ciclo celular. O DNA fragmentado foi identificado em populações Sub-G1 (conteúdo de DNA < 2n) e calculado considerando a totalidade dos eventos. As representações dos histogramas foram obtidas no programa WindowsTM FlowMax[®].

2.10 Análise Estatística

Todos os dados foram analisados em programa Graphpad Prism 5.0 e submetidos a testes específicos com confiança estatística de 95%. Os dados foram analisados pelo Anova two ways, com pós-testes Tukey ou Bonferroni.

3 *Resultados*

3.1 **Caracterização e Estabilidade das NEs de Selol**

Observou-se por meio da análise de espalhamento de luz dinâmica das NEs de selol que o método de emulsificação espontânea produziu NEs com uma única população de gotículas monodispersas ($PdI < 0,25$) e com diâmetros hidrodinâmicos similares. As NEs P0, P5 e P15 apresentaram DH de $290,6 \text{ nm} \pm 10,1$; $257,2 \text{ nm} \pm 2,0$ e $267,3 \text{ nm} \pm 2,1$, respectivamente. Os índices de polidispersão das gotículas foram de $0,132 \pm 0,092$ (NE P0); $0,098 \pm 0,010$ (NE P5) e $0,093 \pm 0,011$ (NE P15). Os valores de potencial foram de $-1,0 \text{ mV} \pm 0,4$ (NE P0); $-9,5 \text{ mV} \pm 0,8$ (NE P5) e $-19,9 \text{ mV} \pm 0,7$ (NE P15), e mostraram-se bastante diversos entre as nanoemulsões ($p < 0,05$).

A distribuição de DH por intensidade das NEs apresentou variação de acordo com a quantidade de copolímero PVM/MA que as compunha. A NE P0, apresentou gotículas com valores de DH entre $141,8\text{-}615,1 \text{ nm}$ (Figura 4A). Na NE P5 houve uma pequena variação do DH médio das gotículas entre $122,4\text{-}615,1 \text{ nm}$ (Figura 4B). Por último, a NE P15 apresentou valores de DH entre $122,4\text{-}615,1 \text{ nm}$ (Figura 4C). A adição do copolímero PVM/MA às preparações foi acompanhado do aumento do PdI e do ζ -potencial das NEs, tabela 1.

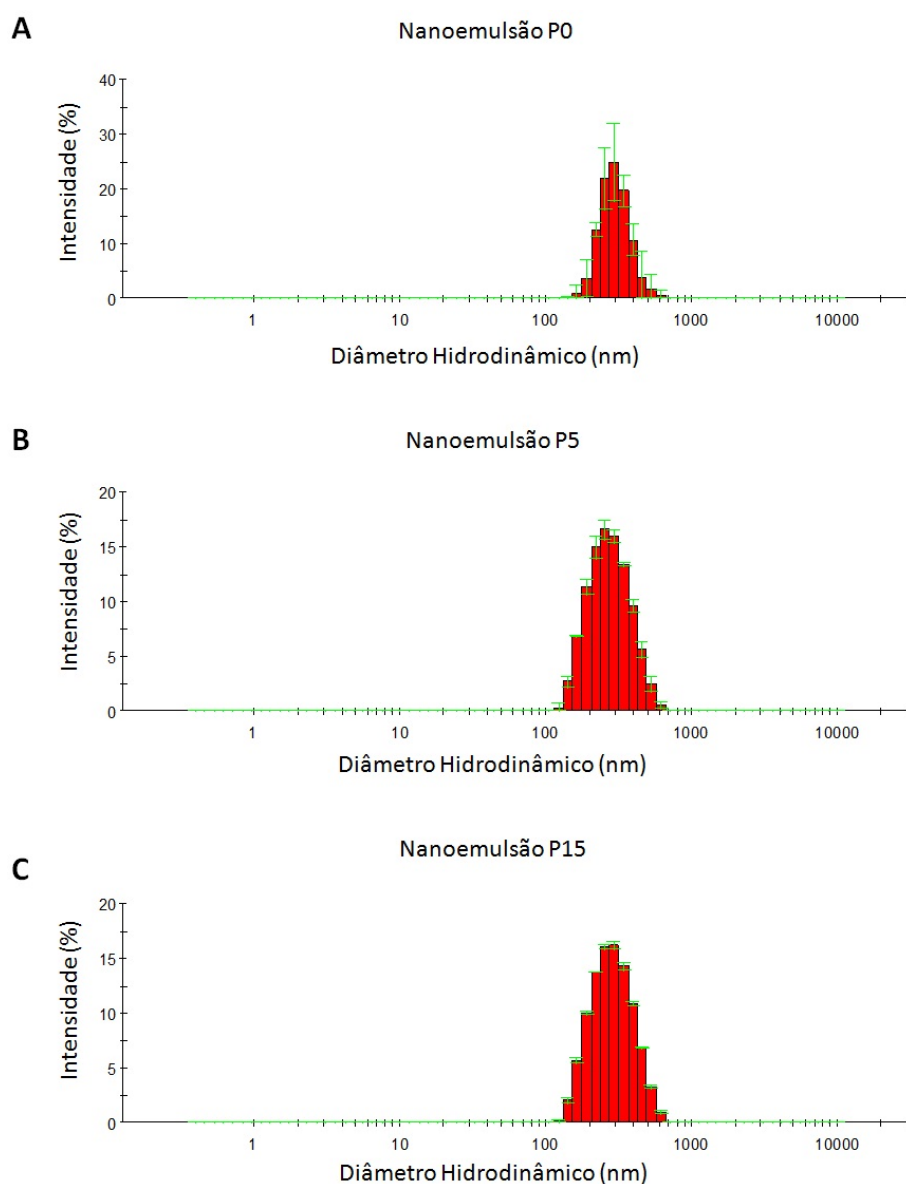


Figura 4: Distribuição de diâmetro hidrodinâmico por intensidade das nanoemulsões P0, P5 e P15 frescas.

A. NE P0, monodispersa e com DH de $290,6 \text{ nm} \pm 10,1$. **B.** NE P5, monodispersa e com DH de $257,2 \text{ nm} \pm 2,0$. **C.** NE P15, monodispersa e com DH de $267,3 \text{ nm} \pm 2,1$. NE P0= nanoemulsão com selol e Cremophor ELP[®], NE P5= nanoemulsão com selol, Cremophor ELP[®] e 5 mg/ml PVM/MA e NE P15= nanoemulsão com selol, Cremophor ELP[®] e 15 mg/ml PVM/MA. Dados representam média e desvio padrão, n=3.

As NEs se mostraram isotrópicas, dispersas em solução aquosa, não havendo qualquer indício de precipitação ou floculação, quando armazenadas em temperatura a 4 °C e a 25 °C . As gotículas mantiveram as suas propriedades como DH, PdI e ζ -potencial estáveis, quando armazenadas em temperatura ambiente (25 °C) e refrigerador (4 °C) pelo período de até 150 dias (Tabela 2)($p>0,05$). Sob a temperatura de -20 °C e estresse térmico, durante os ciclos de congelamento/descongelamento (ciclo, CL), as NEs apresentaram visíveis alterações em seus DH. Essas alterações refletiram, conseqüentemente, em seus PdI, sendo suficientes para promoverem as NEs a condição de polidispersão (PdI $>0,25$). No entanto, a NE P0 manteve-se sem floculação, sem alterações significativas no DH e no PdI, além de não terem sido observadas subpopulações de gotículas com diferentes DH ($p>0,05$). Para as outras NEs, desde o primeiro congelamento ou ciclo, foi observada floculação, ou seja, mudança no padrão de dispersão das gotículas. No entanto, houve a constante manutenção do ζ -potencial das NEs mesmo quando armazenadas sob as temperaturas anteriormente mencionadas ($p>0,05$), tabela 1. Devido ao ciclo de congelamento/descongelamento as NEs P0, P5 e P15 alcançaram DH de 330,8 nm \pm 7,5; 831,7 nm \pm 102,5 e 2.561,7 nm \pm 700,2 , respectivamente. Para as NEs que foram mantidas congeladas, as alterações no DH foram ainda mais expressivas, sendo que a NE P0 foi a que menos apresentou alterações com DH de 290,6 nm \pm 10,1 ($p>0,05$). Já a NE P5 e NE P15 alcançaram DH de 1.673 nm \pm 140,9 e 14.244,3 nm \pm 7.547,8, respectivamente, tabela 1.

Tabela 1: Estabilidade termodinâmica das NEs P0, P5 e P15.

NEs		P0			P5			P15		
Tempo		DH $\pm DP$	PdI $\pm DP$	Zeta $\pm DP$	DH $\pm DP$	PdI $\pm DP$	Zeta $\pm DP$	DH $\pm DP$	PdI $\pm DP$	Zeta $\pm DP$
25°C	0d	290,6 \pm 10,1	0,132 \pm 0,092	-1,0 \pm 0,4	257,2 \pm 2,0	0,098 \pm 0,010	-9,5 \pm 0,8	267,3 \pm 2,1	0,093 \pm 0,011	-19,9 \pm 0,7
	7d	266,8 \pm 5,2	0,077 \pm 0,013	-1,9 \pm 0,8	251,9 \pm 6,5	0,058 \pm 0,015	-5,8 \pm 1,7	248,3 \pm 2,4	0,081 \pm 0,018	-23,0 \pm 1,4
	15d	259,2 \pm 2,4	0,075 \pm 0,027	-1,5 \pm 0,5	250,9 \pm 3,3	0,071 \pm 0,040	-5,7 \pm 1,4	247,6 \pm 5,1	0,084 \pm 0,013	-19,6 \pm 1,3
	30d	265,3 \pm 1,8	0,063 \pm 0,025	-1,6 \pm 0,5	250,2 \pm 1,6	0,072 \pm 0,010	-5,8 \pm 0,9	246,6 \pm 1,8	0,040 \pm 0,025	-22,7 \pm 1,2
	45d	265,7 \pm 4,6	0,093 \pm 0,014	-2,6 \pm 1,0	257,2 \pm 2,4	0,041 \pm 0,045	-6,5 \pm 0,8	247,4 \pm 3,3	0,056 \pm 0,037	-21,5 \pm 0,7
	60d	262,0 \pm 1,8	0,078 \pm 0,050	-2,3 \pm 0,4	257,3 \pm 3,0	0,065 \pm 0,030	-5,8 \pm 0,6	247,6 \pm 3,5	0,067 \pm 0,034	-20,1 \pm 1,2
	75d	263,2 \pm 3,2	0,076 \pm 0,032	-2,4 \pm 1,0	254,7 \pm 2,5	0,063 \pm 0,031	-5,7 \pm 0,5	247,3 \pm 2,4	0,062 \pm 0,012	-20,8 \pm 0,9
	90d	266,0 \pm 0,3	0,075 \pm 0,031	-2,3 \pm 0,6	253,4 \pm 2,0	0,065 \pm 0,087	-5,3 \pm 0,6	247,0 \pm 2,5	0,082 \pm 0,026	-19,3 \pm 1,8
	120d	263,4 \pm 2,3	0,082 \pm 0,010	-2,9 \pm 0,3	270,0 \pm 2,0	0,100 \pm 0,049	-6,8 \pm 0,7	266,0 \pm 2,9	0,092 \pm 0,016	-21,6 \pm 0,7
	150d	258,7 \pm 3,5	0,064 \pm 0,008	-3,1 \pm 1,8	247,2 \pm 11,2	0,049 \pm 0,038	-6,6 \pm 0,9	243,3 \pm 5,4	0,048 \pm 0,008	-22,8 \pm 1,3
4°C	0d	290,6 \pm 10,1	0,132 \pm 0,092	-1,0 \pm 0,4	257,2 \pm 2,0	0,098 \pm 0,010	-9,5 \pm 0,8	267,3 \pm 2,1	0,093 \pm 0,011	-19,9 \pm 0,7
	7d	265,3 \pm 5,6	0,078 \pm 0,037	-1,3 \pm 0,8	255,7 \pm 1,9	0,098 \pm 0,016	-6,0 \pm 0,9	258,2 \pm 2,8	0,101 \pm 0,026	-22,4 \pm 1,2
	15d	266,6 \pm 2,2	0,066 \pm 0,052	-1,9 \pm 0,3	258,0 \pm 4,5	0,065 \pm 0,010	-5,8 \pm 0,6	258,5 \pm 2,8	0,059 \pm 0,016	-20,0 \pm 0,9
	30d	267,7 \pm 3,1	0,050 \pm 0,015	-1,8 \pm 0,7	256,0 \pm 4,3	0,052 \pm 0,054	-6,4 \pm 0,1	252,7 \pm 2,4	0,079 \pm 0,066	-20,6 \pm 0,6

NEs		P0			P5			P15		
Tempo		DH $\pm DP$	PdI $\pm DP$	Zeta $\pm DP$	DH $\pm DP$	PdI $\pm DP$	Zeta $\pm DP$	DH $\pm DP$	PdI $\pm DP$	Zeta $\pm DP$
4°C	45d	267,2 \pm 8,3	0,087 \pm 0,069	-1,6 \pm 0,8	258,0 \pm 1,3	0,070 \pm 0,057	-5,4 \pm 1,5	250,5 \pm 2,6	0,067 \pm 0,033	-18,6 \pm 1,9
	60d	257,4 \pm 8,0	0,113 \pm 0,033	-1,9 \pm 0,8	256,7 \pm 1,5	0,078 \pm 0,018	-6,1 \pm 1,2	251,4 \pm 3,0	0,071 \pm 0,047	-20,2 \pm 0,9
	75d	267,2 \pm 6,2	0,076 \pm 0,031	-2,4 \pm 1,0	257,7 \pm 2,5	0,073 \pm 0,031	-6,3 \pm 0,5	253,3 \pm 1,4	0,060 \pm 0,012	-20,7 \pm 0,9
	90d	266,3 \pm 6,4	0,104 \pm 0,040	-2,6 \pm 0,4	251,5 \pm 1,7	0,091 \pm 0,024	-5,7 \pm 0,6	246,8 \pm 5,4	0,106 \pm 0,035	-18,2 \pm 1,5
	120d	266,4 \pm 2,7	0,075 \pm 0,042	-1,6 \pm 1,0	257,7 \pm 3,2	0,091 \pm 0,013	-5,5 \pm 0,3	249,2 \pm 3,0	0,079 \pm 0,024	-18,1 \pm 1,6
	150d	267,7 \pm 14,4	0,070 \pm 0,052	-2,4 \pm 1,0	281,9 \pm 2,7	0,095 \pm 0,020	-6,3 \pm 0,7	282,7 \pm 4,5	0,083 \pm 0,052	-19,4 \pm 0,2
CL	0	290,6 \pm 10,1	0,131 \pm 0,092	-1,0 \pm 0,4	257,2 \pm 2,0	0,098 \pm 0,010	-9,5 \pm 0,8	267,3 \pm 2,1	0,093 \pm 0,011	-19,9 \pm 0,7
	1°	291,7 \pm 3,0	0,137 \pm 0,034	-3,8 \pm 0,5	515,9 \pm 18,0	0,341 \pm 0,068	-9,0 \pm 0,6	2561,7 \pm 700,2	0,922 \pm 0,134	-21,3 \pm 1,0
	2°	267,6 \pm 11,4	0,080 \pm 0,048	-1,7 \pm 0,4	645,5 \pm 53,3	0,591 \pm 0,082	-12,0 \pm 0,4	2244,7 \pm 1442,0	1,000 \pm 0,000	-21,6 \pm 0,7
	3°	298,5 \pm 1,7	0,174 \pm 0,035	-2,5 \pm 0,7	448,8 \pm 14,2	0,458 \pm 0,095	-8,4 \pm 1,0	1369,8 \pm 397,0	1,000 \pm 0,000	-18,9 \pm 0,5
	4°	267,2 \pm 3,0	0,206 \pm 0,024	-2,3 \pm 1,2	831,7 \pm 102,5	0,782 \pm 0,046	-10,4 \pm 0,6	1433,2 \pm 1071,6	0,998 \pm 0,004	-20,1 \pm 0,8
	5°	330,8 \pm 7,5	0,286 \pm 0,050	-2,0 \pm 1,0	497,0 \pm 31,3	0,688 \pm 0,170	-10,0 \pm 0,5	376,4 \pm 64,5	0,869 \pm 0,098	-18,1 \pm 2,1
	6°	302,7 \pm 9,5	0,300 \pm 0,046	-1,1 \pm 0,8	610,9 \pm 49,0	0,763 \pm 0,078	-9,6 \pm 0,9	515,2 \pm 400,6	0,817 \pm 0,159	-18,1 \pm 1,3
	7°	329,7 \pm 5,2	0,268 \pm 0,055	-1,6 \pm 0,6	458,3 \pm 16,4	0,680 \pm 0,084	-9,1 \pm 0,3	658,7 \pm 321,6	0,863 \pm 0,121	-12,0 \pm 1,7
	8°	198,1 \pm 2,6	0,281 \pm 0,012	-2,2 \pm 0,8	368,4 \pm 9,0	0,385 \pm 0,056	-8,5 \pm 1,0	682,2 \pm 65,0	0,799 \pm 0,081	-16,6 \pm 1,8

NEs		P0			P5			P15		
Tempo		DH $\pm DP$	PdI $\pm DP$	Zeta $\pm DP$	DH $\pm DP$	PdI $\pm DP$	Zeta $\pm DP$	DH $\pm DP$	PdI $\pm DP$	Zeta $\pm DP$
	9°	253,1 \pm 1,0	0,187 \pm 0,027	-2,5 \pm 0,5	307,3 \pm 17,1	0,516 \pm 0,042	-8,9 \pm 0,1	646,5 \pm 172,3	0,865 \pm 0,127	-16,8 \pm 0,5
-20°C	0d	290,6 \pm 10,1	0,132 \pm 0,092	-1,0 \pm 0,4	257,2 \pm 2,0	0,098 \pm 0,010	-9,5 \pm 0,8	267,3 \pm 2,1	0,093 \pm 0,011	-19,9 \pm 0,7
	7d	266,5 \pm 1,7	0,091 \pm 0,009	-1,8 \pm 1,1	1673,0 \pm 140,9	0,478 \pm 0,008	-13,1 \pm 1,1	2897,7 \pm 176,4	0,518 \pm 0,061	-22,4 \pm 1,1
	15d	263,4 \pm 3,6	0,103 \pm 0,023	-2,2 \pm 1,7	1454,3 \pm 82,0	1,000 \pm 0,000	-13,3 \pm 0,9	12071,0 \pm 4689,2	0,782 \pm 0,141	-22,9 \pm 0,9
	30d	264,1 \pm 3,7	0,067 \pm 0,031	-2,0 \pm 0,9	1072,7 \pm 54,2	0,681 \pm 0,131	-12,2 \pm 0,3	14244,3 \pm 7547,8	0,455 \pm 0,175	-22,3 \pm 1,5
	45d	268,9 \pm 1,4	0,045 \pm 0,021	-1,5 \pm 0,5	1375,0 \pm 146,2	0,959 \pm 0,070	-12,0 \pm 1,0	4952,0 \pm 446,1	0,812 \pm 0,188	-22,4 \pm 1,2
	60d	268,2 \pm 6,0	0,083 \pm 0,009	-2,2 \pm 0,8	1003,0 \pm 250,0	0,921 \pm 0,137	-9,9 \pm 1,5	7684,3 \pm 6429,9	0,904 \pm 0,166	-15,8 \pm 3,9
	75d	268,6 \pm 0,7	0,100 \pm 0,036	-1,2 \pm 0,3	646,4 \pm 217,0	0,805 \pm 0,160	-12,2 \pm 0,7	2931,7 \pm 685,4	1,000 \pm 0,000	-20,5 \pm 1,3
	90d	272,2 \pm 3,6	0,085 \pm 0,017	-1,9 \pm 0,8	1284,6 \pm 555,6	0,974 \pm 0,045	-12,3 \pm 0,7	423,8 \pm 365,0	0,788 \pm 0,183	-18,3 \pm 2,7
	120d	268,8 \pm 2,8	0,075 \pm 0,023	-3,0 \pm 0,9	1189,4 \pm 999,7	0,858 \pm 0,123	-12,4 \pm 4,4	3269,7 \pm 1819,9	1,000 \pm 0,000	-19,4 \pm 1,0
	150d	260,5 \pm 9,3	0,067 \pm 0,031	-1,2 \pm 0,7	566,3 \pm 316,2	0,941 \pm 0,102	-12,5 \pm 0,4	138,0 \pm 81,6	0,623 \pm 0,151	-20,6 \pm 2,0

3.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão

As NEs P0, P5 e P15 apresentaram formato arredondado e aparente núcleo eletrôn denso, devido a afinidade do tetróxido de ósmio por lipídeos, no caso o selol, que encontra-se no núcleo, “core”, da partícula (Figura 5).

A NE P0, constituída somente de selol e Cremophor ELP[®], possui características distintas das demais NEs por possuir núcleo eletrôn denso envolto por fina camada e cor clara (Figura 5A e B). Em contraste, as NEs P5 e P15, que contêm o copolímero PVM/MA, apresentam uma espessa camada na cor cinza envolvendo o núcleo eletrôn denso de selol e cor mais escura, devido a afinidade do tetróxido de ósmio pelo copolímero (Figuras 5C e E). Por fim, pôde-se confirmar a estrutura hipotética das nanoemulsões: um núcleo de selol envolto por tensoativo e camada de copolímero co-adsorvido (Figura 6).

As NEs foram caracterizadas morfológicamente 120 dias após a formulação. Além de apresentarem alterações significativas ($p < 0,05$), ainda que pouco expressivas, no DH e PdI (tabela 1), as gotículas apresentaram alterações ultraestruturais em sua morfologia. A NE P0 não apresentou núcleo eletrôn denso, somente sua fina membrana característica (Figura 5B). As NEs P5 e P15 apresentaram alterações morfológicas e aparente redução em suas camadas poliméricas (Figura 5D e F).

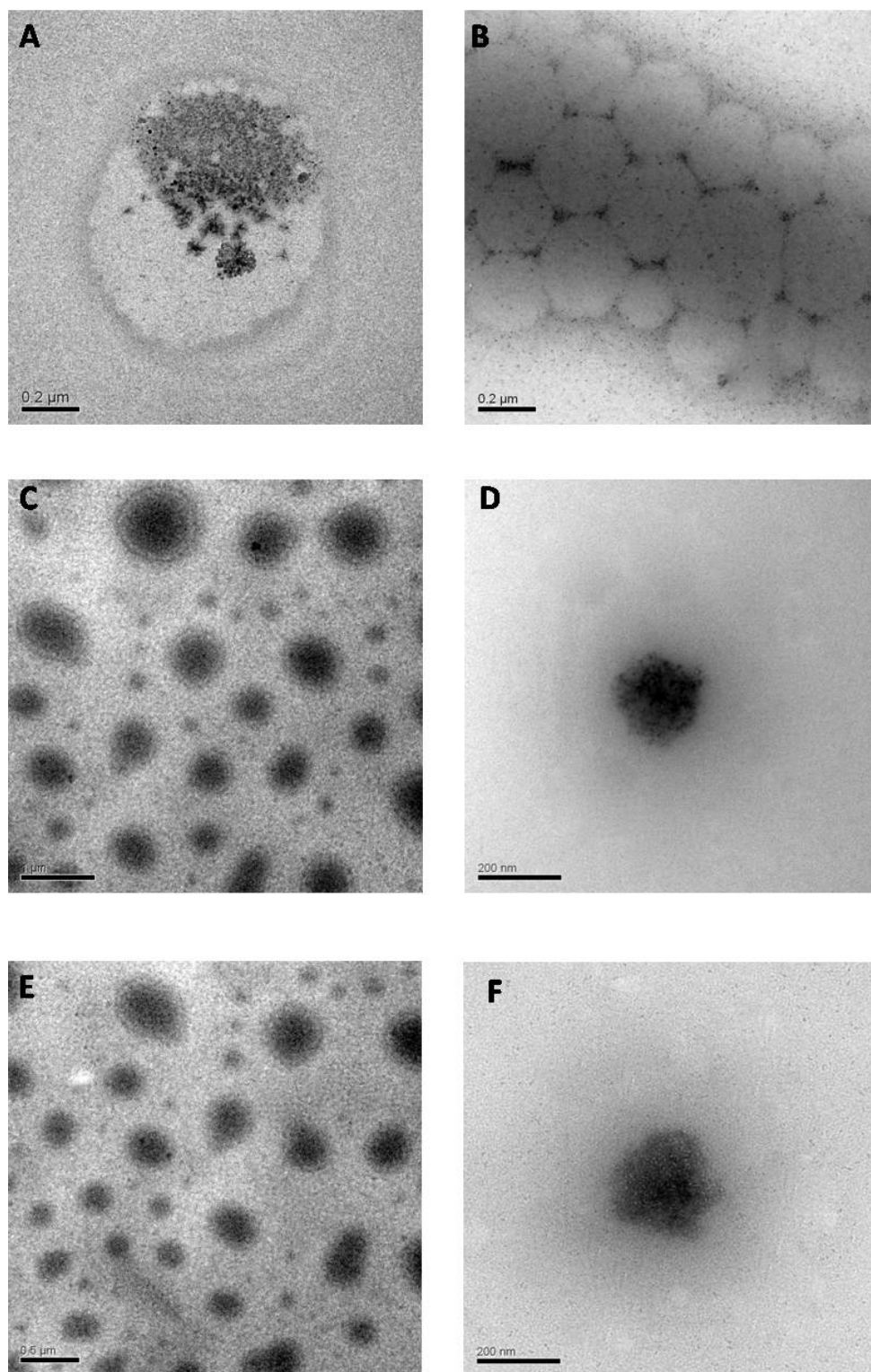


Figura 5: Caracterização morfológica das nanoemulsões frescas (A, C e E) e 120 dias após a formulação (B, D e F) por MET. Nanogotículas contrastadas com vapor de ósmio (1%) apresentando formato arredondado. A e B.NE P0, 100.000x. C e D.NE P5, 40.000x e 150.000x e E e F.NE P15, 40.000x e 150.000x.

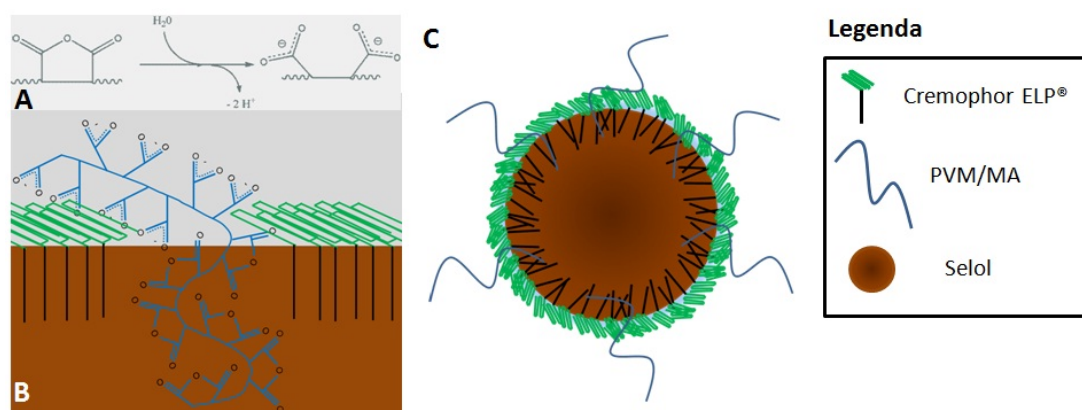


Figura 6: **Esquema da nanoemulsão de selol.**

Representação esquemática de nanogotículas de selol estabilizadas por tensoativo Cremophor ELP[®] e moléculas de PVM/MA parcialmente hidrolisadas. **A.** A hidrólise dos grupos anidrido origina dois grupos carboxilato (pH neutro) na cadeia do PVM/MA; **B.** Essa reação ocorre em partes da cadeia do polímero exposta a água, mas não no PVM/MA imerso no selol; **C.** Como partes do PVM/MA que contém carboxilato são hidrofílicas e partes que contém anidrido são hidrofóbicas, o PVM/MA parcialmente hidrolisado torna-se anfílico e funciona como um surfactante nas nanogotículas de selol.

3.3 Microscopia Eletrônica de Varredura e EDS

As imagens obtidas no MEV das NEs frescas mostraram o perfil esférico das nanogotículas e suas superfícies rugosas (Figura 7).

A espectroscopia de energia dispersiva de raios-X possibilitou a detecção do elemento selênio (Se) em todas as amostras. Em todas as medições com as NEs P0, P5 e P15, pôde-se observar apenas um pequeno pico do elemento selênio nas amostras (Figura 8). Na NE P0 (Figura 8A) a maior parte da amostra foi tida como constituída de ouro (Au= 55,53%) e somente 0,75% de Se. A NE P5 também apresentou alta percentagem de Au (50,12%) e apenas 0,66% de Se (Figura 8B). A NE P15 também apresentou o mesmo padrão de porcentagem, 54,98% de Au e apenas 0,68% de Se (Figura 8C). Todas as análises foram feitas no aumento de 20.000x e voltagem de 15 keV.

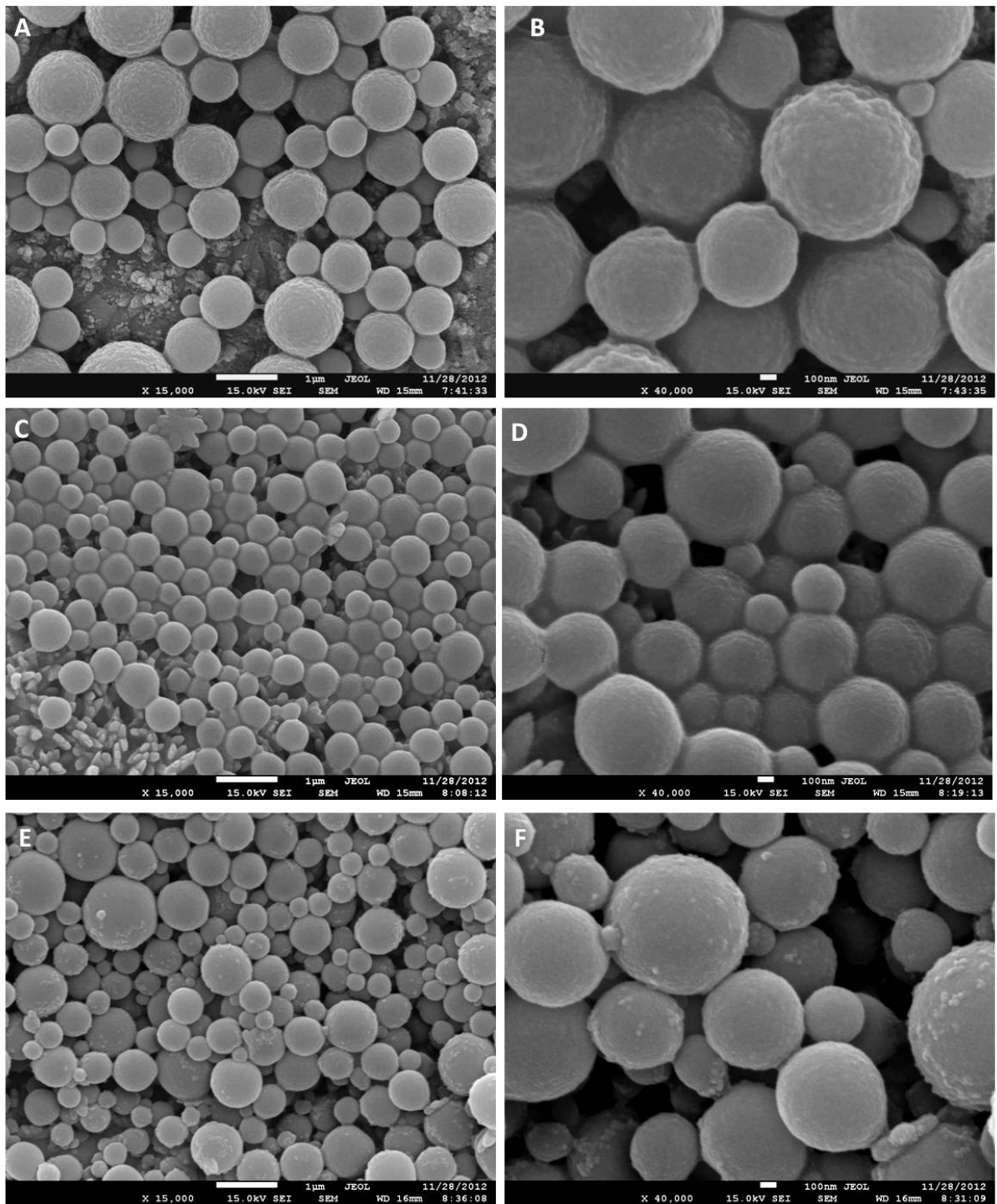


Figura 7: Caracterização morfológica das nanoemulsões frescas por MEV. Nanogotículas contrastadas com vapor de ósmio (1%), apresentando formato arredondado, superfície rugosa e monodispersão. A e B. NE P0, 15.000x e 40.000x. C e D. NE P5, 15.000x e 40.000x e E e F. NE P15, 15.000x e 40.000x.

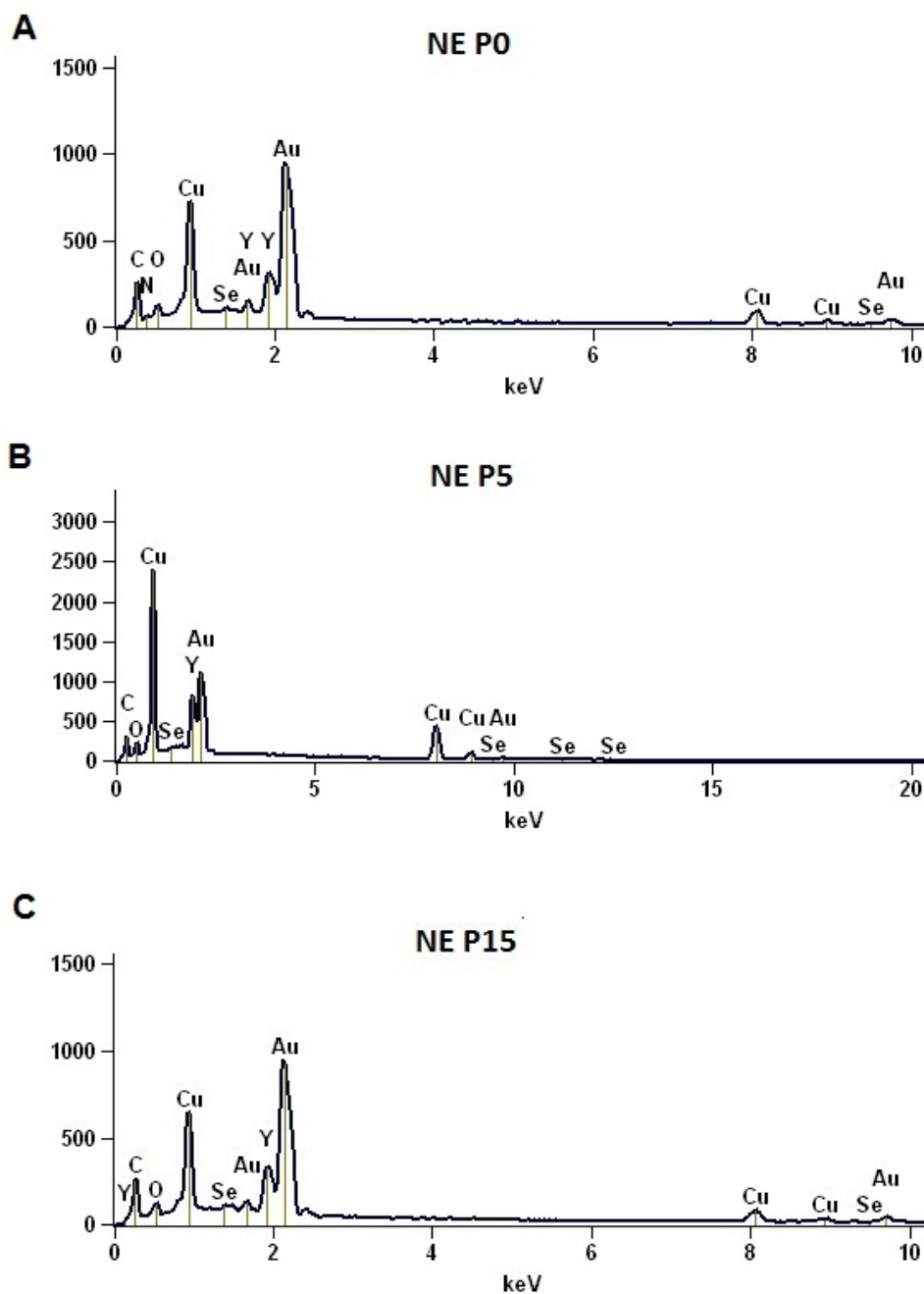


Figura 8: Espectroscopia de energia dispersiva de raio-x das NEs P0, P5 e P15 frescas em MEV.

A. NE P0, a maior parte da amostra apresentou-se constituída de ouro (Au= 55,53%) e somente 0,75% de selênio. **B.** NE P5, também houve alta porcentagem de Au (50,12%) e apenas 0,66% de de selênio. **C.** NE P15, o padrão de maior porcentagem de ouro (54,98%) e menor de selênio (0,68%) foi mantido.

3.4 Ensaio de Viabilidade e Citotoxicidade Celular

Demonstrou-se através do ensaio de viabilidade celular (MTT) que o tratamento com as nanopartículas de PVM/MA, não apresentou efeito significativo sobre a viabilidade das células estudadas ($p > 0,05$) (Figura 9). No entanto, o surfactante Cremophor ELP[®] apresentou alta toxicidade para as células normais e tumorais, tempo e concentração dependente. Para ambas as células houve toxicidade no período de 24h (200 $\mu\text{g/ml}$), 48 e 72h (6,25-200 $\mu\text{g/ml}$) ($p < 0,001$) (Figura 10). Também foram observadas alterações significativas na viabilidade das células normais e tumorais após o tratamento com as NEs de selol na concentração de 25 μg de selênio/ml nos períodos de 48 ($p < 0,01$) e 72h ($p < 0,001$) para a NE P0; 48 ($p < 0,01$) e 72h ($p < 0,001$) para a NE P5 e 48 e 72h ($p < 0,001$) para a NE P15. Para os tratamentos com todas as NEs P0 (Figura 11), P5 (Figura 12) e P15 (Figura 13), houveram alterações significantes nas células normais e tumorais nas concentrações de 50 μg de Se/ml (48 e 72h) e 100 μg de Se/ml (24, 48 e 72h) ($p < 0,001$). Entretanto, o tratamento com as NEs na concentração de 100 μg de Se/ml foi altamente tóxico para as células normais no tempo de 72h, sendo que a média de células normais viáveis após tratamento com as diferentes NEs foi de apenas $8,6\% \pm 1,8$ ($p < 0,001$). Enquanto isso, para a concentração de 50 μg de selênio/ml, no mesmo período, a viabilidade das células normais foi de $71,5\% \pm 2,6$; $57,7\% \pm 6,3$ e $49,5\% \pm 6,8$ ($p < 0,001$) para as NEs P0, P5 e P15, respectivamente. Em contraste, observou-se a redução da viabilidade média das células tumorais de $3,9\% \pm 0,6$ para todas as NEs ($p < 0,001$). O que torna essa concentração mais adequada para a condução do estudo.

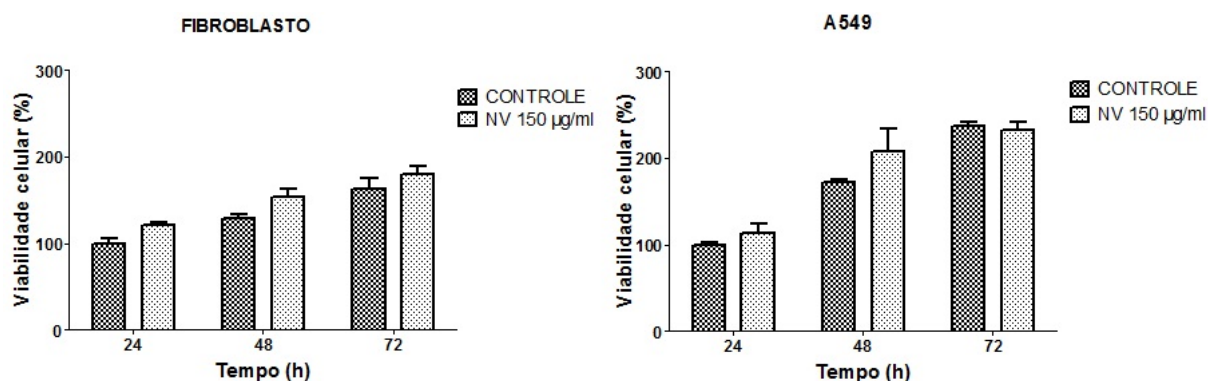


Figura 9: Viabilidade celular em fibroblasto e A549 após tratamento com NV (nanopartícula vazia) por 24, 48 e 72h.

Os tratamentos foram realizados com a concentração de 150 µg/ml. Os dados são expressos como média e erro padrão. Não houve diferença significativa ($p > 0,05$). NV= nanopartícula composta somente por copolímero PVM/MA.

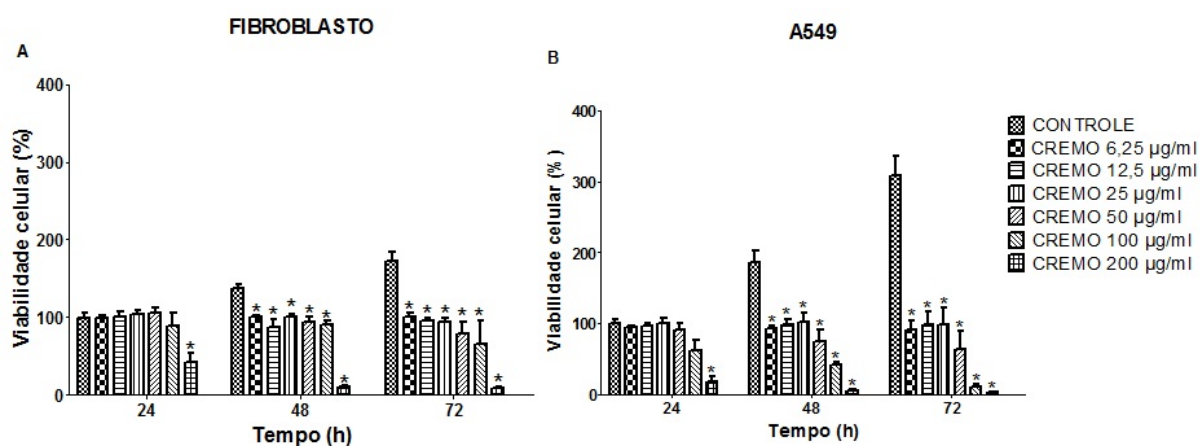


Figura 10: Viabilidade celular em fibroblasto e A549 após tratamento com diferentes concentrações de solução de Cremophor ELP[®] por 24, 48 e 72h.

Tratamentos realizados nas concentrações de 6,25; 12,5; 25; 50; 100 e 200 µg/ml. Os dados são expressos como média e erro padrão. *Diferença significativa ($p < 0,05$).

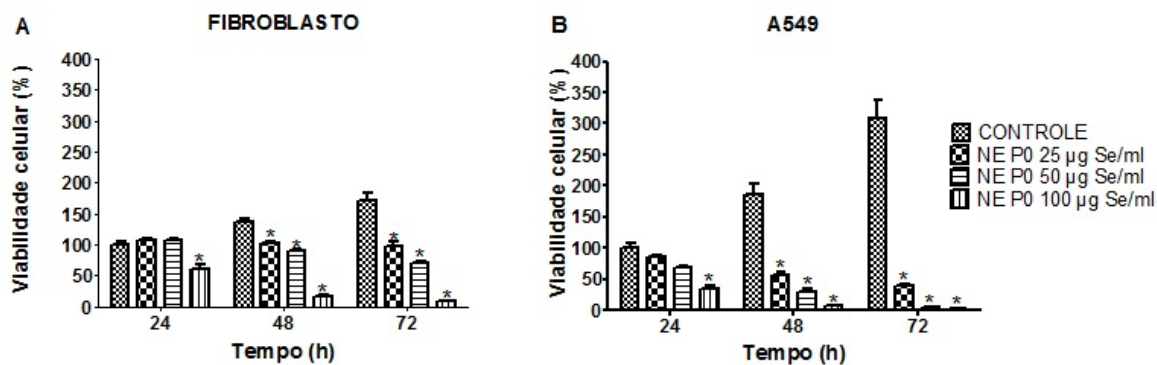


Figura 11: Viabilidade celular em fibroblasto e A549 após tratamento com as diferentes concentrações da nanoemulsão P0 por 24, 48 e 72h. NE P0= Nanoemulsão com selol e Cremophor ELP[®]. Dados representam média e erro padrão. *Diferença significativa ($p < 0,05$).

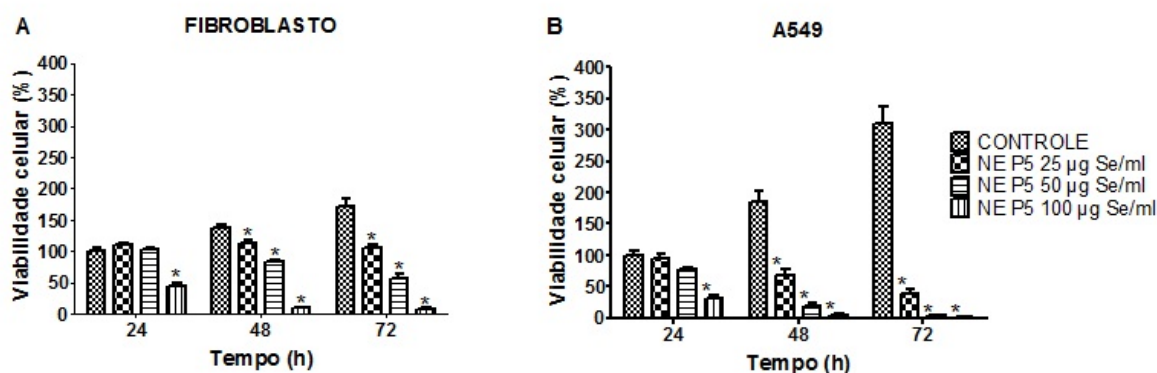


Figura 12: Viabilidade celular em fibroblasto e A549 após tratamento com as diferentes concentrações da nanoemulsão P5 por 24, 48 e 72h. NE P5= Nanoemulsão com selol, Cremophor ELP[®] e 5 mg/ml PVM/MA. Dados representam média e erro padrão. *Diferença significativa ($p < 0,05$).

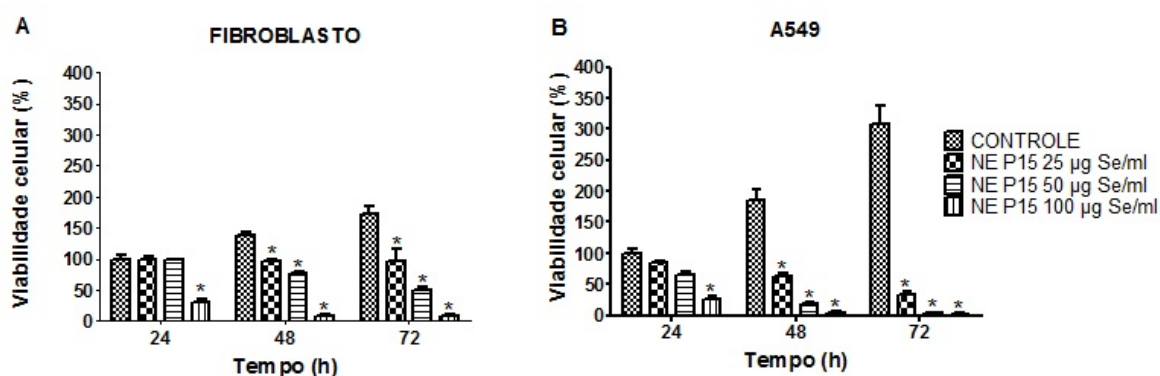


Figura 13: Viabilidade celular em fibroblasto e A549 após tratamento com as diferentes concentrações da nanoemulsão P15 por 24, 48 e 72h.

NE P15= Nanoemulsão com selol, Cremophor ELP[®] e 15 mg/ml PVM/MA. Dados representam média e erro padrão. *Diferença significativa ($p < 0,05$).

3.5 Eficiência Citotóxica das Nanoemulsões

A partir dos ensaios de viabilidade realizados, observou-se que as NEs armazenadas a 4°C mantiveram sua eficiência na redução da viabilidade das células A549 preservadas pelo período de até 210 dias (Figura 14). As células foram tratadas com as NEs P0, P5 e P15, a concentração de 50 µg Se/ml por 72 h. Não houve diferença estatística significativa entre os diferentes dias dos tratamentos e tipos de NEs ($p > 0,05$), sendo essa diferença significativa apenas quando relacionada aos controles do experimento ($p < 0,001$).

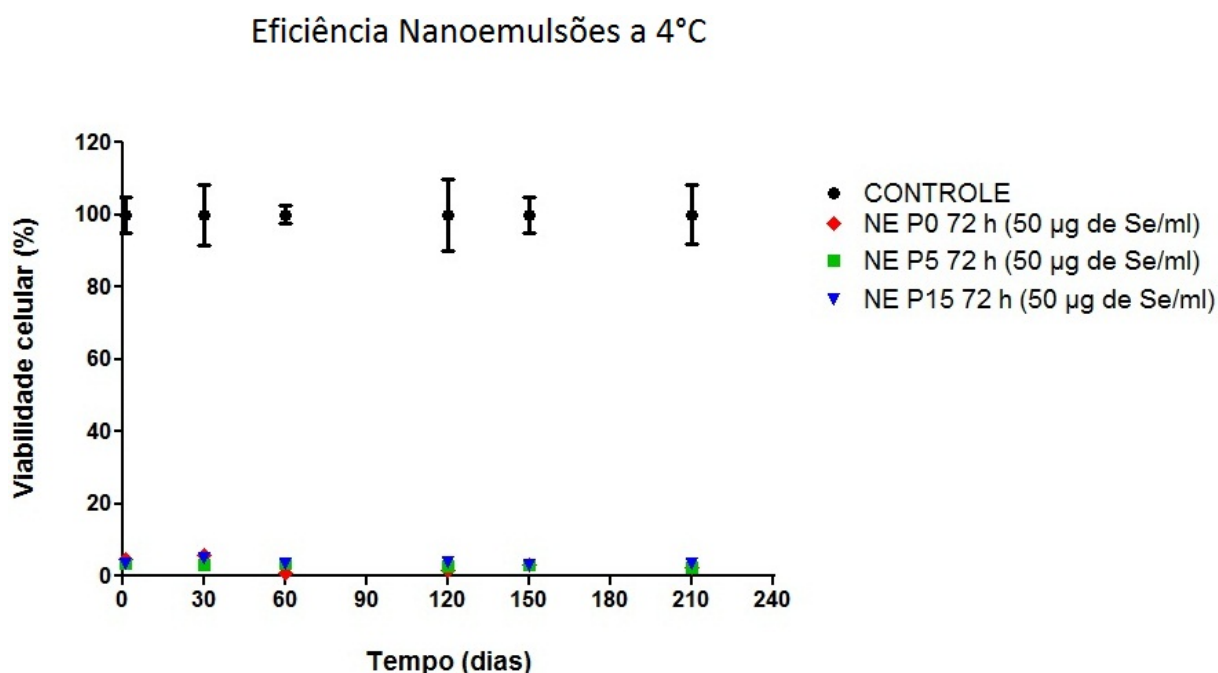


Figura 14: Eficiência das NEs de selol na redução da viabilidade das células A549 em 0, 30, 60, 120, 150 e 210 dias após a formulação e armazenamento a 4°C.

Todos os tratamentos foram realizados a concentração de 50 µg Se/ml. Os dados são expressos como média e desvio padrão.

3.6 Avaliação dos Padrões de Morte Celular

Alterações na membrana plasmática, indicando a exposição da fosfatidilserina da camada interna da membrana plasmática das células (células anexina V +) e a alteração da permeabilidade da membrana celular (células PI +), foram maiores quanto maior o tempo do tratamento. Tanto para as células normais (Figura 15), quanto para as tumorais (Figura 16), observou-se uma maior porcentagem de células anexina-V positivas após o tratamento com as NEs. As porcentagens de fibroblastos que apresentaram processo de morte por apoptose após os tratamentos com as NEs P0, P5 e P15 foram de 65,3% ± 1,5; 43,9% ± 1,9 e 40,4% ± 2,1, respectivamente ($p < 0,001$). As porcentagens de células A549 que apresentaram processo de morte por apoptose após os tratamentos com as NEs P0, P5 e P15 foram de 49,6% ± 23,7; 42,3% ± 7,9 e 42,5% ± 9,2, respectivamente ($p < 0,001$).

Em todos os tratamentos com as NEs os processos de apoptose/necrose e necrose

estiveram presentes em pequena porcentagem em ambas as células estudadas ($p > 0,05$). As células controle, normais e tumorais, apresentaram uma alta porcentagem de células negativas, que não apresentavam nenhum processo de morte, de $68,7\% \pm 5,2$ e $91\% \pm 2,4$, respectivamente (Figura 17).

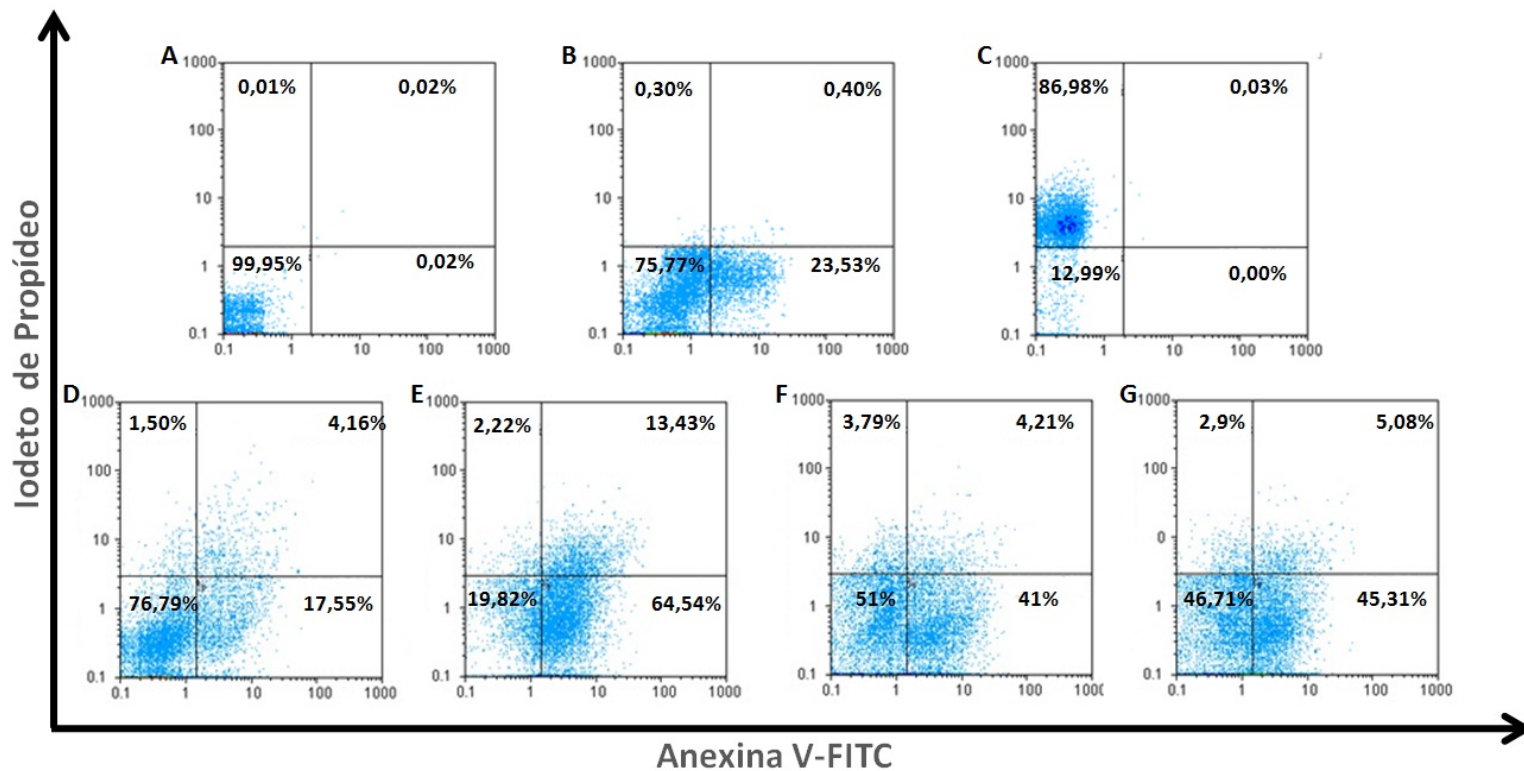


Figura 15: **Influência das NEs de selol P0, P5 e P15 ($50 \mu\text{g Se/ml}$) na permeabilidade da membrana plasmática dos fibroblastos.** Percentagens de células iodoto de propídeo positivas (PI+) são indicadas em cada quadrante superior esquerdo (QA1) e anexina V positivas (Anexina V+) são indicadas no quadrante inferior direito (QA4). Percentagens de células duplo positivas são detectadas no quadrante superior direito (QA2). **A.** Células controle negativo (sem tratamento ou marcação). **B.** Quadrante anexina V (+), células incubadas com selenito de sódio ($100 \mu\text{g de Se/ml}$) por 72h. **C.** Quadrante PI (+), células mortas por aquecimento a 60°C por 5 min. **D.** Células controle, sem tratamento, mas com marcadores. **E, F e G.** Células tratadas com NEs P0, P5 e P15 por 72h, respectivamente. Maior porcentagem de células anexina V(+) em todos os tratamentos com as NEs de selol. Dados de três experimentos independentes.

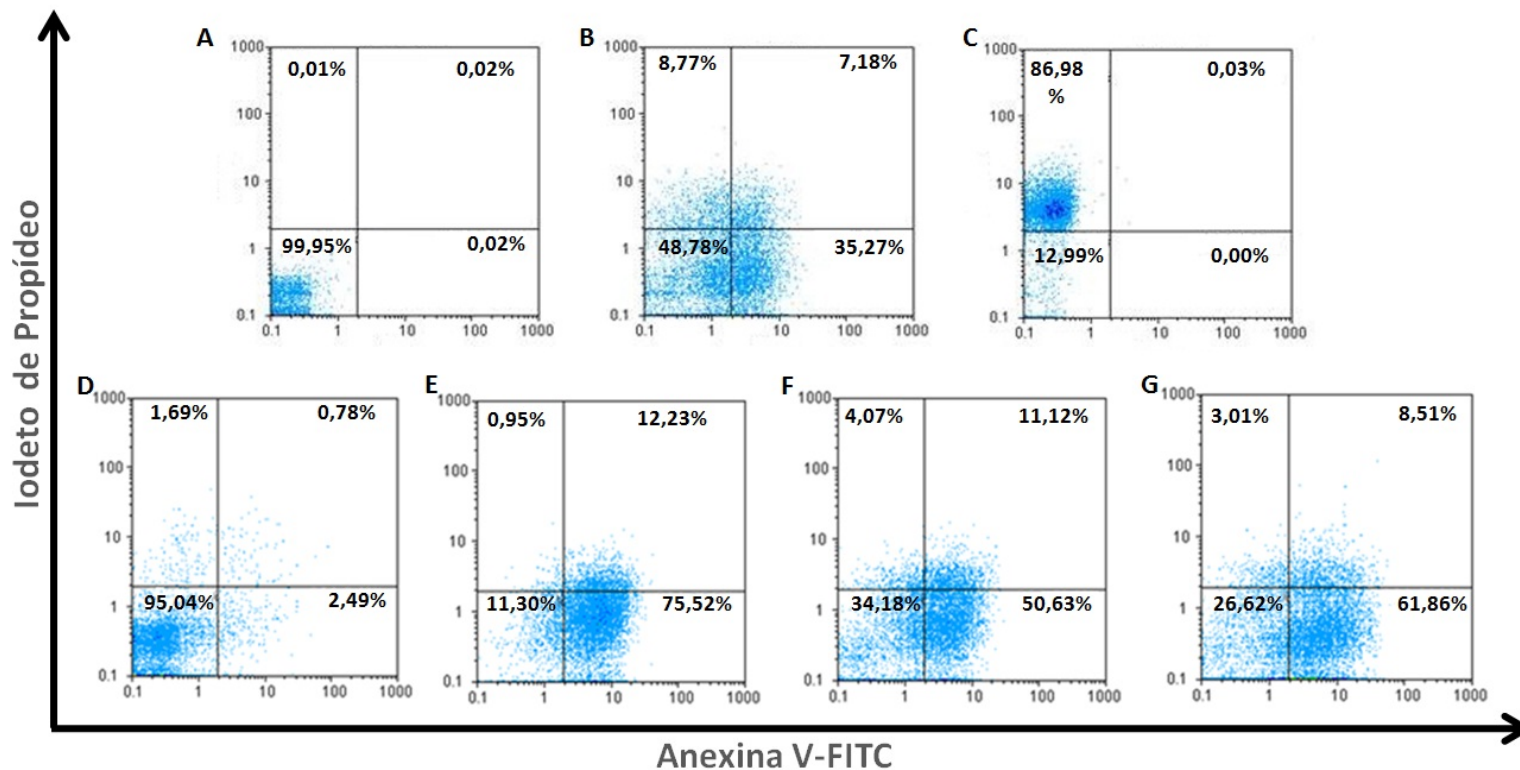


Figura 16: Influência das NEs de selol P0, P5 e P15 ($50 \mu\text{g Se/ml}$) na permeabilidade da membrana plasmática das células A549.

Porcentagens de células iodeto de propídeo positivas (PI+) são indicadas em cada quadrante superior esquerdo (QA1) e anexina V positivas (Anexina V+) são indicadas no quadrante inferior direito (QA4). Percentagens de células duplo positivas são detectadas no quadrante superior direito (QA2). **A.** Células controle negativo (sem tratamento ou marcação). **B.** Quadrante anexina V(+), células incubadas com selenito de sódio ($100 \mu\text{g de Se/ml}$) por 72h. **C.** Quadrante PI (+), células mortas por aquecimento a 60°C por 5 min. **D.** Células controle, sem tratamento, mas com marcadores. **E, F e G.** Células tratadas com NEs P0, P5 e P15 por 72h, respectivamente. Maior porcentagem de células anexina V(+) em todos os tratamentos com as NEs de selol. Dados de três experimentos independentes.

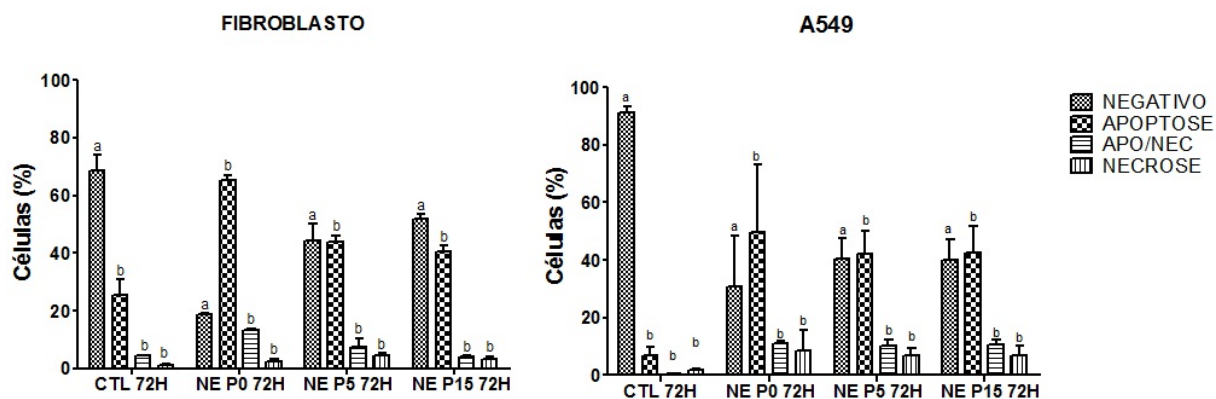


Figura 17: Processos de morte celular em fibroblasto e A549 após tratamento com as NEs P0, P5 e P15 (50 μ g Se/ml) por 72h. Não houve diferença estatística significativa entre os tratamentos com os diferentes tipos de NEs ($p > 0,05$), sendo essa diferença significativa apenas quando relacionada aos controles do experimento ($p < 0,001$). Dados representam média \pm erro padrão. As diferentes letras indicam diferença estatística entre os diferentes processos de morte celular.

3.7 Fragmentação de DNA e Ciclo Celular

Os tratamentos com as NEs P0, P5 e P15 (50 μ g Se/ml) promoveram elevada fragmentação no DNA das células A549 ($p < 0,001$). Com excessão das NEs P0 e P15 no período de 48h ($p > 0,05$). No período de 24h houve fragmentação de $24,1\% \pm 13,6$ (NE P0); $25,7\% \pm 2,9$ (NE P5) e $19,4\% \pm 5,1$ (NE P15) contra $12,5\% \pm 1,4$ do controle. No período de 48h houve fragmentação de $62,5\% \pm 16,5$ (NE P0); $58,6\% \pm 5,4$ (NE P5) e $59,5\% \pm 12,0$ (NE P15) contra $10,5\% \pm 4,4$ do controle. E, por último, no período de 72h houve a mais elevada fragmentação de DNA com $92,7\% \pm 5,3$ (NE P0); $86,9\% \pm 1,7$ (NE P5) e $79,8\% \pm 8,9$ (NE P15) contra $8,0\% \pm 3,7$ do controle (Figura 19).

Após o tratamento com qualquer uma das NEs houve um significativo aumento do número de células em fase Sub G1 e uma clara redução no número de células em fase G0/G1, S e G2/M. Devido a essa alta fragmentação do DNA das células tumorais, em alguns casos até 90% das células tratadas com as NEs, não foi possível o cálculo para a determinação da porcentagem de células em determinada fase do ciclo celular.

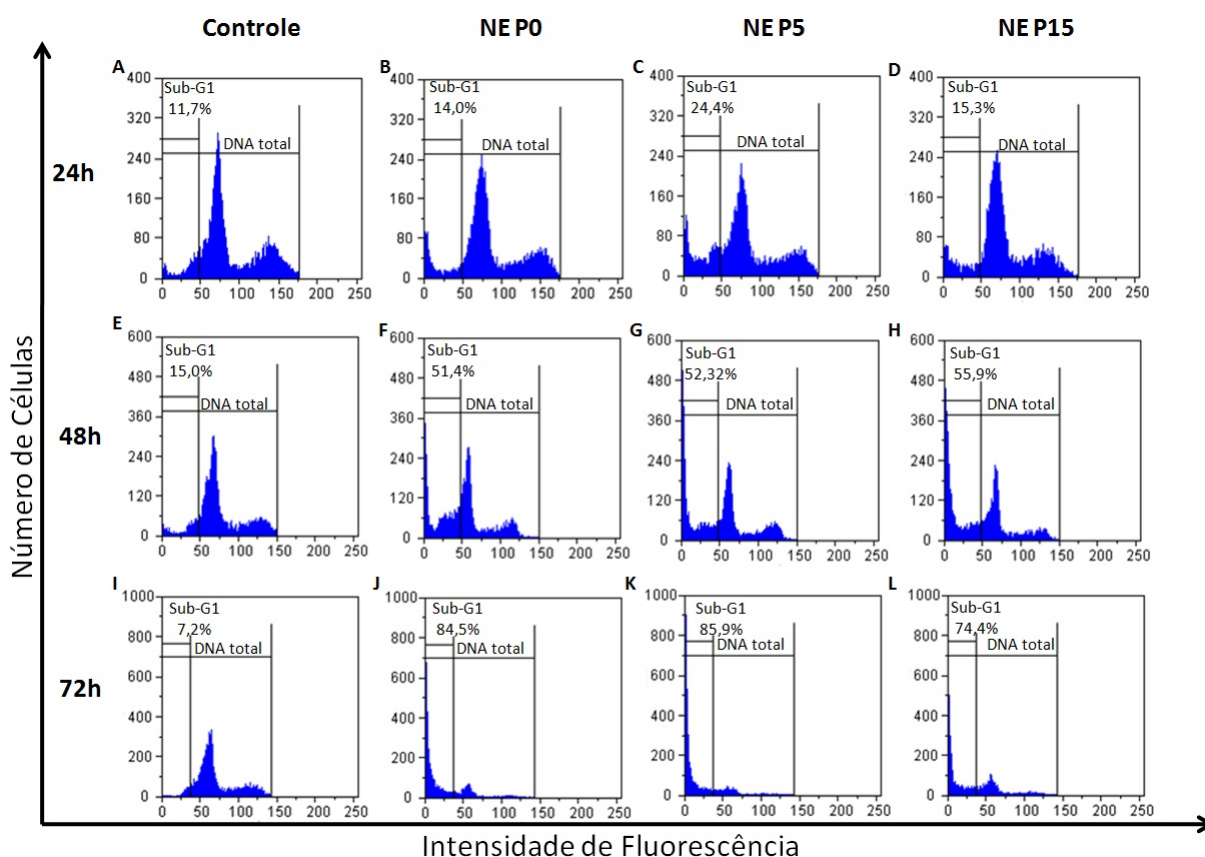


Figura 18: Fragmentação de DNA em células A549 tratadas com as NEs P0, P5 e P15 (50 $\mu\text{g Se/ml}$).

Células A549 tratadas com as NEs P0, P5 e P15 nos tempos de 24h (A,B,C e D), 48h (E,F,G e H) e 72h (I,J,K e L). **A, E e I.** São as células A549 controles, sem tratamento, em seus respectivos tempos. A porcentagem de DNA fragmentado foi dependente do tempo de tratamento. **A-L.** Histogramas representativos das populações sub-G1 das células controle e tratadas. Sub-G1 é população que foi considerada positiva para a fragmentação do DNA.

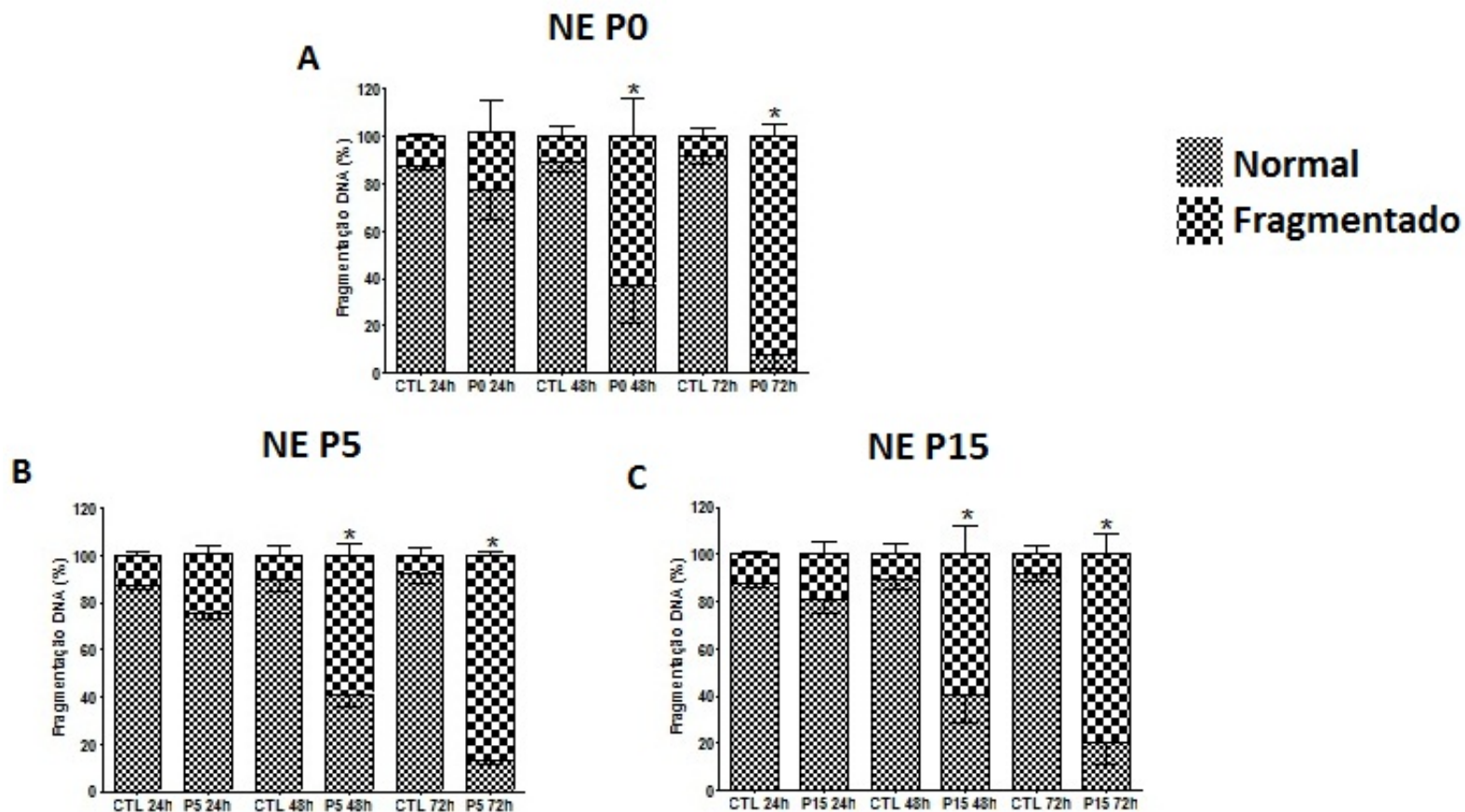


Figura 19: Fragmentação de DNA em células A549 controle e tratadas com NEs de selol ($50 \mu\text{g Se/ml}$) por 72h. Há maior fragmentação do DNA celular quanto maior o tempo de exposição às NEs, seja a NE P0, P5 ou P15. As NEs apresentaram o maior índice de fragmentação no período de 72h. Dados representam média e erro padrão. *Diferença significativa ($p < 0,05$).

3.8 Alterações Morfológicas

Por meio da microscopia de contraste de fase, observou-se que os tratamentos com todas as NEs na concentração de 50 $\mu\text{g Se/ml}$ induziram alterações morfológicas tanto em células normais quanto em células tumorais (Figura 20). No entanto, as alterações foram mais expressivas em células A549. As células normais, controle, apresentavam formato fusiforme e projeções citoplasmáticas (Figura 20A). Devido ao tratamento com as NEs P0, P5 e P15, respectivamente (Figura 20B,C,D), as células normais apresentaram perda de suas projeções citoplasmáticas e redução da confluência. As células controle A549 apresentavam morfologia estrelada com projeções citoplasmáticas (Figura 20E). Após o tratamento com as NEs, as células apresentaram turgência, perda das projeções citoplasmáticas, características de morte celular, e redução da confluência (Figura 20F,G,H).

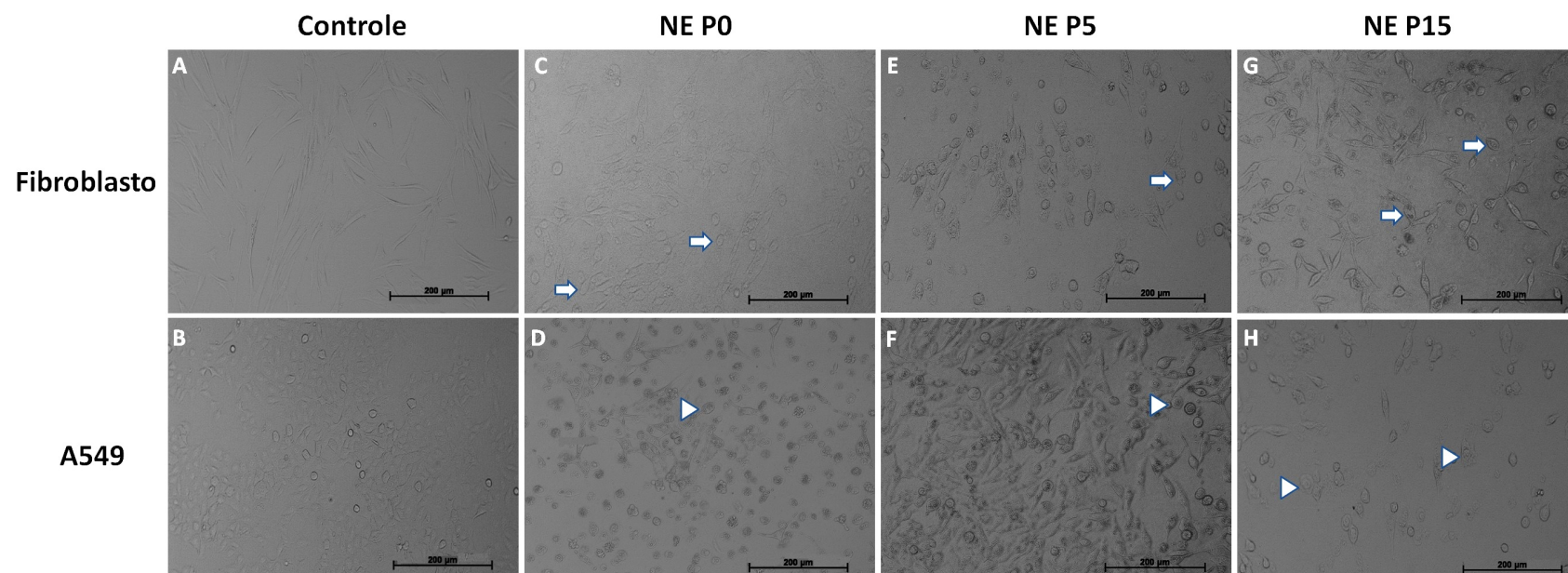


Figura 20: Morfologia de fibroblasto (A, B, C, D) e células A549 (E, F, G, H) após exposição às NEs P0, P5 e P15 a concentração de 50 $\mu\text{g Se/ml}$ por 72h.

A e E. Células controle normal e tumoral, não tratadas. **B e F.** Células fibroblasto e A549 tratadas com NE P0. **C e G.** Células fibroblasto e A549 tratadas com NE P5. **D e H.** Células fibroblasto e A549 tratadas com NE P15. Houve redução da confluência e alterações morfológicas em todas as células tratadas com as NEs. Observou-se perda das projeções citoplasmáticas nas células normais tratadas (B, C, D)(setas). As células tumorais tratadas (F, G, H) apresentaram turgência citoplasmática (cabeça de setas). Aumento de 20x.

4 *Discussão*

Atualmente há uma grande busca por novas drogas quimioterápicas que apresentem altos índices terapêuticos e ao mesmo tempo baixa toxicidade. Estudos indicam ser possível aumentar a performance de quimioterápicos clássicos pela associação dos mesmos a sistemas de entrega de drogas e inclusive a melhoria de entrega de drogas lipofílicas (PATIL & PANYAM, 2009). Também é possível o uso combinado de drogas, citotóxicas e citostáticas, para a obtenção de melhores resultados. Além do uso de medidas protetoras da saúde antes da utilização dos antineoplásicos, o que promove a diminuição da quantidade de droga utilizada, maior sensibilização das células tumorais e redução da toxicidade para as células normais e efeitos adversos (ALBAIN et al., 2002; PENG et al., 2009; ZHANG et al., 2010). O uso do selênio, na medicina complementar e alternativa, como suplementação, tratamento prévio as terapias, ou até mesmo concomitante, permitiu maior eficácia das terapias antineoplásicas. Como por exemplo, proteção contra nefrotoxicidade, redução da resistência a cisplatina e melhoria do estado antioxidante (MICKE et al., 2010; FRITZ et al., 2011; LI et al., 2011; QI et al., 2012). Dentre essas novas potenciais drogas antitumorais, o selol, um novo composto selênico (nível de oxidação IV), tem se mostrado como um potente agente quimiopreventivo e antitumoral (JASTRZEBSKI et al., 1997; SUCHOCKI et al., 2007). No entanto, pelo fato de ser constituído de uma mistura de selenitotriacilglicerídeos, ele é altamente hidrofóbico. Isso torna necessária sua associação em um nanossistema de entrega de drogas. Nanoemulsões são sistemas coloidais constituídos de dois líquidos imiscíveis, com gotículas de tamanho nanométrico dispersas em uma fase aquosa. O método de emulsificação espontânea por adição de água resultou em NEs de selol monodispersas cobertas ou não pelo copolímero PVM/MA.

O tensoativo Cremophor ELP[®], óleo de castor polietoxilado, atua de forma a estabilizar as nanogotículas de selol formadas durante a formulação, e possibilitar a sua interação com meio aquoso. Apenas a presença do tensoativo parece atuar de forma bastante eficiente na estabilização interfacial, já que a NE P0 não apresentou elevadas alterações significativas mesmo quando submetidas a ciclos de congelamento/descongelamento (Tabela 1). O copolímero PVM/MA também age de modo a estabilizar interfacialmente as NEs, pois pôde-se comprovar a manutenção das propriedades das NEs P5 e P15, como DH, PdI e potencial zeta, quando armazenadas a 4 °C e 25 °C, por até 150 dias (Tabela 1).

Apesar de as NEs diferirem pela presença e quantidade de PVM/MA em suas formulações, elas apresentaram DH semelhantes de 290,6 nm ± 10,1; 257,2 nm ± 2,0 e 267,3 nm ± 2,1, para as NEs P0, P5 e P15, respectivamente. Não houve significância estatística para os DH e PdI dos diferentes tipos de NEs ($p > 0,05$), levando a conclusão, de que, sob esses aspectos as NEs são iguais. Estando a diferença entre elas centrada apenas no potencial zeta ($p < 0,05$). Os ζ -potenciais das NEs tornaram-se mais negativos conforme a adição de diferentes quantidade de copolímero. O potencial zeta das NEs foram de -1,0 mV ± 0,4 (NE P0); -9,5 mV ± 0,8 (NE P5) e -19,9 mV ± 0,7 (NE P15). Isso indica um aumento da estabilidade coloidal das gotículas e deve-se ao fato da hidrólise dos polianidridos do PVM/MA em grupos ácido carboxílico, que encontram-se na superfície das NEs tornando-as mais negativas (LI & LEE, 2010). A carga de superfície altamente negativa é uma indicação importante para a estabilidade do sistema (LIU et al., 2010). Com isso, há menos chances de floculação ou coagulação das NEs em ambiente biológico e também durante todo o período de armazenamento (BALI, ALI & ALI, 2011). Devido ao congelamento, a estabilidade das gotículas diminui progressivamente com o aumento do tempo. Enquanto nas NEs P5 e P15, observaram-se expressivas alterações em seus DH e PdI (surgimento de subpopulações de gotículas), devido ao congelamento. Na NE P0 foi observado apenas um pequeno aumento do DH das NEs (Tabela 1). Os índices de poli-dispersão da NE P0 mantiveram-se iguais ou menores do que 0,1, o que refletem gotículas homogêneas ($p > 0,05$). Devido ao grande estresse térmico, ao qual as NEs foram submetidas durante os ciclos de congelamento/derretimento, as alterações nos DH e PdI da NE P0 foram mais expressivas. No entanto, os PdI da NE P0 mantiveram-se iguais ou menores do que 0,3, o que refletem nanogotículas relativamente homogêneas. Já as NEs P5 e

P15 apresentaram um comportamento curioso ao apresentarem alterações significantes em seus DH somente até o 4º ciclo de congelamento/derretimento (45 dias) ($p < 0,05$). Posteriormente a esse período, no 5º ciclo (60 dias), as NEs apresentavam os DH similares aos das NEs P5 e P15 frescas ($p > 0,05$). Contudo, a temperatura de -20 °C , não é a mais indicada para o armazenamento das NEs. Esta instabilidade térmica ocorre, provavelmente, como consequência do polimorfismo e grau de cristalinidade dos lípidios das NEs, e do comportamento da fase aquosa na presença de sólidos (RAO & HARTEL, 1998). Quando emulsões congelam, as gotículas de lípidos tornam-se progressivamente concentradas para a fase de concentrado congelado, assim que entram em contato próximo uns com os outros nos canais aquosos descongelados entre os cristais de gelo. A concentração das gotículas lipídicas nestes canais estreitos podem promover a floculação e/ou a coalescência durante o processo de congelamento/descongelamento (KOMATSU, OKADA & HANDA, 1997; SAITO et al., 1999; THANASUKARNA, PONGSAWATMANITA & MCCLEMENTS, 2004).

A partir dos resultados, observou-se que as NEs não poderiam ser congeladas e descongeladas, somente mantidas a 4 °C e a 25 °C (pelo período observado de 150 dias) sem que houvessem alterações significantes em suas características e propriedades. A liofilização das NEs foi bem sucedida, exceto pela etapa de re-hidratação das mesmas, o que provocou alteração de seus PdIs, pois houve o aumento dos DHs das gotículas e alteração dos seus potenciais zeta. A liofilização das NEs possibilitaria a apresentação das mesmas na forma de pós, granulados, comprimidos, drágeas, cápsulas e também soluções, xaropes, elixires, suspensões, emulsões, injetáveis ou injeções, tinturas, extratos, pomadas, cremes, pastas, loções, géis, aerossóis e adesivos.

Em MET (Figura 5B), as NEs mostraram-se passíveis de deformação. Esta propriedade, que é em resposta ao ambiente circundante, tanto quanto a forma esférica, são interessantes para a administração desta formulação através de vias parenterais e para o acesso de vasos e estruturas de pequeno calibre como as fenestras tumorais (MORACHIS et al., 2012). Na análise das NEs P0, P5 e P15 em MET, 120 dias após a preparação, as NEs apresentaram alterações morfológica e aparente redução em sua camada polimérica. Alterações essas, possivelmente relacionadas com a ocorrência de um processo de degradação das NEs, particularmente das moléculas de PVM/MA. No entanto essas alterações morfológicas não são sustentadas pelo estudo de estabilidade termodinâmica das NEs, onde

as gotículas preservaram as propriedades como DH, PDI e potencial zeta por até 150 dias após a preparação (tabela 1). A morfologia das NEs em MEV (Figura 7) revelou suas formas esféricas e com pequenas rugosidades na superfície. Isso é explicado pelo fato de que durante a formulação das NEs, os núcleos principais das gotículas crescem tridimensionalmente, com isso a forma esperada para as NEs é a esférica, como conferida pela tensão interfacial entre as gotículas e o dispersante (GUIDO et al., 1999). Quanto a rugosidade, ela se deve a característica da superfície do copolímero de ser erodível em meio aquoso (LI & LEE, 2010) A espectroscopia de energia dispersiva de raios-X (EDS) realizada em MEV, possibilitou a detecção do elemento selênio apenas em pequenas porcentagens nas NEs. Isso se deve em grande parte, pela cobertura de ouro (10 nm de espessura) que foi vaporizada sobre as nanogotículas. Sendo o ouro, o elemento mais presente em todos os histogramas produzidos. Em todas as medições com as NEs P0, P5 e P15, pode-se observar apenas um pequeno pico do elemento selênio nas amostras, não chegando a corresponder a 1% da amostra (Figuras 8).

No ensaio de viabilidade celular, foi mostrado que a nanopartícula vazia, composta apenas por PVM/MA, não apresentou citotoxicidade para as células normais e tumorais, sendo que durante o tratamento com as nanopartículas vazias houve até mesmo proliferação celular (Figura 9). No entanto, o ensaio também mostrou que o tratamento com a solução de Cremophor ELP[®] foi extremamente citotóxica para as duas células estudadas. Isto pode ser explicado pelo fato de as micelas do tensoativo serem muito pequenas (DH= 13,1 nm ± 0,1). O DH tem forte influência no modo pelo qual as micelas interagem com as células, com isso a interiorização do Cremophor ELP[®] pode ter se dado de forma passiva e inespecífica, e com isso ter causado uma significativa queda na viabilidade celular (Figura 10).

A relação de toxicidade das células normais e a eficácia antitumoral contra as células tumorais das NEs de selol foram testadas *in vitro*. O selênio em sua forma inorgânica é um potente agente antitumoral, no entanto a sua elevada toxicidade para as demais células não-alvo, tem limitado a sua aplicação clínica (ZHANG et al., 2005) . O selol, que é uma fonte orgânica de selênio (IV), mostrou-se eficiente na redução da viabilidade celular das células de adenocarcinoma de pulmão (A549) (JASTRZBSKI et al., 1995). Sua baixa toxicidade em comparação com selenito de sódio já foi demonstrado com

células de leucemia e em estudos *in vivo* (WILCZYNSKA et al., 2011). A emulsificação do selol, sua estabilização com o tensoativo Cremophor ELP[®] e a co-adsorção do copolímero PVM/MA na superfície das nanogotículas, promoveu que as células A549 fossem mais suscetíveis às NEs P0, P5 e P15 do que as células normais. Isto pode ser explicado pela mais intensa atividade endocítica das células A549, o que resulta em uma maior interiorização das gotículas (Figuras 11, 12 e 13)(BAREFORD & SWAAN, 2007). Outro motivo que eventualmente relaciona-se com essa maior sensibilidade das células tumorais é a alta atividade proliferativa dessas células. O ciclo celular da linhagem A549 é de aproximadamente 22h.

O ensaio de viabilidade também mostrou que, a eficiência das NEs mantidas a 4°C em promover citotoxicidade e morte nas células da linhagem A549, foi mantida por até 210 dias (Figura 14). Esta estabilização interfacial deveu-se ao PVM/MA, um polianidrido que é inerentemente hidrofóbico, mas que eventualmente tem sua hidrofobicidade reduzida quando é exposto à água. Esta exposição acarreta a hidrólise dos grupos anidrido em grupos ácido carboxílicos, aptos a realizarem ligações de hidrogênio com as moléculas de água circundantes. Por fim, durante o processo de emulsificação, a cadeia do copolímero torna-se anfipática, fazendo com que ele atue como um cossurfactante, pois a porção da cadeia que interage com o selol mantém-se hidrofóbica (Figura 6). Esses resultados dão indícios da alta estabilidade das nanogotículas, resultantes de um adequado processo de obtenção.

Neste estudo, a exposição de fosfatidilserina e/ou alterações na permeabilidade da membrana plasmática e a fragmentação de DNA nuclear foram observados em altas porcentagens nas células A549 após o tratamento com as NEs de selol (Figuras 15 e 16). Foram observadas também elevadas porcentagens de células A549 apresentando fragmentação de DNA nuclear após o tratamento com NEs de selol. Por meio dos dados, evidencia-se que a quantidade de DNA fragmentado foi altamente relacionada com o tempo ao qual as células foram expostas ao tratamento. Sendo maior o dano, quanto maior o tempo de exposição (Figuras 18 e 19) . Em estudos anteriores, o tratamento com selênio inibiu o crescimento celular, promoveu atraso no ciclo celular e a apoptose em células de câncer de pulmão, bem como em vários outros tipos de tumores(SWEDE et al., 2003; EL-BAYOUMY et al., 2006). Além disso, a combinação de compostos de selênicos com outros fármacos quimioterápicos favorece uma indução mais pronunciada da apoptose

mediada por caspase, atraso na progressão do ciclo celular no ponto de controle G2/M e a inibição da proliferação celular (QI et al., 2012). Particularmente, o selol demonstrou atividade anticarcinogênica, como resultado da sua influência sobre as proteínas Pgp de resistência a multidrogas, por sensibilizar células resistentes à doxorrubicina e vincristina, e, provavelmente pelo aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) (SU-CHOCKI et al., 2007, 2010). Portanto, o selol pode agir sinergicamente com outros fármacos anticancerígenos. Com isso o presente estudo corrobora as descobertas anteriores e sugere que o selol pode ser utilizado na quimioterapia antitumoral, principalmente como droga adjuvante.

5 Conclusão

Este estudo mostra que é possível superar a hidrofobicidade do selol, para uso em sistemas biológicos, por meio do desenvolvimento de nanoemulsões. O simples método de obtenção, o fácil armazenamento e a prolongada manutenção das propriedades das gotículas, fazem das NEs de selol candidatas para o tratamento de neoplasias. Além disso, as NEs apresentam maior segurança para aplicações clínicas do que os compostos selênicos inorgânicos clássicos. As NEs de selol monodispersas, cobertas ou não com o copolímero PVM/MA, mostraram-se eficientes em promover morte em células de adenocarcinoma de pulmão humano — A549 — sendo potencialmente adequadas para o tratamento do carcinoma de pulmão de células não-pequenas. O armazenamento das NEs a temperatura de 4°C, também não alterou a citotoxicidade das gotículas à longo prazo, pelo período de até 210 dias. Dando indícios de sua alta estabilidade, resultantes de um adequado processo de obtenção. Todas as NEs de selol mostraram-se capazes de promover morte celular por apoptose *in vitro*. Esse mecanismo de morte é extremamente interessante para portadores de carcinomas, pois propicia uma morte "limpa" das células tumorais e menos efeitos adversos aos pacientes, já que não ocorrem reações inflamatórias em resposta ao tratamento. A presença ou ausência do copolímero PVM/MA nas NEs pareceu não influenciar de forma significativa a ação citotóxica das mesmas sobre as células carcinogênicas A549. No entanto, dentre todas as NEs, a que poderia apresentar melhores resultados quando *in vivo*, seria na NE P15. A maior quantidade de copolímero adsorvido nessa nanogotícula, poderia promover uma maior interação com a membrana plasmática e posteriormente, maior interiorização das NEs pelas células tumorais. Além disso a cobertura polimérica confere a essa NE um potencial zeta mais negativo, o que resulta em uma maior estabilidade coloidal da NE P15, quando comparada com as demais NEs.

6 *Perspectivas*

Estudos em modelos *in vivo* devem ser realizadas a fim de avaliar o potencial das nanoemulsões para serem utilizadas clinicamente como agentes quimioterápicos contra adenocarcinoma de pulmão humano, ou até mesmo terem a sua atividade quimioterápica potencializada pelo uso em associação com outras drogas comerciais disponíveis atualmente. Contudo, como os compostos selênicos apresentam atividade concentração dependente, as nanoemulsões de selol também têm o potencial de serem utilizadas como uma medida protetora na presença ou ausência do tumor.

Referências

- ALBAIN, K. et al. Adjuvant chemohormonal therapy for primary breast cancer should be sequential instead of concurrent: initial results from intergroup trial 0100 (swog-8814). **Am Soc Clin Oncol**, v. 21, p. Abstract 143, 2002.
- ANTON, N. et al. Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates-a review. **J Control Release**, v. 128(3), p. 185–199, 2008.
- ARBÓS, P. et al. Quantification of the bioadhesive properties of protein-coated pvm/ma nanoparticles. **Int J Pharm**, v. 242, p. 129–136, 2002.
- AZZOLI, C. G. et al. American society of clinical oncology clinical practice guideline update on chemotherapy for stage iv non-small-cell lung cancer. **JCO.**, v. 29, p. 3825–3831, 2011.
- BALI, V.; ALI, M. & ALI, J. Nanocarrier for the enhanced bioavailability of a cardiovascular agent: in vitro, pharmacodynamic, pharmacokinetic and stability assessment. **Int J Pharm**, v. 403, p. 46–56, 2011.
- BAREFORD, L. M. & SWAAN, P. Endocytic mechanisms for targeted drug delivery. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 59, p. 748–58, 2007.
- BASF. Technical data sheet on cremophor el. revisado 16.12.2012. **BASF**, 2012. Disponível em: <<http://basf.com>>. Acesso em: 05 Jan. 2012.
- CF&F. Cancer facts & figures 2012. **Atlanta: American Cancer Society**, 2012.
- CUFER, T. et al. Systemic therapy of advanced non-small cell lung cancer: Major developments of the last 5-years. **Eur Jour of Cancer**, v. 1, p. 5–10, 2012.
- DAS, A. et al. The selenium analog of the chemopreventive compound s,s'-(1, 4-phenylenebis [1, 2-ethanediyl]) bisisothiourea is a remarkable inducer of apoptosis and inhibitor of cell growth in human non-small cell lung cancer. **Chem Biol Interact**, v. 180, p. 158–164, 2009.
- DRAKE, E. et al. Cancer chemoprevention: Selenium as a prooxidant, not an antioxidant. **Med Hypotheses**, v. 67, p. 318–322, 2006.

- EL-BAYOUMY, K. et al. Molecular targets of the chemopreventive agent 1, 4-phenylenebis (methylene)-selenocyanate in human non-small cell lung cancer. **Carcinogenesis**, v. 27, p. 1369–1376, 2006.
- FENG, S. S. Nanoparticles of biodegradable polymers for new concept chemotherapy. **Expert Review of Medical Devices**, v. 1, p. 115–125, 2004.
- FERRARI, M. Cancer nanotechnology: opportunities and challenges. **Nat Rev Cancer**, v. 5, p. 161–171, 2005.
- FITAK, B. et al. Poland patent pol. pl 176530. (Cl. **A61K31/095**), 1999.
- FRITZ, H. et al. Selenium and lung cancer: A systematic review and meta analysis. **PloS one**, v. 6(11), p. 1–8, 2011.
- GHOSH, J. Rapid induction of apoptosis in prostate cancer cells by selenium: reversal by metabolites of archidonate 5-lipoxygenase. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 315(3), p. 624–635, 2004.
- GUIDO, S. et al. Measurement of interfacial tension by drop retraction analysis. **J Colloid Interface Sci**, v. 209, p. 247–250, 1999.
- HIRAOKA, K. et al. Osteosarcoma cell apoptosis induced by selenium. **J Orthop Res**, v. 19, p. 809–814, 2001.
- INCA. Instituto nacional do câncer, incidência de câncer no brasil 2012. **Ministério da Saúde**, 2012. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br>>. Acesso em: 30 Dez. 2012.
- INCA. Instituto nacional do câncer. **Ministério da Saúde**, 2013. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br>>. Acesso em: 01 jan. 2013.
- JAMNIK, S. et al. Estudo comparativo de fatores prognósticos em portadores de carcinoma não-pequenas células: Sobrevida superior a cinco anos e inferior a um ano. **Rev Bras de Cancer**, v. 55(1), p. 5–10, 2009.
- JASSEM, J. Maintenance chemotherapy in advanced non-small-cell lung cancer. **Lancet Oncol**, v. 13, p. 217–218, 2012.
- JASTRZBSKI, Z. et al. Effect of administration route on the dynamics of selol absorption, distribution and elimination. **Pol J Environ Stud**, v. 64, p. 1–64, 1995.
- JASTRZEBSKI, Z. et al. Toxicity studies of a new selenium compound, selol, in rats. **Drugs Exptl Clin Res**, v. 21, p. 217–220, 1995.
- JASTRZEBSKI, Z. et al. Pharmacokinetics of selol, a new agent containing selenium, in rats. **Drugs Exptl Clin Res**, v. 23, p. 7–11, 1997.

JIANG, H. & ZHU, K. Bioadhesive fluorescent microspheres as visible carriers for local delivery of drugs. i. preparation and characterization of insulin-loaded pcefb/plga microspheres. **J Microencapsu**, v. 19, p. 451–461, 2002.

KIM, I. et al. Doxorubicin-loaded highly porous large plga microparticles as a sustained-release inhalation system for the treatment of metastatic lung cancer. **Biomaterials**, v. 22, p. 5574–5583, 2012.

KOMATSU, H.; OKADA, S. & HANDA, T. Suppressive effects of salts on droplet coalescence in a commercially available fat emulsion during freezing for storage. **J of Pharm Sci**, v. 86(4), p. 497–502, 1997.

LCNSCO. Lung cancer non-small cell overview. **American Cancer Society**, 2011. Disponível em: <<http://www.cancer.org>,>. Acesso em: 01 jan. 2013.

LI, Y. & LEE, P. I. A new bioerodible system for sustained local drug delivery based on hydrolytically activated in situ macromolecular association. **Int J of Pharma**, v. 383, p. 45–52, 2010.

LI, Y. et al. Preparation, characterization and nasal delivery of alpha-cobrotoxin-loaded poly(lactide-coglycolide)/polyanhydride microspheres. **J Control Release**, v. 108, p. 10–20, 2005.

LI, Y. et al. The reversal of cisplatin-induced nephrotoxicity by selenium nanoparticles functionalized with 11-mercapto-1-undecanol by inhibition of ros-mediated apoptosis. **Biomaterials**, v. 32, p. 9068–9076, 2011.

LIU, Y. et al. A strategy for precision engineering of nanoparticles of biodegradable copolymers for quantitative control of targeted drug delivery. **Biomaterials**, v. 31, p. 9145–9155, 2010.

LIU, Y.; SOLOMON, M. & ACHILEFU, S. Perspectives and potencial applications of nanomedicine in breast and prostate cancer. **Med Res Rev**, 2010. Disponível em: <DOI: 10.1002/med.20233.2010.>.

MCCLEMENTS, D. et al. Emulsion-based delivery systems for lipophilic bioactive components. **J of Food Science**, v. 72(8), p. 109–124, 2007.

MICKE, O. et al. Complementary and alternative medicine in lung cancer patients: a neglected phenomenon? **Front Radiat Ther Oncol**, v. 42, p. 198–205, 2010.

MORACHIS, J. M. et al. Physical and chemical strategies for therapeutic delivery by using polymeric nanoparticles. **Pharmacol Rev**, v. 64, p. 505–519, 2012.

NCINIH. National cancer institute in the national institutes of health. **National Institutes of Health**, 2012. Disponível em: <<http://www.cancer.gov>>. Acesso em: 05 Jan. 2012.

ONN, A. et al. Development of an orthotopic model to study the biology and therapy of primary human lung cancer in nude mice. **Clin Cancer Res**, v. 9, p. 5532–5539, 2003.

PATIL, Y. & PANYAM, J. Polymeric nanoparticles for sirna delivery and gene silencing. **Int J Pharm**, v. 367, p. 195–203, 2009.

PAZ-ARES, L. et al. Maintenance therapy with pemetrexed plus best supportive care versus placebo plus best supportive care after induction therapy with pemetrexed plus cisplatin for advanced non-squamous non-small-cell lung cancer (paramount): a double-blind, phase 3, randomised controlled trial. **Lancet Oncol**, v. 13, p. 274–55, 2012.

PENG, C. et al. Dual chemotherapy and photodynamic therapy in an ht-29 human colon cancer xenograft model using sn-38-loaded chlorin-core star block copolymer micelles. **Biomaterials**, v. 30, p. 3614–3625, 2009.

PFISTER, D. G. et al. American society of clinical oncology treatment of unresectable non-small-cell lung cancer guideline: Update 2003. **J Clin Oncol**, v. 22, p. 330–353, 2004.

QI, Y. et al. Methylseleninic acid enhances paclitaxel efficacy for the treatment of triple-negative breast cancer. **PloS one**, v. 7(2), p. 1–10, 2012.

RAMALINGAM, S. & BELANI, C. Systemic chemotherapy for advanced non-small cell lung cancer: Recent advances and future directions. **The Oncologist**, v. 13, p. 10–11, 2013.

RAO, M. A. & HARTEL, R. W. Phase/state transitions in foods: Chemical, structural, and rheological changes. **New York: MarcelDekker**, 1998.

RUDDON, R. Cancer biology. 4th ed. **New York: Oxford University Press**, 2007.

SAITO, H. et al. Coalescence of lipid emulsions in floating and freeze-thawing processes: Examination of the coalescence transition state theory. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 219(1), p. 129–134, 1999.

SHAH, P. et al. Nanoemulsion: A pharmaceutical review. **Syst Rev Pharm**, v. 1, p. 24–32, 2010.

SIEGEL, R. et al. Cancer statistics. **Cancer J Clin**, v. 62(1), p. 10–29, 2012.

STANCZYK, M. et al. The effect of selenium on redox state and thiols changes in lung tissue after selol, a new organoselenium (iv) compound, administration. **Central Eur J of Immu**, v. 35(3), p. 115–122, 2010.

SUCHOCKI, P.; JAKONIUK, D. & FITAK, B. A. Specific spectrophotometric method with trifluoroacetic acid for the determination of selenium(iv) in selenitetriglycerides. **J Pharmaceut Biomed Anal**, v. 32, p. 1029–1036, 2003.

- SUCHOCKI, P. et al. The activity of selol in multidrug-resistant and sensitive human leukemia cells. **Oncology Reports**, v. 18, p. 893–899, 2007.
- SUCHOCKI, P. et al. Selenitetriglicerydes affect cyp1a1 and qr activity by involvement of reactive oxygen species and nrf2 transcription factor. **Pharmacol Rep**, v. 62, p. 352–361, 2010.
- SWEDE, H. et al. Cell cycle arrest biomarkers in human lung cancer cells after treatment with selenium in culture. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 12, p. 1248–1252, 2003.
- TADROS, T. et al. Formation and stability of nano-emulsions. **Adv in Colloid and Inter Science**, v. 108–109, p. 303–318, 2004.
- TAPIERO, H. et al. The antioxidant role of selenium and seleno compounds. **Biomed Pharmacother**, v. 57, p. 135–144, 2003.
- THANASUKARNA, P.; PONGSAWATMANITA, R. & MCCLEMENTS, D. Influence of emulsifier type on freeze-thaw stability of hydrogenated palm oil-in-water emulsions. **Food Hydrocolloids**, v. 18, p. 1033–1043, 2004.
- WAKELEE, H. & BELANI, C. P. Optimizing first-line treatment options for patients with advanced nscl. **Oncologist**, v. 10, p. 1–10, 2005.
- WANG, L. et al. Ethaselen: a potent mammalian thioredoxin reductase 1 inhibitor and novel organoselenium anticancer agent. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 52, p. 898–908, 2012.
- WEI, Y. et al. Seo2 induces apoptosis with down-regulation of bcl-2 and up-regulation of p53 expression in both immortal human hepatic cell line and hepatoma cell line. **Mutat Res**, v. 490, p. 113–121, 2001.
- WILCZYNSKA, J. D. et al. Study of the effect of selol and sodium selenite on hela cells in vitro. **CHEMIK**, v. 65, p. 110–114, 2011.
- ZHANG, H. et al. Hyperbranched poly(amine-ester) based hydrogels for controlled multi-drug release in combination chemotherapy. **Biomaterials**, v. 31, p. 5445–5454, 2010.
- ZHANG, J. et al. Comparison of short-term toxicity between nano-se and selenite in mice. **Life Sci J**, v. 76, p. 1099–1109, 2005.