



Universidade de Brasília

Universidade de Brasília

Instituto de Ciências Biológicas

Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal

Janaína Gomes Penteado

**ESTUDO DA EFICÁCIA DA ALUMÍNIO-CLORO-FTALOCIANINA
EM MICELAS APLICADA NA TERAPIA FOTODINÂMICA EM
CÉLULAS DE MELANOMA MURINO**

Brasília, DF

Março, 2016

Janaína Gomes Penteado

**ESTUDO DA EFICÁCIA DA ALUMÍNIO-CLORO-
FTALOCIANINA EM MICELAS APLICADA NA TERAPIA
FOTODINÂMICA EM CÉLULAS DE MELANOMA MURINO**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal da Universidade de Brasília, como requisito para obtenção do título de Mestre em Biologia Animal.

Orientadora: Profa. Dra. Mônica Pereira Garcia

Dedico esse trabalho
ao meu filho Gabriel,
aos meus pais,
aos meus avós
e aos meus irmãos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelo presente da vida, a saúde, a força e coragem para prosseguir no caminho correto da virtude, da tolerância, da generosidade, da amizade, do companheirismo, da gentileza, do respeito e do afeto. Obrigada meu Deus, por colocar tantas pessoas boas e outras nem tão boas, para que também pudesse aprender com elas!

Ao meu filho Gabriel....que desde sempre me apoia, me ajuda, me ajuda a enfrentar a vida, pois como filho, nunca reclamou das horas ausentes, dos dias intermináveis de trabalho, do meu cansaço. Agradeço a você meu filho, por todo o amor e compreensão as dificuldades que nós enfrentamos todos os dias!

Ao meu companheiro Sebastian.... Inside these pages you just hold me and I won't ever let you go. We made these memories for ourselves and wait for me to come home!!!

Aos meus pais, Nelson e Rosângela, por ser essa fonte inesgotável de apoio, motivação e amor. Obrigada por todas as oportunidades proporcionadas durante toda a minha vida...

Aos meus irmãos, Pablo e Felipe, minhas cunhadas , Isabella e Maria Luíza pelo apoio, carinho e amizade de sempre!

Aos meus avós, Armando e Rosicler, obrigada por terem me apoiado e dado o exemplo de luta, integridade e amor.



A construção de todo o meu trabalho de mestrado, foi possível por causa de pessoas especiais. Foram tantos grãos de areia colocados por tantas pessoas realmente me sinto extremamente grata por ter tido a oportunidade de conviver com pessoas que não

mediram os esforços para me ajudar e pelo conhecimento que cada um generosamente compartilhou comigo.

Agradeço a Professora Mônica Garcia, pela importante oportunidade que me foi concedida. Pela paciência, compreensão, apoio e confiança. Agradeço por todos os ensinamentos, pela amizade e pela confiança no meu trabalho. Obrigada Professora!!!!

A pessoa a qual tenho um profundo carinho e respeito, uma profunda gratidão por todo o apoio, carinho, gentileza, amizade, por engrandecer o meu espírito compartilhando toda sua experiência e sabedoria, por tornar meus dias mais alegres com um sorriso e um abraço cotidianos. Obrigada D. Zélia!! A Sra. não sabe o quão importante é e sempre será em minha vida.

À minha amada florzinha Rayane Ganassin, muito obrigada. Deus colocou você em minha vida e por isso sou muito grata. Hoje tenho uma filha de coração! Te amo Piu-Piu!!!

À querida Dra. Maria Luiza Fascineli pela alegria, amizade, disponibilidade e por todo o apoio.

À Professora Graziella Joanitti pela enorme paciência, gentileza e amizade. Posso dizer que encontrei a pessoa mais afável e gentil do mundo e que seu exemplo profissional é algo que me orgulha e emociona.

Aos Professores Aline Pic-Taylor, Carla, César Grisólia, Professora Susana Milhomen, agradeço por todo o carinho, apoio e respeito.

À Profesora Zulmira Lacava, que em muitos momentos difíceis, me ajudou com sua docura e delicadeza. Obrigada Professora por todas as palavras de carinho, incentivo. Pelos ensinamentos e por ser uma Lady.

Aos meus amados amigos, Mayara Simolely, Ludmila David, Khélida Loiane, Lúiza Yanny, Wània Guimarães, José filho, Ana Gouvea, Déborah Santos, muito obrigada por todo o amor, compreensão, carinho e ajuda que me foram ofertados. As palavras são poucas pra descrever, as ações também não são suficientemente grandes para agradecer por toda a amizade. Amo vocês!

À Karen Rappa Py-Daniel..."Eu tenho tanto pra lhe falar mas com palavras não sei dizer. Como é grande o meu amor por você! Nunca se esqueça, nem um segundo que eu tenho o amor maior do mundo. Como é grande o meu amor por você!"

E às demais pessoas que fizeram parte desta empreitada, muito obrigada!!!!

Felicidade é quando
o que você pensa,
o que você diz e
o que você faz
estão em harmonia.
“Mahatma Gandhi”

RESUMO

Entre os tipos de câncer de pele, o melanoma é responsável por 4% dos casos. É o mais agressivo, por possuir um alto potencial metastático. Como proposta para um tratamento mais eficiente e que cause menos danos estéticos, foi utilizada a Terapia Fotodinâmica (TFD) como um sistema que proporcionasse uma futura utilização por via tópica. No presente trabalho as micelas de Pluronic® F127 contendo 1, 5 e 10 µg/mL do fotossensibilizante alumínio-cloro-ftalocianina (NP F127/AICIPc), as micelas foram utilizadas para investigar os efeitos da TFD em células de melanoma murino. NP F127/AICIPc foram avaliadas quanto a sua estabilidade e caracterização fotofísica e fotoquímica. O diâmetro hidrodinâmico (DH) médio de NP F127/AICIPc com 1 µg/mL de ALCLPc foi de 22 nm ; 42,03 nm para 5 µg/mL e 152,9 nm para 10 µg/mL a ~25 °C. O índice de polidispersão foi 0,43 para 1 µg/mL; 0,68 para 5 µg/mL; 0,37 para 10 µg/mL, e o potencial zeta (PZ) de -2,71mV para 1 µg/mL; -0,11mV para 5 µg/mL e -0,58 mV para 10 µg/mL, mostrando que as micelas são polidispersas. NP F127/AICIPc apresentou máxima absorvância a 670 nm e fluorescência a 680 nm. Duas linhagens celulares foram utilizadas: B16F10 (melanoma murino) e B16F10FF (melanoma murino modificadas com FireFly Luciferase). Somente a irradiação com a luz LED ou a exposição das células a diferentes concentrações de NP F127/AICIPc não causaram toxicidade em ambas as linhagens celulares. Quando aplicada a TFD com fluência de 85,1 J/cm². Os resultados de citotoxicidade da NP F127/AICIPc, com vários tempos de incubação, mostrou uma maior eficácia em células B16F10 do que em células B16F10FF. A concentração de 1 µg/mL; 5 µg/mL; 10 µg/mL mostraram-se mais eficaz no tempo de incubação de 20 e 25 minutos para as células B16F10. Pelo mesmo tempo de exposição de 25 minutos, as células B16F10FF mostraram-se mais resistentes ao tratamento. A citotoxicidade sem irradiação e com irradiação do LED mostrou que as micelas não causaram toxicidade em ambas as linhagens celulares. As células expostas à NP F127/AICIPc nas concentrações de 1 µg/mL; 5 µg/mL; 10 µg/mL por 15, 20 e 25 minutos e irradiadas com a fluência de 85,1 J/cm², mostraram que células B16F10 tratadas com a NP F127/AICIPc 10 µg/mL

apresentaram viabilidade de 25%, enquanto as células B16F10FF sob as mesmas condições apresentaram viabilidade de 64%. A citotoxicidade nas células B16F10FF foi de 7% para o tempo de incubação de 20 minutos e de 3 a 4% nos tempos de 15 e 25 minutos, quando estas células sofreram duas incubações (24-48 horas) e duas aplicações de TFD (24-48 horas). Pode-se concluir então que, a NP F127/AICIPc apresentou características fotofísicas e fotoquímicas favoráveis para o seu uso da TFD.

Palavras chave: fotossensibilizante, Pluronic[®] F127, nanobiotecnologia, câncer de pele, nanopartículas poliméricas.

ABSTRACT

Melanoma accounts for 4% of cases among skin cancer types. But it is the most aggressive with a high metastatic potential. Photodynamic therapy (PDT) was used as an alternative efficient and less damage inducing treatment in comparison to chemotherapy for topical application. In the present work Pluronic[®] F127 micelles containing 1, 5 and 10 $\mu\text{g} / \text{mL}$ of the photosensitizer aluminum-chlorophthalocyanine (F127/AICIPc). The micelles were used to investigate the effects of PDT on murine melanoma cells. Their stability, photophysical characteristics and photochemistry was evaluated. The hydrodynamic diameter for the micelles carrying 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ was 22nm, 42.04nm and 152.9nm respectively. The poly dispersity index for the micelles with 1mg/mL, 5mg/mL and 10mg/mL were 0.43, 0.68 and 0.37 respectively. The zeta potential for the micelles with 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ F127/AICIPc were -2.7mV,-0.11mV and -0.58mV. The micelles showed maximum absorbance at 670nm and fluorescence at 680nm. Two cell lines were evaluated B16F10 (murine melanoma) and B16F10FF (murine melanoma modified with firefly luciferase). The irradiation of LED with light or with different concentration of F127 / AICIPc did not cause toxicity to both cell lines when the PDT fluent was 85.1 J / cm^2 . The cytotoxicity results of the micelles F127/AICIPc at various incubation times was more prominent with B16F10 than B16F10FF. The concentration of 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ were more effective against B16F10 cells when incubated for 20 minutes and 25 minutes. However, for B16F10FF cells they were resistant to treatment after 25 minutes of incubation. The cytotoxicity with either irradiation or without showed that the micelles did not cause toxicity to both cells. Upon exposure to 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for 15, 20 and 25 minutes and irradiation of fluency 85.1 J / cm^2 B16F10 presented a viability of 25% while B16F10FF had 64%. After incubation of 15, 20 and 25 minutes the cytotoxicity of B16F10FF cells was 3%, 7% and 4% respectively when the cells were incubated (24-48 hours) and PDT was applied twice (24-48 hours). It can be concluded that the micelles with F127 / AICIPc presented photophysical and photochemical characteristics favorable for use in photodynamic therapy.

Keywords: photosensitizer, Pluronic[®] F127, nanobiotechnology, skin cancer, polymeric nanoparticles.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01. Estimativas para o ano de 2016 do número de casos novos de câncer por regiões, no Brasil. Fonte: INCA, 2016

Figura 02. Estimativas de novos casos de câncer para o ano de 2016, no Brasil, segundo sexo e localização primária. Fonte: INCA, 2016.

Figura 03. Fases de progressão histopatológica na transformação de melanócitos.

Figura 04. Fotocarcinogênese do melanoma.

Figura 05. Diagrama dos níveis de energia de Jablonski para a terapia fotodinâmica (TFD).

Figura 06. Estrutura química da Alumínio-Cloro-Ftalocianina.

Figura 07. Diferentes vetores usados em nanomedicina aplicada ao transporte de fármacos, sendo alguns já utilizados em terapia clínica e pré-clínica

Figura 08. Representação de micelas de copolímeros em bloco de Pluronic[®] F127.

Figura 09. Esquema de preparação das amostras de micelas de pluronic F127 com diferentes concentrações de Alumínio-Cloro-Ftalocianina (AICIPc).

Figura 10. Esquema dos ensaios *in vitro* com células B16F10 e B16F10FF.

Figura 11. Esquema ilustrativo do LED em fluxo laminar utilizando um suporte de metal. Diodo emissor de luz com 85,1 J/cm² (LED) para irradiação de placa de 96 poços com células B16 F10 e B16F10FF.

Figura 12. Variação do Diâmetro Hidrodinâmico (DH) por dispersão dinâmica de luz (DLS) das micelas de Pluronic[®] F127, com ou sem fotossensibilizante armazenadas, sob as condições de 4 °C , ~25 °C e 37 °C.

Figura 13. Variação do Índice de Polidispersão (IPD) por dispersão dinâmica de luz (DLS) das micelas de Pluronic[®] F127, com ou sem fotossensibilizante armazenadas, sob as condições de 4 °C, ~25 °C e 37 °C.

Figura 14. Variação do Potencial Zeta (Pz) por dispersão de luz eletroforética das micelas de Pluronic[®] F127, com ou sem fotossensibilizante armazenadas, sob as condições de 4 °C, ~25 °C e 37 °C.

Figura 15. Variação do Potencial Hidrogeniônico (pH) das micelas de Pluronic[®] F127, com ou sem fotossensibilizante armazenadas, sob as condições de 4 °C (A), ~25 °C (B) e 37 °C (C) ao longo de 42 dias.

Figura 16. Espectro de absorção e de emissão de fluorescência com excitação a 360 nm de micelas de Pluronic[®] F127 sem fotossensibilizante e com 1 µg/mL de Alumínio-Cloro-Ftalocianina (NP F127/AICIPc), após a preparação.

Figura 17. Valores percentuais da densidade óptica referente ao decaimento da absorbância do 1,3-difenil-isobenzofurano (DBF) em relação ao tempo de exposição ao LED de micelas de Pluronic[®] F127 sem (NP F127) e com diferentes concentrações de Alumínio-Cloro-Ftalocianina.

Figura 18. Viabilidade de células de melanoma murino (B16F10) e de melanoma modificada para expressar luciferase (B16F10FF) expostas ou não por 10 minutos de irradiação de diodo emissor de luz (LED) a 85,1 J/cm², avaliada posteriormente pelo método MTT.

Figura 19. Viabilidade de células de melanoma murino, B16F10 (A) e de melanoma modificada para expressar luciferase, B16F10FF (B) expostas ou não (controle) às formulações de micelas de Pluronic[®] F127 com diferentes concentrações de Alumínio-Cloro-Ftalocianina.

Figura 20. Viabilidade de células de melanoma murino, B16F10 (A) e de melanoma modificada para expressar luciferase, B16F10FF (B) expostas ou não (controle) às formulações de micelas de Pluronic[®] F127 com diferentes concentrações de Alumínio-Cloro-Ftalocianina.

Figura 21. Viabilidade de células de melanoma murino modificadas para expressar luciferase, B16F10FF expostas ou não (controle) às formulações de micelas de Pluronic[®] F127 com diferentes concentrações de Alumínio-Cloro-Ftalocianina.

Figura 22. Perfil de resposta das células B16F10FF, dependente de tempo após o tratamento com TFD, gerado pelo RTCA.

LISTA DE TABELAS

Tabela 01: Taxas brutas de incidência por 100 mil habitantes e o número de casos novos de câncer, segundo sexo e localização primária*, para o ano de 2016.

Tabela 02: Lista de Equipamentos utilizados.

Tabela 03: Lista de Materiais utilizados.

Tabela 04: Reagentes utilizados.

Tabela 05: Relação da preparação das amostras de micelas de pluronic F127 com diferentes concentrações de Alumínio-Cloro-Ftalocianina (AICIPc).

Tabela 06: Valores médios do diâmetro hidrodinâmico (DH), do índice de polidispersão (IPD), do potencial zeta (Pz) e do potencial hidrogeniônico (pH) logo após o preraro.

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

$^1\text{O}_2$	Oxigênio singleto
AICIPc	Alumínio-Cloro-Ftalocianina
ANOVA	Análise de variância
CMC	Concentração Micelar Crítica
CMT	Temperatura Crítica de Miscelização
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
ERO	Espécies reativas de oxigênio
FS	Fotossensibilizante
LED	Diodo emissor de luz
MTT	Brometo de 3(4,5 dimetiltiazol-2il)- 2,5-difenil-tetrazólio
PBS	Tampão fosfato salina
SFB	Soro fetal bovino
TFD	Terapia Fotodinâmica

Sumário

1.INTRODUÇÃO	1
1.1 O Câncer	2
1.2 O Câncer de pele	3
1.3 A origem do câncer de pele não-melanoma e melanoma	8
1.4 Os tratamentos para o melanoma	11
1.5 A nanotecnologia.....	16
1.6 A terapia fotodinâmica.....	17
1.7 Os fotossensibilizantes.....	20
1.8 Alumínio-Cloro-Ftalocianina	21
1.9 Micelas de Pluronic® F127	23
1.10 Justificativa.....	28
2. OBJETIVO	29
2. 1 Objetivos específicos	29
3. MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1. Equipamentos, materiais e reagentes	30
3.2. Preparação de micelas de Pluronic® F127 com alumínio-cloro-ftalocianina (NP F127/AICIPc).....	32
3.3. Caracterização e avaliação da estabilidade coloidal das micelas de Pluronic® F127 com Alumínio-Cloro-Ftalocianina (NP F127/AICIPc)	34
3.4. Caracterização fotofísica das micelas de Pluronic® F127 com Alumínio-Cloro-Ftalocianina (NP F127/AICIPc).....	35
3.5. Avaliação da Geração de Oxigênio Singleto pelas micelas de Pluronic® F127 com Alumínio-Cloro-Ftalocianina (NP F127/AICIPc)	36
3.6. Ensaio biológico in vitro	36
3.6. Linhagens celulares	37
3.6.2. Manutenção e passagem das células	38
3.6.3. Contagem de células.....	39
3.6.4. Avaliação da viabilidade celular pelo ensaio do MTT	39
3.6.5. A fonte luminosa LED (Light Emitting Diode)	40
3.6.6. Determinação da toxicidade do LED na viabilidade celular.....	41

3.6.7. Determinação da toxicidade das micelas de Pluronic [®] F127 com Alumínio-Cloro-Ftalocianina (NP F127/AICIPc) na viabilidade celular.....	42
3.6.8. Avaliação da Terapia Fotodinâmica mediada por micelas de Pluronic [®] F127 com Alumínio-Cloro-Ftalocianina (NP F127/AICIPc)	43
3.6.9. Avaliação da eficácia de duas sessões de Terapia Fotodinâmica mediada por micelas de Pluronic [®] F127 com Alumínio-Cloro-Ftalocianina (NP F127/AICIPc)	43
3.6.10. Avaliação da eficácia de duas sessões de Terapia Fotodinâmica mediada por micelas de Pluronic [®] F127 com Alumínio-Cloro-Ftalocianina (NP F127/AICIPc), analisando a dinâmica de proliferação celular.....	45
3.7. Análise Estatística	46
4. RESULTADOS.....	46
4.1. Caracterização coloidal das micelas de Pluronic [®] F127 com Alumínio-Cloro-Ftalocianina (NP F127/AICIPc).....	46
4.2. Avaliação da estabilidade coloidal das micelas de Pluronic [®] F127 com Alumínio-Cloro-Ftalocianina (NP F127/AICIPc)	48
4.3. Caracterização fotofísica das micelas de Pluronic [®] F127 com Alumínio-Cloro-Ftalocianina (NP F127/AICIPc).....	55
4.4. Avaliação da Geração de Oxigênio Singleto pelas micelas de Pluronic [®] F127 com Alumínio-Cloro-Ftalocianina (NP F127/AICIPc)	56
4.5. Determinação da toxicidade do LED na viabilidade celular	58
4.6. Determinação da toxicidade das micelas de Pluronic [®] F127 com Alumínio-Cloro-Ftalocianina (NP F127/AICIPc) na viabilidade celular.....	58
4.7. Avaliação da Terapia Fotodinâmica mediada por micelas de Pluronic [®] F127 com Alumínio-Cloro-Ftalocianina (NP F127/AICIPc)	61
4.8. Avaliação da eficácia de duas sessões de Terapia Fotodinâmica mediada por micelas de Pluronic [®] F127 com Alumínio-Cloro-Ftalocianina (NP F127/AICIPc)...	64
4.9. Avaliação da eficácia de duas sessões de Terapia Fotodinâmica mediada por micelas de Pluronic [®] F127 com Alumínio-Cloro-Ftalocianina (NP F127/AICIPc), analisando a dinâmica de proliferação celular.....	66
5. DISCUSSÃO	69
6. CONCLUSÃO	78
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82

1.INTRODUÇÃO

O câncer de pele apesar de ter uma baixa incidência, tem uma alta letalidade devido ao alto potencial metastático destas células tumorais. O tratamento padrão é a remoção cirúrgica do melanoma primário, seguido ou não, da quimioterapia, ou radioterapia ou ainda imunoterapia. Dentre as principais drogas citotóxicas utilizadas no tratamento do melanoma está a Dacarbazina e a Temozolida, que muitas vezes são utilizados em combinação com Carmustina, Cisplatina, Vimblastina ou Tamoxifeno. Embora esta terapêutica continue tendo imensas desvantagens, pois estes agentes quimioterapêuticos convencionais são bastante inespecíficos, com uma elevada toxicidade, resultando em uma dose subterapêutica (devido à baixa acumulação tumoral), o protocolo de quimioterapia para o melanoma ainda é utilizado.

A terapia fotodinâmica (TFD) é uma modalidade terapêutica não invasiva, de baixo custo e que não necessita de internação do paciente e surge como um promissor tratamento contra o câncer. Juntamente com a TFD, a utilização do fotossensibilizante Alumínio-Cloro-Ftalocianina carregado por micelas de Pluronic®-F127 torna-se uma ferramenta potencial, pois se trata de uma terapia com alta eficiência que surge como uma importante inovação na terapia antineoplásica. Fotosensibilizantes carregados por um sistema nanoestruturado possuem vantagens farmacocinéticas bastante relevantes, como o nível de absorção do FS em células tumorais potencializados pela TFD. O Pluronic® possui boa biocompatibilidade e biodegradação. Fatores que contribuem para uma terapia mais eficiente e com menos efeitos colaterais. Assim, a avaliação da eficácia deste sistema no tratamento do melanoma é de fundamental importância na busca de novas e melhores modalidades terapêuticas.

1.1 O Câncer

O câncer é o nome utilizado para designar um grupo de mais de 100 doenças que têm em comum a proliferação celular desordenada. Segundo HANAHAN & WEINBERG (2000), como a formação de um tumor envolve múltiplas etapas, ao longo desse processo as células passam por alterações genéticas que incluem: insensibilidade aos sinais inibidores do crescimento; potencial infinito de replicação; evasão à morte celular e dos mecanismos de defesa imune; indução persistente da angiogênese e capacidade de invadir e colonizar outros tecidos, ou seja, originar metástases.

A capacidade de fundar colônias em locais distantes é a característica mais perigosa do câncer, pois as metástases são responsáveis por 90% dos óbitos causados pelo câncer (HANAHAN & WEINBERG, 2000). Segundo CILLIA e colaboradores (2010) análises moleculares demonstraram que muitos cânceres surgem de lesões precursoras não neoplásicas que já possuem algumas das mutações necessárias para se estabelecer plenamente um câncer. Estes mesmos autores afirmam que os cânceres sofrem seleção darwiniana, pois essas mutações proporcionam vantagens seletivas às células da lesão precursora.

O crescimento excessivo, a invasividade local e a capacidade de formar metástases distantes, são atributos fenotípicos das neoplasias malignas, bem como, a capacidade de se tornarem mais agressivos e adquirem maior potencial maligno após algum período de tempo. Esse fenômeno é denominado de *progressão tumoral* e não é representado pelo aumento do tamanho do tumor (KANG *et al*, 2000).

Estudos clínicos e experimentais revelam que a malignidade tumoral muitas vezes está associada à progressão celular e a heterogeneidade associadas, resultando em múltiplas mutações que se acumulam independentemente em diferentes gerações de células. Essas passam a apresentar a capacidade de invadir outros tecidos, taxa de crescimento diferenciada, capacidade metastática, responsividade hormonal e suscetibilidade à drogas antineoplásicas (COGHLIN & MURRAY, 2010).

Esta doença representa um enorme problema de saúde pública, pois é a principal causa de morte nos países desenvolvidos economicamente e é a segunda principal causa de morte em países em desenvolvimento (JEMAL *et al*, 2011). No ano 2014, o número de pessoas diagnosticadas com câncer no mundo somou mais de 14 milhões e é esperado que o número de novos casos aumente em 70% ao longo dos próximos 20 anos (FORMAN *et al*, 2014) e espera-se para 2030, 27 milhões de casos novos de câncer (World Cancer Report, 2008). Segundo a Organização Mundial de Saúde, a maior incidência do câncer vem sendo impulsionada por uma rápida mudança no estilo de vida dos países em desenvolvimento, que cada vez mais se assemelha ao dos países industrializados e o impacto do câncer nesses países, corresponderá a 80% dos mais de 20 milhões de casos novos estimados para 2025 (OMS, 2016); (WHO, 2015).

1.2 O Câncer de pele

A estimativa para o Brasil em 2016-2017, aponta a ocorrência de 600 mil novos casos de câncer. À exceção do câncer de pele não melanoma (~180 mil casos novos), ocorrerão cerca de 420 mil casos novos de câncer. O perfil epidemiológico observado assemelha-se ao da América Latina e do Caribe. Os tipos mais frequentes de câncer em homens serão o de próstata (28,6%), de pulmão (8,1%), intestino (7,8%), de estômago (6,0%) e da cavidade oral (5,2%). Nas mulheres, os cânceres de mama (28,1%), de intestino (8,6%), de colo do útero (7,9%), de pulmão (5,3%) e de estômago (3,7%) serão os principais.

Dentre os diferentes tipos de câncer, destacam-se os de pele, devido, principalmente, a sua alta incidência na população; no Brasil, o câncer de pele representa 25% de todos os cânceres (Sociedade Brasileira de Dermatologia, 2015). Segundo as estimativas 2016/2017 do Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, INCA, as estimativas de incidência de câncer de pele, no Brasil, são de 596 mil casos de câncer. Entre os homens, são esperados 295.200 casos, e entre as mulheres, 300.800 (Figura 01).



Figura 01. Estimativas para o ano de 2016 do número de casos novos de câncer por regiões, no Brasil. Fonte: INCA, 2016

Existem três tipos de câncer de pele. O carcinoma basocelular (CBC), também conhecido como carcinoma de células basais; o carcinoma espinocelular (CEC), também conhecido como carcinoma de células escamosas e o melanoma. O CBC é o mais prevalente dentre todos os tipos de câncer, porém com baixa letalidade, podendo ser curado em caso de detecção precoce. Os CBCs se desenvolvem principalmente em áreas do corpo mais expostas ao sol, como face, ombros e costas, sendo que a exposição ao sol não é o único fator desencadeador da doença. O tipo mais encontrado de CBC é o nódulo-ulcerativo, que se traduz como uma pápula vermelha brilhosa, com crosta central, que pode sangrar com facilidade (Sociedade Brasileira de Dermatologia, 2014).

O CEC é o segundo mais prevalente dos cânceres de pele. Pode se desenvolver em todas as partes do corpo, embora seja mais comum nas áreas expostas ao sol. O local da lesão apresenta enrugamento, mudanças na pigmentação e perda da elasticidade. Coloração avermelhada, ferida espessa e descamativa de difícil cicatrização são algumas das características desta malignidade. O CBC e o CEC, juntos, são denominados câncer de pele não-melanoma (Sociedade Brasileira de Dermatologia, 2014).

De acordo com o INCA (2016), a estimativa de novos casos de câncer de pele melanoma em homens a estimativa é de 990 novos casos na região Sul; 1.160 novos casos em homens e 1.100 em mulheres na região Sudeste; 210 novos casos em homens e 150 em mulheres na região Centro-Oeste; 550 novos casos em homens e 390 em mulheres na região Nordeste; 90 novos casos em homens e 70 em mulheres na região Norte (Figura 2).



Figura 02. Estimativas de novos casos de câncer para o ano de 2016, no Brasil, segundo sexo e localização primária. Fonte: INCA, 2016.

O melanoma, cuja incidência, apesar de baixa, menos de 4% dos casos no Brasil, (Sociedade Brasileira de Cirurgia Dermatológica, 2015) sua incidência está aumentando no mundo inteiro e constitui a maioria dos casos de morte por câncer de pele; sendo o de pior prognóstico. Em geral, tem a aparência de um nevo ou de um sinal na pele, em tons acastanhados ou enegrecidos. Porém, mudam de cor, de formato ou de tamanho, e podem causar sangramento. No Brasil, cerca de 0,15% de todas as neoplasias malignas correspondem ao melanoma, com uma estimativa de

3.000 (1,4%) novos casos em homens e 2.670 (1,3%) em mulheres para o ano de 2016 (Tabela 01). As mais altas taxas de incidência de câncer de pele, melanoma e não melanoma, foram observadas em países com população caucasiana. Mais de 80% dos diagnósticos de melanomas e 65% dos óbitos por esse câncer foram verificados na Oceania, Europa e América do Norte (INCA, 2016).

Tabela 1: Taxas brutas de incidência por 100 mil habitantes e o número de casos novos de câncer, segundo sexo e localização primária*, para o ano de 2016.

Localização Primária Neoplasia Maligna	Estimativa dos Casos Novos							
	Homens				Mulheres			
	Estados		Capitais		Estados		Capitais	
	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta
Próstata	61.200	61,82	13.940	64,93	-	-	-	-
Mama Feminina	-	-	-	-	57.960	56,20	18.990	79,37
Colo do Útero	-	-	-	-	16.340	15,85	4.550	19,07
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.330	17,49	4.430	20,59	10.890	10,54	3.230	13,49
Cólon e Reto	16.660	16,84	5.560	25,80	17.620	17,10	6.210	25,95
Estômago	12.920	13,04	3.130	14,54	7.600	7,37	2.180	9,07
Cavidade Oral	11.140	11,27	2.780	12,95	4.350	4,21	1.230	5,04
Laringe	6.360	6,43	1.600	7,50	990	0,94	320	0,97
Bexiga	7.200	7,26	2.110	9,79	2.470	2,39	830	3,21
Esôfago	7.950	8,04	1.460	6,75	2.860	2,76	610	2,27
Ovário	-	-	-	-	6.150	5,95	2.170	8,92
Linfoma de Hodgkin	1.460	1,46	450	1,74	1.010	0,93	400	1,33
Linfoma não Hodgkin	5.210	5,27	1.550	7,15	5.030	4,88	1.670	7,02
Glândula Tireoide	1.090	1,08	350	1,27	5.870	5,70	1.800	7,46
Sistema Nervoso Central	5.440	5,50	1.290	5,86	4.830	4,68	1.250	5,20
Leucemias	5.540	5,63	1.370	6,38	4.530	4,38	1.180	4,88
Corpo do Útero	-	-	-	-	6.950	6,74	2.530	10,47
Pele Melanoma	3.000	3,03	840	3,86	2.670	2,59	740	2,96
Outras Localizações	51.850	52,38	11.890	55,45	47.840	46,36	11.820	49,33
Subtotal	214.350	216,48	52.750	245,63	205.960	199,57	61.710	257,55
Pele não Melanoma	80.850	81,66	17.370	80,90	94.910	91,98	21.910	91,65
Todas as Neoplasias	295.200	298,13	70.120	326,51	300.870	291,54	83.620	348,99

*Números arredondados para múltiplos de 10.

O melanoma é definido por critérios patológicos e clínicos. Histologicamente, a classificação de melanoma reflete a localização e/ou a profundidade (Figura 03). Por exemplo, o melanoma *in situ*, é caracterizado pelo padrão de crescimento radial que é primariamente confinado à epiderme. Em contraste, a "fase de crescimento vertical" de um melanoma maligno denota uma transição para uma condição mais

agressiva e letal, a qual é caracterizada pela invasão do tumor na derme e hipoderme e muitas vezes é indicativo de metástase para locais distantes (ELDER, 1987). A busca de prognósticos futuros da doença metastática e sobrevivência tem sido uma grande preocupação. Entre os muitos fatores avaliados, a espessura total do tumor independente surgiu como o mais determinante prognóstico para melanomas não-metastáticos (CHIN *et al.*, 1998).

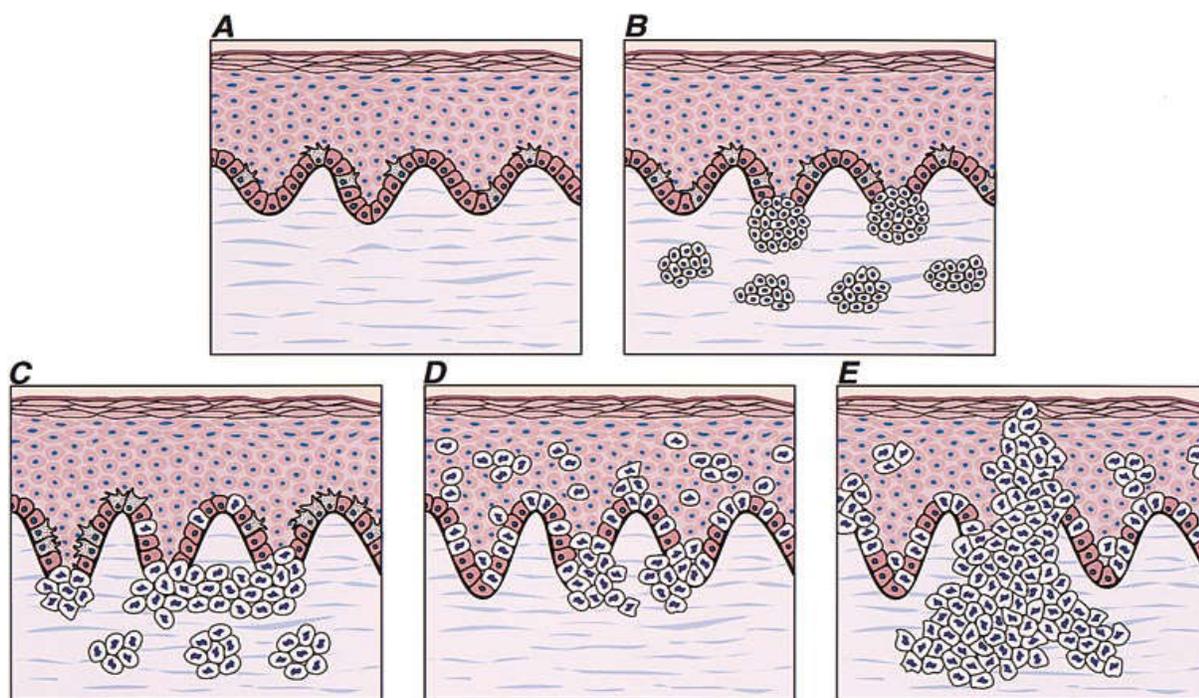


Figura 03. Fases de progressão histopatológica na transformação de melanócitos. **A-** Pele normal. Observa-se a distribuição uniforme dos melanócitos dendríticos em toda a camada basal. **B-** Proliferação benigna dos melanócitos. **C-** Displasia de melanócitos. Nota-se a irregularidade e grandes melanócitos atípicos em um nevo displásico. **D-** No melanoma *in situ*, fase de crescimento radial (RGP). Observam-se células individuais na camada superior da epiderme (propagação). **E-** Melanoma maligno, fase de crescimento vertical (VGP). Adaptado de CHIN *et al.*, 1998.

Apesar da longa história de reconhecimento clínico e enormes esforços na classificação patológica, a precisão de mecanismos patogênicos que conduzem ao melanoma ainda não são bem compreendidos. Várias características desta doença

forneceram evidências para etiologias genéticas e epigenéticas. É igualmente claro que a cor da pele é um importante modificador do risco de melanoma. Indivíduos de pele escura têm substancialmente menores riscos de incidência de melanoma do que as populações de pele clara, dados os mesmos níveis de exposição aos raios UV (BARNHILL *et al.*, 1993).

A chance de cura dessa doença está diretamente relacionada ao diagnóstico e ao tratamento no início do seu desenvolvimento, quando ainda afeta apenas a pele, o chamado melanoma primário. Em estágios mais avançados, ele pode se espalhar para outros órgãos, o chamado melanoma metastático, tornando a cura difícil, sendo que somente 12% dos pacientes com melanoma metastático sobrevivem mais de cinco anos (FIGUEIREDO *et al.*, 2003).

1.3 A origem do câncer de pele não-melanoma e melanoma

O Melanoma é derivado da transformação maligna de melanócitos, células fenotipicamente importantes, pois são responsáveis pela produção da melanina, promovendo a pigmentação da pele e pelos. A melanina além de contribuir para a tonalidade cutânea, também confere proteção direta aos danos causados pela radiação solar UV (TSAO *et al.*, 2015). Os melanócitos são células dendríticas, embriologicamente derivadas dos melanoblastos, os quais se originam da crista neural. Após o fechamento do tubo neural, estas células migram para diversos locais: olhos (epitélio pigmentar da retina, íris e coróide), ouvidos (estrias vasculares), sistema nervoso central (leptomeninges), matriz dos pelos, mucosas e pele (BOISSY, 1988; SULLAIMON & KITCHELL, 2003).

Na pele (Figura 04) a melanina é doada aos queratinócitos, as células localizadas na região basal da epiderme, onde os seus núcleos estão protegidos fisicamente contra a radiação ultravioleta. Este tipo de radiação ao incidir nos melanócitos pode ser absorvida pela melanina; quando isso acontece ela transfere parte de sua energia para moléculas de oxigênio, gerando oxigênio singleto (LIANG *et al.*, 2014), estes por sua vez podem oxidar biomoléculas tais como lipídios, proteínas, aminoácidos, ácidos nucleicos e carboidratos (RONSEIN *et al.*,

2006; PLAETZER *et al*, 2003; ROBERTSON *et al*, 2010), desencadeando cascatas de sinalização celular que ativam ou inibem a apoptose ou induzem a proliferação.

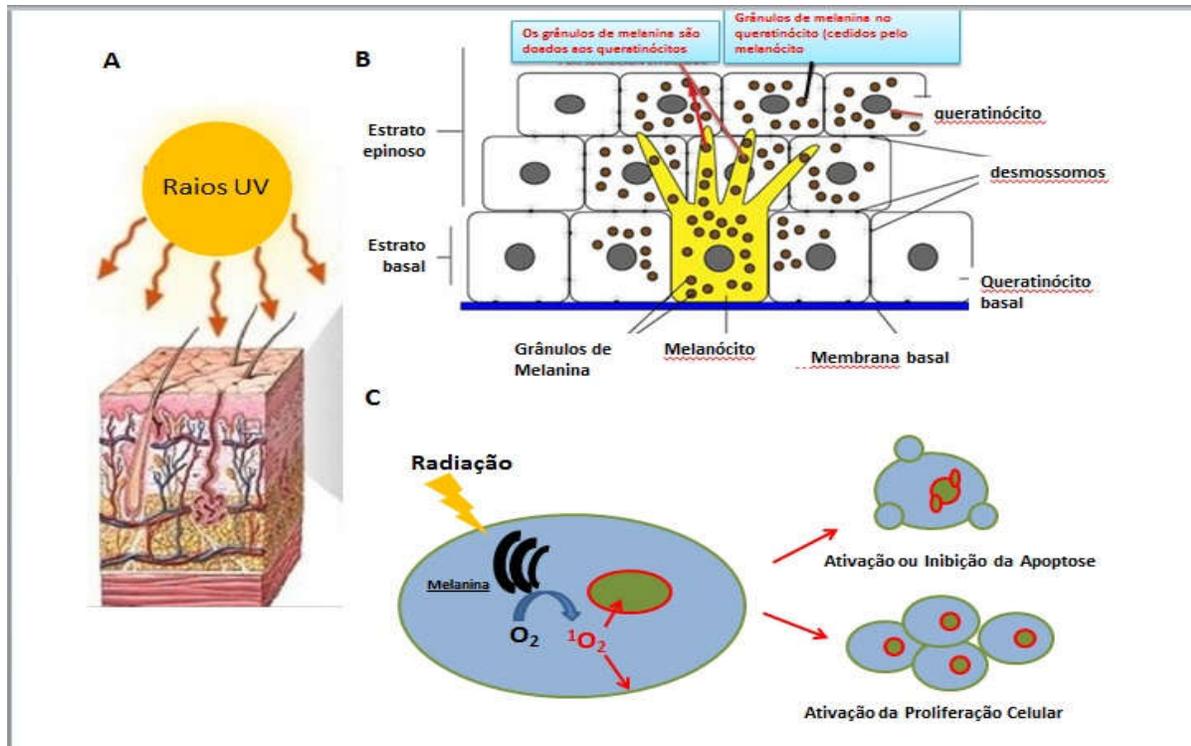


Figura 04. Fotocarcinogênese do melanoma. **A-** A radiação solar ultravioleta (UV) incidindo sobre a pele. **B-** Esquema da epiderme, destacando o melanócito basal contendo grânulos de melanina e doando estes grânulos aos queratinócitos do estrato espinoso. **C-** Se o processo de biossíntese da melanina pelos melanócitos não é regulada adequadamente ou após exposição excessiva da radiação UV, ocorre um aumento da geração do estresse oxidativo e de subprodutos metabólicos que podem ser citotóxicos ao DNA causando genotoxicidade e/ou danos mutagênicos nos melanócitos afetados, favorecendo assim a transformação inicial da célula e posteriormente, promovendo a progressão para o câncer a partir da transformação dos melanócitos (Adaptado de Baptista *et al*, 2014 e Warszawik-Hendzel *et al*, 2014).

Além disso, há evidências de que, se o processo de biossíntese da melanina pelos melanócitos não é regulado adequadamente, a capacidade de geração de

estresse oxidativo e subprodutos metabólicos é aumentada. Estes subprodutos podem ser citotóxicos ao DNA causando genotoxicidade e/ou danos mutagênicos nos melanócitos afetados, favorecendo assim a transformação inicial da célula e posteriormente, promovendo a progressão para o câncer a partir da transformação dos melanócitos (WARSZAWIK-HENDZEL *et al*, 2014).

O melanócito por meio da expansão de seu citoplasma, pode interagir com até 36 queratinócitos simultaneamente. Os melanosomas, organela específica que sintetiza o pigmento melanina, transferem dos melanócitos para os queratinócitos das camadas suprabasais, gerando o processo de pigmentação da epiderme (HAASS & HERLYN, 2005; LI & HERLYN, 2001). Após o processo de adesão, os queratinócitos controlam o crescimento e a expressão de receptores na superfície dos melanócitos. Uma grande parte dos melanomas surge dentro da epiderme (melanoma *in situ*) invadindo então a membrana basal. Células tumorais podem se evadir dos queratinócitos pelos seguintes mecanismos: 1) diminuição da expressão de importantes receptores na comunicação de queratinócitos, como a E-caderina, P-caderina desmogleína e conexinas, geradas por fatores de crescimento como o fator de crescimento dos hepatócitos, a endotelina-1, fator de crescimento derivado das plaquetas e produzidos por fibroblastos e queratinócitos; 2) a N-caderina, MEL-CAM e proteína-1 de zonula de oclusão, que agem na regulação de receptores e moléculas de sinalização importantes para interações de células de melanoma-melanoma e fibroblasto-melanoma; 3) a desregulação de morfógenos como os receptores de Notch e seus ligantes; 4) gerar a perda de ancoragem à membrana basal devido a alteração de moléculas de adesão célula-matriz; 5) superprodução de metaloproteinases (FIGUEIREDO *et al.*, 2003).

Como descrito anteriormente, muitos são os fatores que influenciam o aparecimento, crescimento, invasão e metástases nos tumores. Estes fatores podem ter várias origens, podendo estar associados a alterações em determinadas regiões genômicas, por exemplo, bem como a antígenos, interação entre células e vascularização.

A radiação solar ultravioleta (UV) é considerada como um importante fator etiológico do câncer de pele melanoma e não-melanoma, sendo que evidências indicam que o estresse oxidativo nas células, gerado pela exposição a radiação UV, está envolvido na fotocarcinogênese. Espécies reativas de oxigênio participam de inúmeros processos patofisiológicos, incluindo danos no DNA e peroxidação lipídica (LPO) e são considerados como sendo um fator determinante na progressão tumoral (MARITIM *et al*, 2003).

A radiação ultravioleta também pode reagir com os precursores da melanina, sendo esta reação mais intensa com o precursor feomelanina (encontrado nas células de pessoas ruivas ou loiras) do que com a eumelanina, precursora da melanina em peles negras (PREMI, *et al*, 2015). Isso explica o fato de que em países tropicais, onde há alta incidência de sol, populações com uma grande pigmentação produzem o precursor eumelanina e raramente desenvolvem cânceres de pele (melanoma ou não) ao passo que as pessoas de pele clara que, produzem feomelanina, vivendo em países onde há alta ou baixa incidência de sol, são mais suscetíveis ao câncer de pele, melanoma ou não (PREMI, *et al*, 2015).

1.4 Os tratamentos para o melanoma

O tratamento adequado e eficaz e o diagnóstico correto são essenciais visto que para cada tipo de melanoma, é necessário um tratamento específico, que pode incluir um ou mais métodos. O tratamento padrão é a remoção cirúrgica do melanoma primário, seguido ou não, da quimioterapia, ou radioterapia ou ainda imunoterapia (HOU *et al*, 2015). A escolha das modalidades terapêuticas usadas depende principalmente do estágio do câncer. Por exemplo, quando há metástase, o local do tumor e outros fatores, como estado geral de saúde do paciente também são considerados (PULIDO, 2007).

O melanoma em estágio 0 ou melanoma *in situ* invade apenas a camada mais externa da pele e geralmente é removido cirurgicamente para remover a lesão ou o nevu. O mesmo é feito para o melanoma no estágio 1 e 2, aqueles em que a lesão tem até 1 mm (estágio 1) ou mais de 1 mm (estágio 2) mas não se espalhou para

os nódulos linfáticos. Quando o melanoma está no estágio 0 ou 1, os problemas estéticos e emocionais ao paciente não são tão severos. Sendo que para os estágios 0, 1 e 2, o tratamento além de cirúrgico, também utiliza a quimioterapia com ou sem radioterapia. Porém, melanoma no estágio 2 ou 3, muitas vezes, requer uma segunda ou concomitante cirurgia reconstrutora, principalmente no rosto e nas mãos. O melanoma em estágio 3, em que a doença se espalhou para os nódulos linfáticos, o tratamento inclui cirurgia para remoção do melanoma primário e de todos os nódulos linfáticos próximos e imunoterapia.

No melanoma estágio 4, a doença se espalhou para além da área inicial do câncer e os nódulos linfáticos próximos, talvez para o fígado, o cérebro ou os ossos. O tratamento pode incluir cirurgia, radioterapia, quimioterapia, ou imunoterapia. A intervenção cirúrgica pode acontecer não só no local da lesão inicial (melanoma primário), mas também para a retirada de linfonodos (nódulos linfáticos) sentinelas e lesões em outros órgãos.

Nódulos linfáticos inchados ou sensíveis podem ser um sinal de que o melanoma se espalhou. Qualquer nódulo linfático inchado deve ser removido e examinado. Quando ocorre o estágio 4 (metastático) há uma dificuldade no sucesso do tratamento devido ao elevado grau de comprometimento de outros tecidos. De um modo geral, o objetivo do tratamento neste estágio é controlar os sintomas, reduzir as complicações e aumentar o conforto (tratamento paliativo), não indicando que há a intenção de cura da doença (DEUTSCH *et al*, 2015).

O sistema descrito por Breslow e Clark ajudam a classificar a invasividade do tumor pela medição da profundidade das células tumorais dadas em milímetros por exames histopatológicos e correlaciona com o nível anatômico de invasão no tecido, porém apesar de oferecer mais informação, o sistema descrito pode tornar-se complicado já que pode não ter reprodutibilidade. A probabilidade de não haver reprodutibilidade é dada pelos diferentes tipos de melanoma, com ou sem a presença de melanina e da variedade dos tecidos afetados (BARNHILL & LEVY, 1993). Segundo o sistema descrito por Clark (GON *et al.*, 2001), a classificação dos níveis de invasão da melanina são: nível-I, crescimento intra-epidérmico; nível-II, invasão da derme papilar; nível-III, atinge o limite entre a derme papilar e reticular;

nível-IV, invasão da derme reticular e nível-V, invasão subcutânea. Essas informações são importantes uma vez que o tratamento quimioterápico ou cirúrgico é baseado nas informações geradas pelos sistemas de Breslow e Clark.

No caso do tratamento quimioterápico, este utiliza drogas citotóxicas de modo a eliminar as células neoplásicas, esses medicamentos podem ser administrados sozinhos ou em combinação com outras drogas. Nesse caso a(s) droga(s) é administrada por via endovenosa, em ciclos, com cada período de tratamento seguido por um período de descanso. Cada ciclo de quimioterapia dura em geral de 2 a 3 semanas. Mesmo reduzindo o tamanho dos tumores, o efeito da quimioterapia, muitas vezes, é apenas temporário, em média três a seis meses antes da doença voltar a progredir. No caso de recidiva ela ocorre na própria cicatriz da cirurgia ou próximo ao tumor original. Em geral, as recidivas locais são tratadas com uma cirurgia similar a que se recomenda para o melanoma primário (VAN BEEK *et al*, 2015).

Dentre as principais drogas citotóxicas utilizadas no tratamento do melanoma está a Dacarbazina e a Temozolida, que muitas vezes são utilizados em combinação com Carmustina, Cisplatina, Vimblastina ou Tamoxifeno. (PEER *et al.*, 2007). Esta terapêutica continue tendo imensas desvantagens, pois os agentes quimioterapêuticos convencionais são bastante inespecíficos, com uma elevada toxicidade e resultando numa dose subterapêutica (devido à baixa acumulação tumoral). A quimioterapia também pode ser utilizada em combinação com a imunoterapia (GOYDOS *et al*, 2006).

O tratamento radioterápico do melanoma utiliza radiações ionizantes para destruir células tumorais que tenham permanecido após excisão da lesão, para reduzir a chance de uma recidiva. No entanto, a radioterapia é pouco utilizada para o tratamento de melanoma (GOYDOS *et al*, 2006).

O tratamento do câncer que promove a estimulação do sistema iminológico, por meio do uso de substâncias modificadoras da resposta biológica, é denominado imunoterapia.

Há muito tempo se conhece a relação entre competência imunológica e evolução da doença maligna, especialmente a redução da atividade das células

supressoras tem sido demonstrado em pacientes com câncer de ovário, neuroblastoma e carcinoma hepatocelular. A produção de anticorpos está relacionada com os linfócitos B, enquanto a imunidade mediada por células se relaciona com os linfócitos T. Os monócitos e os macrófagos também são células do sistema imune e facilitam a atividade dos linfócitos T e de modificadores da resposta biológica, como as interleucinas. Mais de setenta atividades biológicas diferentes são mediadas por produtos de linfócitos, monócitos e macrófagos. Esses mediadores podem ser classificados como fatores auxiliares, supressores, reguladores do crescimento e citotóxicos (SCHMERLING & BUZAID, 2013).

A imunoterapia é classificada em ativa e passiva, de acordo com as substâncias utilizadas e seus mecanismos de ação. Na imunoterapia ativa, substâncias estimulantes e restauradoras da função imunológica (imunidade inespecífica) e as vacinas de células tumorais (imunoterapia específica) são administradas com a finalidade de aumentar a resistência ao crescimento tumoral. As vacinas e soros são produzidos a partir de culturas de células tumorais coletadas do próprio paciente ou de outro paciente com neoplasia semelhante.

Na imunoterapia passiva ou adotiva, anticorpos antitumorais ou células mononucleares são administrados com o objetivo de proporcionar o aumento da capacidade imunológica. Na imunoterapia passiva são utilizados agentes imunomoduladores como: a) anticorpos monoclonais, tais como o Ipilimumab, um anticorpo anti-proteína 4 de linfócitos T citotóxicos (CTLA4) ou o Bevacicumab, um anticorpo anti-fator de crescimento endotelial vascular (VEGF); b) citocinas, como a interleucina-2 e o interferon recombinantes; c) inibidores de transdução de sinal, como os inibidores de braf (Dabrafenib, Ipilimumabe) e de MEK (Trametinibe, Vemurafenibe, Trametinibe); ou d) terapia baseada nas vacinas (GOYDOS *et al*, 2006), (GARBE *et al*, 2015), (Cancer Research UK, 2015), (National Cancer Institut, 2015).

Cerca da metade dos casos de câncer de pele melanoma têm mutações no gene *braf*. Estas alterações fazem com que as células do melanoma cresçam e se dividam rapidamente. Os medicamentos Dabrafenib e Ipilimumabe provocam a

diminuição do tamanho dos tumores em cerca da metade dos pacientes cujo melanoma metastático tem a alteração no gene *braf*.

Estes medicamentos são administrados via oral, duas vezes ao dia. Os efeitos adversos mais comuns são dor nas articulações, fadiga, perda de cabelo, erupção cutânea, prurido, sensibilidade ao sol e náuseas, problemas cardíacos, hepáticos, oculares e na pele, além de insuficiência renal, reações alérgicas e aumento dos níveis de açúcar no sangue.

O gene *mek* está na mesma via de sinalização que o gene *braf*, de modo que os medicamentos que bloqueiam a proteína MEK também ajudam no tratamento de melanomas com alterações no gene *braf*. Os medicamentos que bloqueiam a proteína MEK e os inibidores de transdução de sinal, como os inibidores de *braf*, quando usados isoladamente, não parecem não reduzir muitos melanomas como os inibidores de BRAF, embora ainda possa ajudar alguns pacientes. Outra abordagem é combiná-lo com um inibidor de BRAF, na esperança de reduzir os tumores por maior período de tempo.

Nesse contexto, o interferon (proteína produzida pelo sistema imunológico em resposta à ameaça de agentes como vírus, bactérias, parasitas e tumores) e a interleucina-2 (proteína do sistema imunológico envolvida na ativação dos linfócitos e na indução da proliferação de células específicas de defesa) têm sido mais amplamente utilizados na imunoterapia do melanoma, porém ainda está sendo alvo de intensa pesquisa. Essas terapias causam muitos efeitos colaterais, como fadiga, sintomas constitucionais, cefaleia, náuseas, perda de peso, mielosupressão e depressão. Todavia, apesar dos primeiros resultados promissores obtidos até o momento, não foi demonstrado nenhum benefício claro em termos de sobrevida, e as críticas ao seu uso estão relacionadas ao fato de ser um tratamento tóxico e sem evidências de vantagem consistente na sobrevida a longo prazo (PULIDO, 2007; DERMATOLOGIA de FITZPATRICK, 2011).

Embora a taxa de sobrevida seja maior do que 90% quando o melanoma é detectado precocemente, esta diminui para 60% em formas mais avançadas como melanoma estágio 2, para 10% em melanoma estágio 3, ou até para completa

fatalidade em casos de melanoma estágio 4. Isso se deva à falta de tratamentos avançados para melanomas (MUELLER, 2009).

Apesar de apresentar bons resultados, esses tratamentos, principalmente, a quimioterapia e a radioterapia, não são específicos para as células tumorais e, devido a isso, culminam em um resultado terapêutico não satisfatório, sem erradicação completa das células malignas, além de induzirem efeitos adversos severos (SIBAUD, 2015).

Nesse sentido, novas modalidades de tratamento vêm sendo projetadas e desenvolvidas utilizando produtos e processos tecnológicos a partir de materiais organizados na escala de nanômetros. A ciência que estuda esses materiais é denominada de nanociência e a sua aplicação de nanotecnologia.

1.5 A nanotecnologia

Segundo o relatório 229 do comitê técnico da Organização Internacional de Padronização ISO TC (INTERNATIONAL, 2005) a nanotecnologia é: "entendimento e controle de matérias e processos em escala nanométrica, tipicamente, mas não exclusivamente, abaixo de 100 nanômetros, em uma ou mais dimensões onde o surgimento de fenômenos dependentes do tamanho usualmente propicia novas aplicações"; além de "utilização das propriedades de materiais em escala nanométrica que diferem das propriedades dos átomos individuais, moléculas e matéria (bulk matter) para criar melhores materiais, dispositivos e sistemas que explorem estas novas propriedades".

Os nanomateriais apresentam grande área de superfície em relação à massa, permitindo alta capacidade de funcionalização, e são amplamente aplicados em diferentes setores (MODY *et al*, 2010; FALLEIROS *et al*, 2011; BRAKMANE *et al*, 2012). Na biomedicina o emprego destes materiais levou ao desenvolvimento da nanomedicina, tendo tido um grande impacto no crescimento de novos e/ou melhores procedimentos de diagnóstico e/ou terapia.

Nanomateriais utilizados como veículos de entrega de drogas (nanovetores) representam uma das aplicações mais promissoras da nanomedicina (WANG & THANOU, 2010). Os nanovetores quando funcionalizados podem promover a

entrega do agente terapêutico a um tecido/sítio específico, diminuindo os efeitos adversos, principalmente aqueles associados a altas doses de fármacos utilizadas em tratamentos convencionais (LIU *et al*, 2011). Assim, estes nanosistemas podem promover a redução da dose de medicamento administrada, e ao mesmo tempo maximizar o seu efeito no local desejado, evitando o contato e dano dos tecidos saudáveis (SURENDIRAN *et al*, 2009; GMEINER & GHOSH, 2014).

A Nanotecnologia surge então como uma opção de tratamento para diversas patologias, com perspectiva promissora para o melhoramento de terapias oncológicas existentes, pois permite a modificação e otimização das propriedades físicas, químicas e biológicas das partículas e, portanto, tem uma aplicação vasta nas áreas da Medicina, Farmacologia, Eletrônica, Química, etc. (OCHEKPE, *et al.*, 2009).

Atualmente as modalidades tecnológicas mais empregadas na nanovetorização de agentes terapêuticos contra o câncer, são: lipossomas, micelas, dendrímeros, nanopartículas poliméricas, nanoemulsões, nanotubos de carbono e nanopartículas superparamagnéticas (ZACARIA *et al*, 2015). Neste trabalho foram utilizadas micelas poliméricas, que estão descritas no item 1.9.

Assim, o emprego da nanotecnologia como ferramenta para a elaboração de veículos de entrega de drogas associado a modalidades terapêuticas anti-neoplásicas vem sendo cada vez mais explorada, principalmente na terapia fotodinâmica.

1.6 A terapia fotodinâmica

A Terapia Fotodinâmica, TFD, é uma modalidade terapêutica promissora para o tratamento do câncer, que oferece a possibilidade de remissão ou mesmo ação paliativa em certos casos de câncer, como o câncer de pele, pulmão e bexiga. É clinicamente aprovada por ser uma terapia não-invasiva e assim vem sendo amplamente utilizada tanto na área de dermatologia quanto na de odontologia, para tratar lesões cutâneas e orais, infecções, doenças cardiovasculares e oftalmológicas,

entre outras (LEVY *et al.*, 1996; DOUGHERTY *et al.*, 2002; FAYTER *et al.*, 2010; PORTILHO *et al.*, 2013).

Atualmente, a TFD tem se mostrado eficaz no tratamento de diversos tipos de neoplasias, como de bexiga, pulmão, cabeça e pescoço, esôfago e nos casos de esôfago de Barrett, doença de Bowen (JONES *et al.*, 1992) carcinoma de células escamosas (WILSON *et al.*, 1992), carcinoma de seio recorrente e metastático (MCCAUGHAN *et al.*, 1989) e sarcoma de Kaposi (SCHWEITZER & VISSCHER, 1990). Além disso, a TFD vem sendo considerada o tratamento ideal para o câncer de pele (SCHUITMAKER *et al.*, 1996; TRIESSCHEIJN *et al.*, 2006; CHATTERJEE, FONG & ZHANG, 2008).

São três componentes principais nesta terapia: 1- fotossensibilizante, 2- luz e 3- oxigênio molecular. O princípio da TFD está na geração de espécies reativas, em que o fotossensibilizante, quando ativado por uma luz de comprimento de onda específico; e na presença de oxigênio molecular, forma as espécies reativas que reagem com biomoléculas, ou forma o oxigênio singleto reativo, e assim são capazes de induzir a morte celular, seja por mecanismos apoptóticos ou necróticos (JORIS *et al.*, 2013; HUANG *et al.*, 2006, CZERSKA *et al.*, 2015).

As reações que ocorrem na terapia fotodinâmica iniciam quando um fármaco fotossensível, denominado de fotossensibilizante (FS) é introduzido nas células-alvo seguido da irradiação com luz em comprimentos de onda na faixa de 600 a 900 nm. Quando isso acontece, conforme ilustrado na Figura 5, o FS, que se encontra no estado fundamental (S_0) passa para um estado singleto excitado (S_1), um estado energético maior e de vida mais curta. Nesse estado S_1 , o FS pode voltar ao estado fundamental ou passar rapidamente para o estado tripleto (T_1) devido a mudanças intersistemas (ISC). O FS em seu estado T_1 pode reagir com O_2 por dois mecanismos fotoquímicos distintos. O mecanismo denominado de reação do Tipo I, envolve a transferência direta de prótons do FS para substratos celulares orgânicos (lipídios, proteínas, ácidos nucleicos, etc.) formando radicais livres ou íons radicais que interagem com o oxigênio molecular para produzir espécies reativas de oxigênio (ERO), como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ânion superóxido (O_2^-) e radical

hidroxil (OH^-). A reação tipo II envolve a transferência de energia do FS no estado T_1 para o $^3\text{O}_2$, no estado fundamental, formando oxigênio singleto altamente reativo $^1\text{O}_2$. Ambos os tipos de reação causam oxidação de várias moléculas celulares e podem induzir a morte celular via apoptose, necrose ou autofagia. O $^1\text{O}_2$ produzido na reação do tipo II é provavelmente o responsável pela morte celular induzida na TFD (LIM, 2012). Por outro lado, os radicais podem, indiretamente, estimular a transcrição que induz a proliferação celular (DING *et al*, 2011).

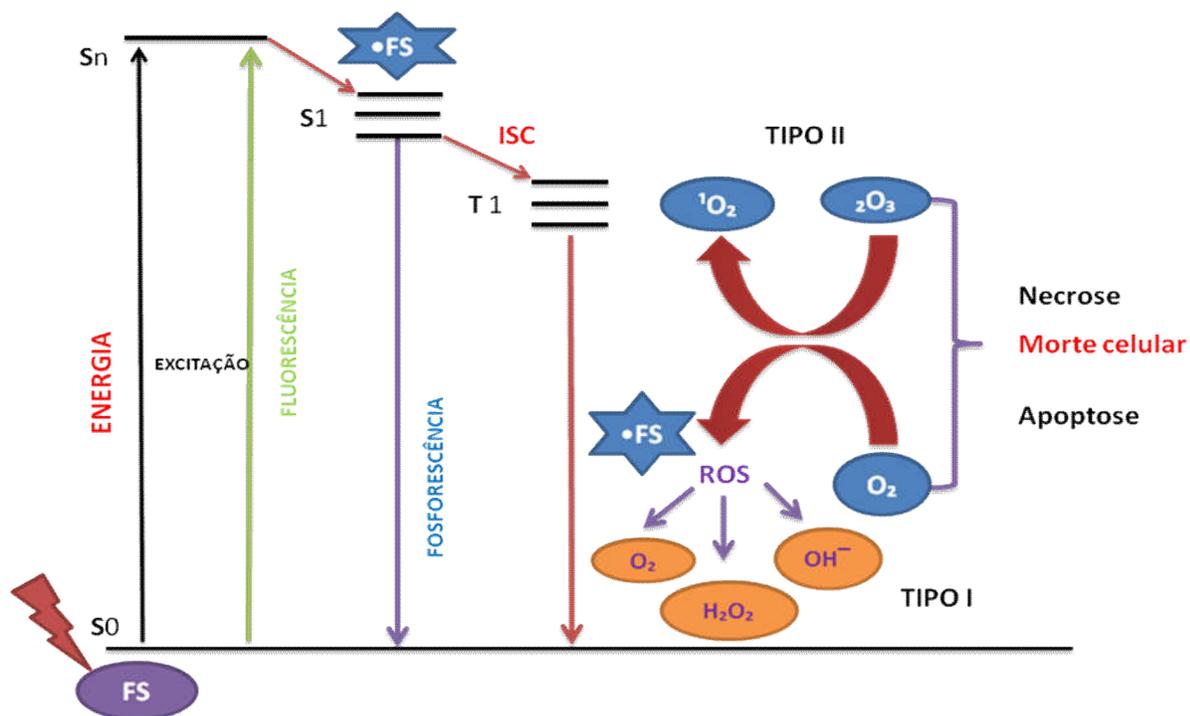


Figura 05. Diagrama dos níveis de energia de Jablonski para a terapia fotodinâmica (TFD). O fotossensibilizante (FS) após a radiação da luz muda do estado fundamental (S_0) para o singleto (S_1) e, por meio de mudanças intersistema (ISC) rapidamente encontra-se no estado tripleto (T_1). Neste estado T_1 , o FS na presença do O_2 pode produzir espécies reativas de oxigênio (ERO) pela reação do tipo I e/ou produzir oxigênio singleto altamente reativo ($^1\text{O}_2$) pela reação do tipo II, ambos causando a morte celular por necrose ou apoptose (Adaptado de MAJUMDAR *et al*, 2012).

Além disso, a TFD tem outro mecanismo capaz de matar o tumor, que é o seu efeito na vascularização, o qual varia de acordo com o FS utilizado. A aplicação da TFD com ftalocianinas causa principalmente o aumento da permeabilidade vascular, enquanto a TFD com mono-L-aspartilclorina e6 (MACE) resulta na estase do fluxo sanguíneo e agregação de plaquetas (MCMAHON *et al.*, 1994). Por outro lado, a vasoconstrição via inibição da produção ou liberação de óxido nítrico pelo endotélio vascular, também é um efeito causado pela Terapia Fotodinâmica (GILISSEN *et al.*, 1993). Nesses casos, o mecanismo vascular priva o tecido tumoral de oxigênio e nutrientes necessários ao seu crescimento.

Finalmente, a TFD pode causar alterações nas membranas citoplasmáticas e de organelas e induzir uma rápida ativação de fosfolipases de membrana levando a uma acelerada degradação de fosfolípidios e uma maciça liberação de mediadores inflamatórios (YAMAMOTO *et al.*, 1992). A sinalização inflamatória após a TFD desencadeia uma invasão regulada de neutrófilos, mastócitos e monócitos/macrófagos, estimulando o sistema imune, principalmente os leucócitos, a reconhecer e destruir células tumorais localizadas no local da inflamação ou em outros locais adjacentes.

Estudos de substâncias fotossensíveis, com efeito citostático ou citotóxico, são relatados desde o início do século XX (FINSEN, 1903; MEYER-BETZ, 1913) e desde então é crescente a pesquisa para o desenvolvimento de fotossensibilizantes que apresentem uma maior eficácia terapêutica (MACDONALD & DOUGHERTY, 2001).

1.7 Os fotossensibilizantes

Os primeiros fotossensibilizantes (FS), denominados de primeira geração, utilizados na TFD eram à base de porfirinas, que embora tenham representado um progresso terapêutico apresentam algumas desvantagens como a pequena absorção na região da janela terapêutica (660-700 nm) e a excreção lenta pelo organismo, resultando em uma prolongada fotossensibilidade da pele, e assim exigindo que o paciente permaneça ao abrigo do sol por vários dias (CARINA SILVA DE PAULA, 2008).

Em vista disto, outros fotossensibilizantes foram desenvolvidos, os denominados FS de segunda geração, sendo os principais representantes dessa classe as ftalocianinas. Esses FS de segunda geração possuem altos coeficientes de absorção e geração de energia, penetram profundamente em tecidos biológicos, pois absorvem luz na faixa de 650-850 nm, além de serem excretados mais rapidamente do que os FS de 1ª geração. Desta forma, não são tóxicos na ausência de luz (CALZAVARA-PINTON, 2007). Entretanto, a maioria deles é hidrofóbico, o que dificulta a sua aplicação em organismos.

Para solucionar o fato da hidrofobicidade dos fotossensibilizantes de 2ª geração, uma solução dada pela Nanotecnologia foi a de associá-los a carreadores nanoestruturados, como lipossomos, nanopartículas sólidas, micelas, nanoemulsões ou conjugá-los a compostos como anticorpos, peptídeos e ácido fólico e assim ser uma ferramenta importante e com resultados promissores na aplicação da TFD. (YANO *et al*, 2011) Estes novos sistemas de fotossensibilizantes são denominados de 3ª geração.

LONGO e colaboradores (2009) analisaram a eficiência da ftalocianina associada a lipossomos como mediador da TFD contra tumores de Ehrlich induzidos na língua de camundongos Swiss. Este estudo mostrou que o tratamento ocasionou necrose em 90% dos tumores e a eliminação da vascularização do tumor após a TFD mediada pelo lipossoma-ftalocianina, porém quando usada a ftalocianina na forma livre, não foi obtido mesmo sucesso.

1.8 Alumínio-Cloro-Ftalocianina

As ftalocianinas são uma classe de FS que vem atraindo bastante atenção devida as suas propriedades fotoquímicas e fotofísicas e, portanto, tem apresentado bons resultados na área de TFD. Um alto coeficiente de absorção espectral na faixa de comprimentos de onda longos, entre 650-850 nm, o que corresponde ao intervalo da região do vermelho visível, e o alto poder de penetração são vantagens deste derivado de azoporfirina. As ftalocianinas possuem uma alta eficiência devido ao seu alto rendimento quântico e são rapidamente captadas pelo sistema retículo-endotelial, facilitando a eliminação, e ao mesmo tempo apresentam longo tempo de

retenção em células neoplásicas (ALLISON *et al*, 2004; DETTY *et al*, 2004; WAINWRIGHT, 2008; O'CONNOR, 2009; BONETT, 2010).

As ftalocianinas são capazes de se ligar a uma variedade de espécies metálicas, principalmente alumínio e zinco (MARTINS *et al*, 2004; KOLAROVA *et al*, 2007a; KOLAROVA *et al*, 2007b), a presença e a natureza do íon metálico central elevada capacidade de geração e a um aumento na durabilidade do estado tripleto eletrônico, essencial para a eficiência das reações fotoquímicas (MAFTOUM-COSTA *et al*, 2008; DURMUS & AHSEN, 2010). Nesse sentido, estudos têm apontado o complexo Alumínio-Cloro-Ftalocinina (AlClPc), na figura 6, como um dos mais favoráveis para a aplicação na TFD (MAFTOUM-COSTA *et al*, 2008).

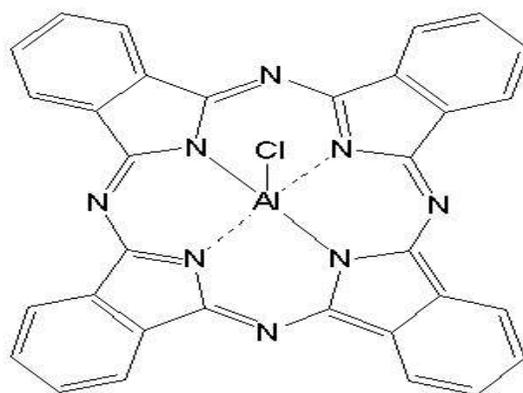


Figura 06. Estrutura química da cloro-alumínio ftalocianina. Adaptada de MAFTOUM-COSTA, 2008.

No entanto, o caráter hidrofóbico das ftalocianinas causa sua baixa solubilidade em meios hidrofílicos, como os sistemas biológicos, e aumenta muito a sua agregação, reduzindo sua capacidade fotoativa. Portanto, o uso de nanovetores para transportar este FS surge como alternativa importante. Essa estratégia permite a manutenção da forma monomérica do FS em meios hidrofílicos e aumento no controle da seletividade, uma vez que alterações na composição dos nanovetores, como a adição de grupos funcionais, podem ser feitos de forma a adequá-los para o

transporte e direcionamento às células e tecidos-alvo em meio fisiológico (FERRARI, 2011; WANG & THANOU, 2010).

1.9 Micelas de Pluronic® F127

Com o desenvolvimento da nanobiotecnologia, o número de materiais nanométricos utilizados para o transporte e liberação controlada de fármacos no tratamento de várias doenças vem se tornando cada vez maior. Estes nanocarreadores podem remediar deficiências como, biodistribuição incorreta da droga (baixa especificidade), baixa estabilidade e solubilidade dos fármacos. Os nanocarreadores oferecem vantagens, como a possibilidade de ter o seu uso controlado externamente (com marcações bioluminescentes) e o emprego como agentes teranósticos. Esse termo surgiu para definir materiais que combinam funcionalidades de agentes de contraste e terapêuticos concomitantemente (MONGE-FUENTES *et al*, 2009).

Vale lembrar que a vetorização de fármacos deve romper barreiras biológicas específicas e, em seguida, liberar o fármaco no local desejado (SANTA & OSÓRIO, 2013). Além disso, sabe-se que o efeito EPR (do inglês *Enhanced Permeability and Retention*) (em contraste com tecidos e órgãos normais, a maioria dos tumores sólidos mostram uma densidade vascular superior, isto é, a angiogênese em tumores sustenta o seu crescimento) também é uma característica importante na eficiência terapêutica dos nanocarreadores no tratamento de tumores (FAROKHZAD & LANGER, 2009).

Dentre os materiais mais promissores para a obtenção de nanocarreadores, estão os polímeros, em parte graças à grande variedade e versatilidade destas moléculas e também a fácil modulação de suas propriedades físico-químicas de síntese, tornando-os biocompatíveis e biodegradáveis e, portanto, excelentes candidatos como matéria-prima na produção dos nanocarreadores (GIL & HUDSON, 2004).

Dentre os nanocarreadores utilizados na nanomedicina estão liposomas, dendrímeros, nanoemulsões, nanopartículas lipídicas sólidas (LPS) e micelas

(esférica, reversas, cilíndricas e tipo vermiculares) formadas em conjuntos de lamelas, estruturas bicontínuas ou vesículas (Figura 07).

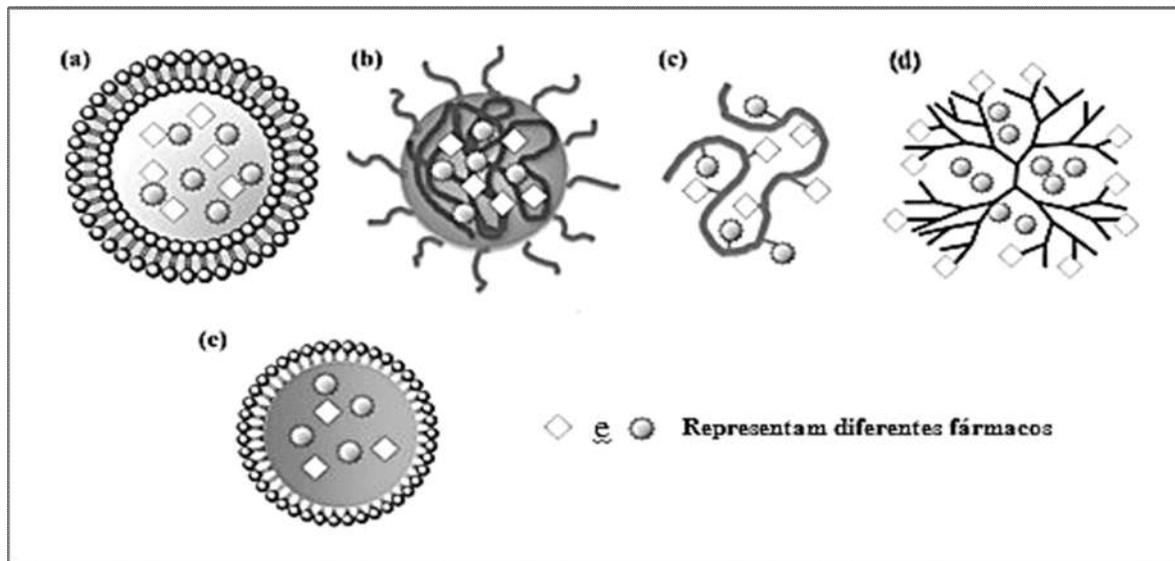


Figura 07. Diferentes vetores usados em nanomedicina aplicada ao transporte de fármacos, sendo alguns já utilizados em terapia clínica e pré-clínica: a) liposomas; b) micela polimérica; c) conjugado unímeros-fármaco; d) dendrímeros; e) nanoemulsão ou LPS (retirado e adaptado de: HU, *et al.* 2012).

As micelas poliméricas foram primeiro propostas como transportadores de fármacos por RINGSDORF em 1984 (BADER *et al.*, 1984) que foram emergindo como um sistema de transporte conveniente. Alguns artigos recentemente publicados proporcionaram excelentes comentários sobre o uso de micelas poliméricas como transportadores de drogas em geral (JHAVERI & TORCHILIN, 2014; GEMMA *et al.*, 2015).

Uma vez que muitos fotossensibilizantes normalmente apresentam alguma toxicidade contra células e tecidos saudáveis, portadores são preferencialmente obrigados a entregá-los no sítio patogênico por segmentação passiva ou ativa (VROUENRAETS *et al.*, 2003) e por muitos fotossensibilizadores serem insolúveis

em água, micelas poliméricas são úteis tanto para solubilização quanto como veículo de entrega.

As micelas são conjuntos dinâmicos compostos por um núcleo líquido ou sólido hidrofóbico e revestido com cadeias hidrófilas, portanto, permitem a solubilização de princípios ativos hidrofóbicos no seu centro líquido. Possuem tamanhos entre 10 e 100 nm (BENÍTEZ *et al*, 2012).

Dentre os polímeros que formam as micelas, os copolímeros em blocos (incluindo dendrímeros bloco e enxerto) são notáveis por sua capacidade de automontagem em meios aquosos e assim formar diferentes tipos de conjuntos de lamelas, estruturas bicontínuas ou vesículas esféricas. As micelas em vesículas esféricas preparadas com copolímeros de bloco são conjuntos com um núcleo micelar hidrofóbico, normalmente onde se encontra o ingrediente ativo, adsorvido ou encapsulado devido às ligações com a porção hidrofóbica do copolímero, que está voltada para este núcleo. A porção hidrofílica do copolímero permanece voltada para a superfície externa, formando o bloco estrutural da micela (TORCHILIN, *et al*, 2001).

As micelas têm uma vantagem em comparação com outros tipos de nanocarreadores porque permite transportar drogas hidrófilas e hidrofóbicas simultaneamente, o que é útil no desenvolvimento de terapias múltiplas. São amplamente utilizados não só na área da medicina, mas em toda a área da química coloidal por causa de suas propriedades tensoativas (BENÍTEZ *et al*, 2012). Para a vetorização de fármacos hidrofóbicos anti-tumorais, as micelas são excelentes candidatas, pois devido ao seu pequeno tamanho e a seu maior efeito EPR, são capazes de fornecer drogas à tumores pouco permeáveis, tais como os tumores sólidos (TORCHILIN, *et al*, 2001).

Dentre os copolímeros em bloco usados na preparação de micelas em vesículas esféricas está o Pluronic[®] F127, também conhecido como poloxamero, é constituído de óxido de etileno (EO) e óxido de propileno (PO) formando uma estrutura em tri-bloco na base A-B-A, ou seja, PEO₂-PPO₃-PEO₂. Na síntese desta micela, monômeros hidrofóbicos de PO ao polimerizar forma um bloco e em suas

extremidades, há a adição de monômeros hidrofílicos de EO. Sendo que este balanço hidrofílico e hidrofóbico, ou seja, a quantidade de cada tipo de monômero, pode variar de acordo com a aplicação biológica proposta. A Figura 08 mostra como é a estrutura de uma micela formada pelo copolímero em blocos de Pluronic®-F127. KABANOV et al., 2002 relata que o Pluronic® tem sido frequentemente usado como um agente de solubilização em formulações de drogas (KABANOV *et al.*, 2002).

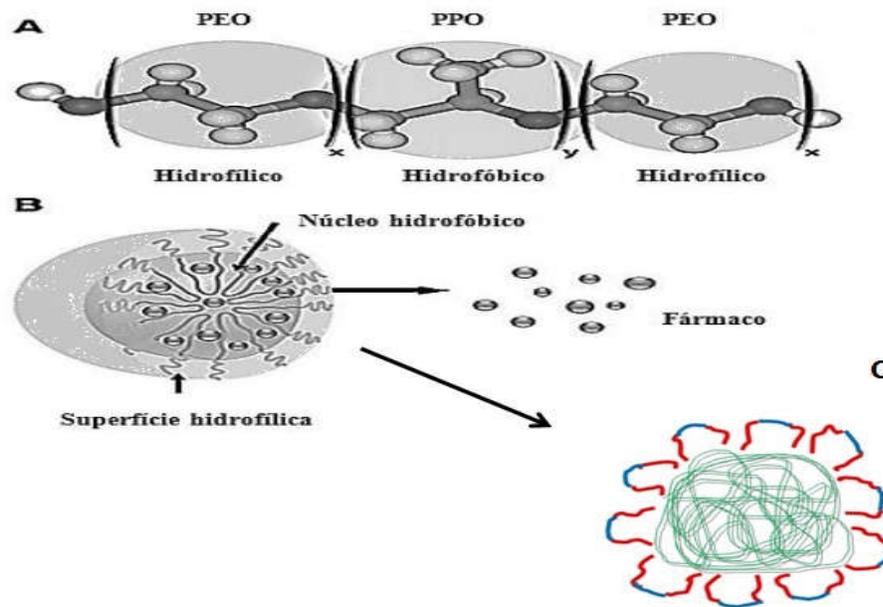


Figura 08. Representação de micelas de copolímeros em bloco de Pluronic® F127. **A-** representa a estrutura química em tri-bloco (A-B-A) do copolímero Pluronic® F127, com os monômeros de óxido de etileno (EO) e óxido de polietileno (PO). **B-** Aspecto das micelas com o núcleo micelar em amarelo e o revestimento de cadeia hidrofílica em azul e vermelho. **C-** Detalhe da organização da micela NP F127/AICIPc, contendo o agente hidrofóbico no centro (em verde) e a disposição do Pluronic® F127, com seu blocos hidrofóbicos (vermelho) voltado para o núcleo micelar e a cadeia hidrofílica (azul) formando o bloco estrutural externo da micela. Adaptado de BASAK & BANDYOPADHYAY, 2013.

Micelas de copolímeros em bloco Pluronic[®] são altamente interessantes, devido à sua natureza não iônica e não tóxica, flexibilidade para utilização em formulações farmacêuticas diferentes e boa seletividade contra células resistentes a múltiplas drogas (MDR- do inglês *MultiDrug Resistance*) inibindo as bombas que expulsam os quimioterápicos do interior da célula (CHEN *et al.*, 2009, YEE *et al.*, 2012), assim como aprimorando a sinalização pró-apoptótica (ALAKHOV & KABANOV, 2002). Quando os polímeros são colocados num solvente orgânico, ocorre a micelização destas nanopartículas de forma espontânea, sendo a síntese bastante simples, barata e rápida, comparativamente a outros tipos de nanopartículas (LETCHFORD *et al.* 2007). Além disso, a sua capacidade de prolongar o tempo de circulação dos fármacos tem atraído a atenção para a investigação de seu uso como sistemas de fornecimento de vários tipos de drogas (BATRAKOVA & KABANOV, 2008), por exemplo, quando doxorrubicina é administrada em combinação com Pluronic[®] observa-se uma citotoxicidade potencializada (BATRAKOVA *et al.*, 2001).

O Pluronic[®] em solução aquosa (ou em um solvente seletivo para apenas uma das porções) tende a se concentrar nas interfaces do sistema por adsorção, pois minimizam as interações desfavoráveis e/ou maximizam as interações favoráveis, visando reduzir a energia livre do sistema onde se encontram. De uma forma simples, a formação desses agregados moleculares ou micelas estáveis em solução aquosa é impulsionada pela hidrofobicidade das porções apolares de suas moléculas, e pela hidroflicidade das porções polares. Dessa maneira, em solução aquosa, essas moléculas se agregam de formas variadas (esféricas, cilíndricas, lamelares e em disco; (MYERS, 1992) com sua porção hidrofóbica constituindo a parte interna (núcleo) e a porção hidrofílica, a parte externa (coroa). Vale a pena ressaltar que todo polímero, independentemente da sua forma, tem uma concentração micelar crítica (CMC) e uma temperatura crítica micelar (CMT).

A CMC é a menor concentração de um surfactante onde ocorre a formação de micelas (micelização), a qual é uma propriedade intrínseca e característica do surfactante. A CMT é a temperatura a partir da qual, numa dada concentração, as moléculas começam a se agregar em micelas. (GARREC *et al.* 2004). A CMC de um

surfactante é um de seus parâmetros mais importantes, uma vez que muitas aplicações dos surfactantes, como a solubilização de compostos hidrofóbicos, dependem da existência de micelas no sistema. A CMC depende da natureza química do surfactante, do solvente, da temperatura e de aditivos como eletrólitos e substâncias orgânicas. Um exemplo disso foi ressaltado por Alexandridis e colaboradores (1994) que utilizaram um método de solubilização de um corante para investigar a CMC de uma série de Pluronic; por meio dos seus resultados foi possível observar que a CMC do Pluronic[®] F127 diminuiu drasticamente com a diminuição da temperatura (ALEXANDRIDIS *et al.*, 1994).

O uso de micelas como nanocarreadores de fotossensibilizantes na aplicação da terapia fotodinâmica já foi investigado por JIN e colaboradores (2015) que utilizaram este sistema carreando Zinco-Ftalocianina (ZnPc) no tratamento de psoríase em modelo animal. Os pesquisadores compararam o efeito da salina, a luz ou a formulação nanoestruturada da ZnPc apenas, e a combinação da luz e a formulação (a TFD). Como resultado foi observado, na análise histopatológica, a quase total cura da psoríase (JIN *et al.*, 2015).

1.10 Justificativa

Devido a alta letalidade do câncer de pele melanoma, novos tratamentos vêm surgindo para melhorar a terapêutica dessa patologia, uma vez que os tratamentos quimioterápicos existentes tem-se mostrado pouco eficazes contra a doença, além de trazer efeitos adversos, alta recidivação do câncer e uma baixa taxa de cura. Uma nova alternativa para o tratamento do melanoma metastático é a terapia fotodinâmica, uma modalidade terapêutica não invasiva, de baixo custo e que não necessita a internação do paciente.

O emprego do agente fotossensibilizante Alumínio-Cloro-Ftalocianina carregado por micelas de Pluronic[®] F127 na terapia fotodinâmica torna-se uma ferramenta potencial, pois se trata de um agente (AICIPc) com alta eficácia na TFD, carregado por um sistema nanoestruturado com vantagens farmacocinéticas bastante relevantes, como o nível de absorção do FS em células tumorais potencializado e

boa biocompatibilidade, evitando assim sua degradação imediata no organismo. Assim, a avaliação da eficácia deste sistema no tratamento do melanoma é de fundamental importância na busca de novas e melhores modalidades terapêuticas.

2. OBJETIVO

O objetivo deste estudo é avaliar a eficácia da terapia fotodinâmica mediada pelo fotossensibilizante Alumínio-Cloro-ftalocianina em micelas de Pluronic[®] F127 para o tratamento de melanoma murino metastático *in vitro*.

2.1 Objetivos específicos

Para alcançar o objetivo deste estudo, foram pontuados os seguintes objetivos específicos:

- Preparação de nanoformulações de micelas de Pluronic[®] F127 com diferentes concentrações do fotossensibilizante Alumínio-Cloro-ftalocianina (NP F-127/AICIPc);
- Caracterização físico-química das nanoformulações preparadas, determinando o diâmetro hidrodinâmico, o índice de polidispersão, o potencial zeta e o pH;
- Avaliação da estabilidade coloidal das nanoformulações ao longo do tempo, quando armazenadas sob diferentes temperaturas;
- Caracterização fotofísica das nanoformulações preparadas, determinando o espectro de absorvância e emissão de fluorescência;
- Avaliação da eficácia das nanoformulações na geração de oxigênio singlete;
- Determinação da toxicidade da luz LED na viabilidade de células de melanoma (B16F10) e em uma linhagem de melanoma modificada para a expressão de luciferase (B16F10FF) na ausência da nanoformulação em cultura destas células;
- Determinação da toxicidade das nanoformulações na viabilidade das duas linhagens de células de melanoma *in vitro* sem a irradiação da luz LED;

- Avaliação da eficácia de terapia fotodinâmica pela viabilidade das células de melanoma (B16F10 e B16F10FF) *in vitro* na presença de Alumínio-Cloro-Ftalocianina em micelas de Pluronic® F127;
- Avaliação da eficácia de duas sessões de terapia fotodinâmica mediada por Alumínio-Cloro-Ftalocianina em micelas de Pluronic® F127 no tratamento de melanoma *in vitro* (B16F10FF), na condição em que se obteve a maior eficácia quando uma única sessão tenha sido aplicada. Esta avaliação será corroborada por duas metodologias distintas: viabilidade celular por MTT e proliferação celular em tempo real por RTCA.

Vale ressaltar que a utilização de células de melanoma modificadas para a expressão de luciferase e por consequente, a avaliação da eficácia da terapia fotodinâmica mediada por Alumínio-Cloro-ftalocianina em micelas de Pluronic® F127 nestas células, permitirá uma melhor adequação do delineamento experimental no modelo em camundongos para este tipo de tumor, principalmente como ferramenta de monitoramento da evolução tumoral e seu tratamento por meio de sistema de bioimageamento.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Equipamentos, materiais e reagentes

Os principais equipamentos, materiais e reagentes que foram utilizados estão listados nas tabelas 2, 3 e 4, respectivamente.

Tabela 2: Lista de Equipamentos utilizados.

Equipamentos	Fabricante
Balança analítica Série AUY-220	Shimadzu®, BRA
Banho-Maria NT 245	Nova Técnica, BRA
Câmara de Neubauer	Optik-Labor Frischknecht, Suíça
Constant Current LED Driver JD-350mA	Zuhai Taurus Technologies Co., Ltd., China

Controlador RCD-24-0.35/W,	Recom Power, Inc., ALE
Espectrofotômetro Spectramax M2	Molecular Devices [®] , LLC, USA
Espectrofotômetro Portátil	Ocean Optics Inc., EUA
Fluxo laminar unidirecional CFV12	VecoFlow, BRA
Incubadora de célula	Thermo Scientific™ Forma™ Steri-Cycle™
LED modelo XL001WP01NRC660	Shenzhen Sealand Optoelectronics [®] Ltd., China
Microscópio de luz invertido CK2	Olympus Optical Co, Ltd., Japão
Potencímetro digital Fieldmax II-TO	Coherent Inc., EUA
Vórtex Mixer XH-C	Notek Medical [®] , EUA
xCELLigence DP Real-Time Cell Analyzer (RTCA)	ACEA Bioscience Inc., EUA
Zetasizer Nano ZS 90	Malvern Instruments, Worcestershire, Insight [®] , UK

Tabela 3: Lista de Materiais utilizados.

Materias	Fabricante
Criotubos	TPP [®] , ALE
Cubeta de quartzo	SPLabor, Baril
Lamínula de microscopia	Perfecta, BRA
Microtubo tipo eppendorf 2 mL	E-Lab Commerce [®] , Brasil
Papel filtro	J. Prolab, BRA
Papel indicador de pH (0-14)	Merk [®] , Alemanha
Placa de cultivo de células (24 poços) de poliestireno	TPP [®] ,ALE
Placa de cultivo de células (96 poços) de poliestireno	TPP [®] ,ALE
Seringa 20 mL BD Plastipak™	Becton, Dickinson [®] (BD), BRA

Tabela 4: Reagentes utilizados.

Reagente	Fabricante
Azul tripan	Sigma-Aldrich [®] , EUA
Antibiótico Pen-Strep	Gibco [®] Invitrogen [™] , EUA
Bicarbonato de sódio <i>ReagentPlus</i> [®]	Sigma-Aldrich [®] , EUA
Cloro-alumínio-ftalocianina (AICIPc)	Sigma-Aldrich [®] , BRA
Dimetilsulfóxido (DMSO)	Macron [™] Chemicals, Avantor [™]
Dulbecco`s Modified Eagle Medium (DMEM)	Gibco Life Technologies [®] , Ltda., EUA
DBF (1,3-difenilisobenzofurano)	Sigma-Aldrich [®] , ALE
Pluronic [®] F127	Sigma-Aldrich [®] (St. Louis, MO, EUA)
Soro fetal bovino	Gibco [®] Invitrogen [™] , EUA
Tampão Fosfato Salina (PBS)	Laborclin, BRA
Tripsina-EDTA	Gibco [®] , EUA

3.2. Preparação de micelas de Pluronic[®] F127 com Alumínio-Cloro-Ftalocianina (NP F127/AICIPc)

Para a síntese de micelas de Pluronic[®] F127 com o fotossensibilizante AICIPc (NP F127/AICIPc) foi preparada uma solução do copolímero Pluronic[®] em tampão fosfato salina (PBS) estéril, utilizando a proporção de 1,15% para 3% (p/v). O copolímero foi solubilizado em PBS sob agitação por 30 minutos. Em seguida, a solução foi filtrada em filtro Millipore[®] em fluxo laminar e aliqotada em seis tubos com volume de 5 mL para a adição do agente fotossensibilizante AICIPc, como ilustrado na figura 09.

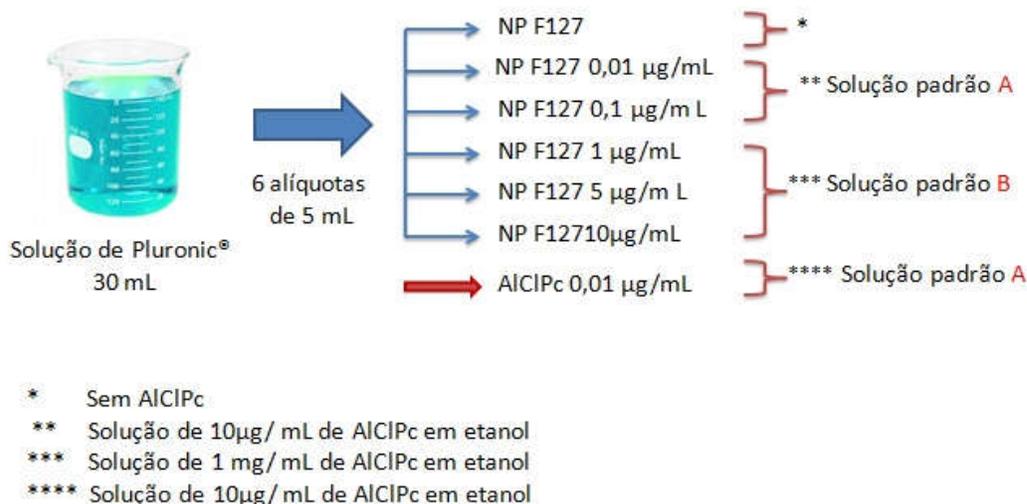


Figura 09. Esquema de preparação das amostras de micelas de Pluronic® F127 com diferentes concentrações de alumínio-cloro-ftalocianina (AICIPc).

Para a incorporação da AICIPc foram preparadas duas soluções padrão de 1 mg/mL e 10 µg/mL de AICIPc. Nas soluções padrão foi utilizado etanol (P.A) para a solubilização do FS, uma vez que este, tem caráter hidrofóbico e sua solubilização não se dá em água (de caráter polar) Foram então produzidas amostras de micelas NP F127/AICIPc em três concentrações diferentes, além de uma amostra constituída apenas de Pluronic® F127, sem adição de AICIPc, e outra amostra contendo apenas o fotossensibilizante sem o copolímero Pluronic® F127, ou seja, o FS livre, solubilizado em etanol, conforme mostra a tabela 4. As amostras preparadas foram homogeneizadas em vórtex a 134 g por 5 minutos para favorecer a ligação do copolímero Pluronic com a AICIPc na formação da micela.

A razão de preparar diferentes concentrações de amostras de micelas foi determinar qual a concentração micelar crítica (CMC) ideal para obter amostras que carregassem a maior quantidade de fotossensibilizante e que não mudasse o seu estado físico de sol para gel; solução coloidal, viabilizando o seu futuro emprego nos estudos *in vitro* e *in vivo*. As formulações foram preparadas pela bióloga Karen Happy-Py Daniel, no Laboratório de Nanobiotecnologia da Universidade de Brasília,

de acordo com a necessidade dos experimentos. Vale ressaltar que a preparação destas micelas seguiu a metodologia descrita por ESCOBAR-CHAVÉZ e colaboradores (2006).

Tabela 5: Relação da preparação das amostras de micelas de pluronic F127 com diferentes concentrações de Alumínio-Cloro-Ftalocianina (AICIPc).

Amostra	Solução de Pluronic F127 (mL)	Solução de AICIPc* (µL)	PBS estéril (µL)	Etanol estéril (µL)
NP F127	5	-	-	-
NP F127/AICIPc 1 µg/mL	5	5	-	-
NP F127/AICIPc 5 µg/mL	5	25	-	-
NP F127/AICIPc 10 µg/mL	5	50	-	-
AICIPc	-	10	9.900	90

* Solução padrão de AICIPc em etanol 10 µg/mL.

3.3 Caracterização e avaliação da estabilidade coloidal das micelas de Pluronic® F127 com Alumínio-Cloro-Ftalocianina (NP F127/AICIPc)

Para caracterizar e avaliar a estabilidade das diferentes formulações de micelas de Pluronic F127/AICIPc (tabela 5), um lote de cada uma das formulações foi preparado em volume final de 30 mL Logo após o preparo, as propriedades coloidais como o diâmetro hidrodinâmico (DH), o índice de polidispersão (IPD), o potencial zeta (Pz) e potencial hidrogeniônico (pH) foram analisadas.

Em seguida as formulações foram aliqüotadas igualmente em três tubos com volume final de amostra de 10 mL, e cada tubo foi armazenado em diferentes temperaturas tais como: no refrigerador a 4 °C; sob a bancada de laboratório a temperatura ambiente, aproximadamente 25 °C e em estufa seca a 37 °C.

Para avaliar a estabilidade ao longo do tempo das formulações armazenadas sob diferentes temperaturas, as mesmas variáveis analisadas, logo após a preparação, também foram mensuradas por três meses, sendo que no primeiro mês as medidas foram realizadas semanalmente, e nos meses seguintes elas foram analisadas quinzenalmente.

Os dados referentes ao diâmetro hidrodinâmico (DH) e índice de polidispersão (IPD) foram obtidos por dispersão dinâmica da luz (DLS) e o potencial zeta (Pz) foi obtido por dispersão de luz eletroforética em Zetasizer. Os dados referentes ao DH foram realizados em ângulo de detecção de 90° com duração de 120 s e são apresentados por dispersão numérica. Os dados referentes ao Pz foram obtidos a partir de um potencial estabelecido no zetasizer de ~ 150 mV e expressos como a média dos valores da mobilidade eletroforética utilizando a Equação de Smoluchowski (TANDON *et al*, 2008). Todos os parâmetros foram avaliados usando-se 1 mL de cada formulação, sem diluição, de modo a não alterar a interação estrutural do polímero com o fotossensibilizante.

O potencial hidrogeniônico (pH) das diferentes formulações recém preparadas, assim como das armazenadas nas três distintas temperaturas foi mensurado com papel indicador de pH (0-14) diretamente nas soluções antes das análises dos demais parâmetros.

3.4. Caracterização fotofísica das micelas de Pluronic® F127 com Alumínio-Cloro-Ftalocianina (NP F127/AICIPc)

Como parâmetro complementar à caracterização das NP F127/AICIPc, os espectros de absorção (absorbância) e emissão de fluorescência das diferentes formulações foram obtidos utilizando-se o espectrômetro (Spectra Max). Para tanto, uma alíquota de 200 µL das amostras foram colocadas em placas de cultura de 96 poços e então excitadas a um comprimento de onda de 350 a 750 nm. Esta metodologia foi adaptada de NUNES (2012). As amostras foram analisadas em triplicata em todos os experimentos.

3.5. Avaliação da Geração de Oxigênio Singleto pelas micelas de Pluronic® F127 com Alumínio-Cloro-Ftalocianina (NP F127/AICIPc)

Visando determinar se as formulações de NP-AICIPc eram eficazes em gerar oxigênio singleto ($^1\text{O}_2$) ao serem fotoativadas, foi usado o método de degradação do benzofurano- $^1\text{O}_2$ -dependente, segundo metodologia adaptada de SPILLER e colaboradores (1998). O reagente 1,3-difenil-isobenzofurano (DBF) é uma molécula que reage irreversivelmente com o $^1\text{O}_2$, extinguindo sua absorbância quando excitado em comprimento de onda próximo a 410 nm. Conforme o DBF é decomposto pela geração de $^1\text{O}_2$, a sua absorbância é reduzida de forma proporcional à quantidade de moléculas de oxigênio singleto gerada. Assim, a absorbância decai de forma diretamente proporcional à geração de $^1\text{O}_2$, o que permite sua quantificação percentual.

Assim, para este experimento, foi preparada uma solução de a 0,225 mg/mL de DBF diluída em etanol. Em seguida, a solução foi agitada em vórtex por dois minutos e levada ao banho ultrassônico até completa homogeneização da solução e a mesma foi utilizada no máximo duas horas após seu preparo, devido à rápida degradação de DBF em solução. Para o ensaio, 10 μL da solução de DBF e 190 μL de uma das formulações NP F127/AICIPc foram adicionados à placas de cultura de 96 poços e a degradação de DBF foi acompanhada pela leitura da absorbância (410 nm), no espectrofotômetro (Spectra Max), após sucessivos ciclos de irradiação de LED de 10 segundos cada, correspondente a fluência de energia de 0,4 J/cm^2 por ciclo de irradiação. Após 10 ciclos, a fluência total recebida pela amostra foi de 4 J/cm^2 .

3.6. Ensaio biológicos *in vitro*

Todos os procedimentos *in vitro* foram realizados em câmara de fluxo laminar previamente limpa com álcool 70% e esterilizada com luz ultravioleta por 20 minutos. Os materiais utilizados eram novos e esterilizados.

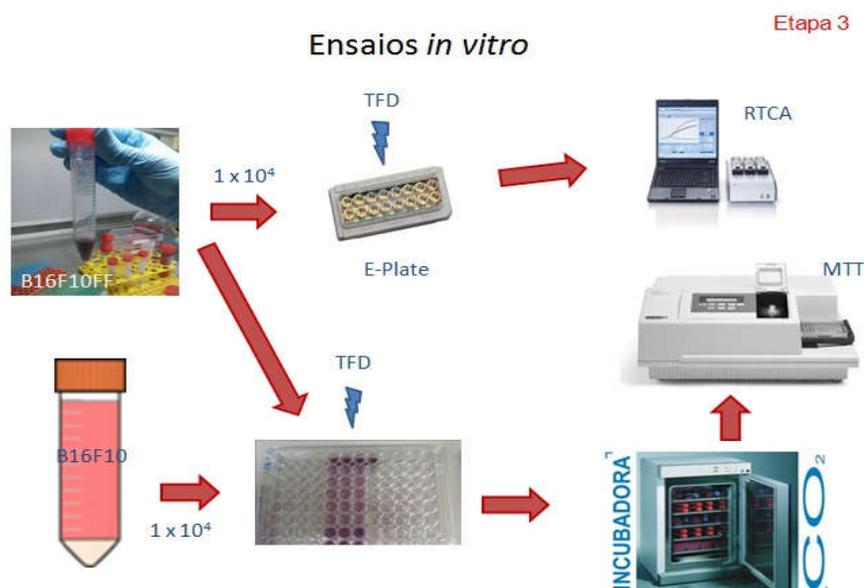


Figura 10. Esquema dos ensaios *in vitro* com células B16F10 e B16F10FF. Células foram plaqueadas e após 24 horas foi realizada a aplicação da TFD para os ensaios de: efeito do LED nas células tumorais, viabilidade celular da B16F10 e B16F10FF por MTT e proliferação celular pelo RTCA, ambos realizados após aplicação de TFD a $85,1 \text{ J/cm}^2$.

3.6.1. Linhagens celulares

Os ensaios *in vitro* foram realizados em linhagens celulares imortalizadas murinas de melanoma maligno B16F10 (ATCC[®] CRL-6475[™]) e melanoma modificada com FireFly Luciferase, B16F10FF. A linhagem selvagem foi adquirida da ATCC[®] (American Type Culture Collection – Manassas, VA, EUA) por meio do banco de células do Rio de Janeiro e a linhagem modificada foi gentilmente cedida pelo Laboratório do Hemocentro de Ribeirão Preto.

3.6.2 . Manutenção e passagem das células

Neste estudo, as linhagens celulares utilizadas estavam preservadas em criotubos contendo 5% de DMSO e 95% de soro fetal bovino (SFB) e armazenadas em tanque de nitrogênio líquido em Câmara Fria no Laboratório de Nanobiotecnologia da Universidade de Brasília – UnB. Os criotubos das células B16F10 e B16F10FF, contendo 1×10^6 células/mL, foram retirados do estoque de nitrogênio líquido e descongelados à temperatura ambiente. Cada alíquota de 1000 μ L de suspensão celular foi transferida para um tubo de 15 mL, e resuspendida com 1 mL de SFB, seguida da adição de mais 1 mL de DMEM. A suspensão de células selvagens foi centrifugada a 302 g, por 5 min e o precipitado resuspendido em 1 mL de DMEM completo (DMEM suplementado com 10% de SFB, 1% de antibiótico Pen Strep, composto por penicilina 100 U/mL e estreptomicina 100 μ g/mL, com pH ajustado para 7,2), seguido da transferência para a garrafa de cultivo celular de 25 cm^2 que já continha 3 mL do meio de cultivo. As garrafas foram mantidas em incubadora, cuja atmosfera era de 5% de CO_2 em ar, a umidade saturada (80%) e a temperatura de 37 °C. Após 24 horas o meio de cultivo foi substituído por meio novo.

Para acompanhar o crescimento celular e identificar qualquer mudança nas características morfológicas e detectar possíveis contaminações bacterianas ou fúngica, o cultivo celular foi observado e monitorado em microscópio de luz invertido, periodicamente.

Ao atingir 75-80% de confluência na superfície da garrafa de cultivo, 1×10^4 células foram transferidas para uma nova garrafa. Para tal, o meio de cultivo foi removido e a monocamada de células tratada com 2 mL de solução Trpsina-EDTA por três minutos a 37 °C. Em seguida, foram acrescentados 2 mL de meio de cultura para a inativação da enzima e centrifugação por dois minutos. Após a remoção do sobrenadante, as células foram resuspendidas em 1 mL de meio de cultivo, dos quais 100 μ L foram transferidos para uma nova garrafa de cultivo de 25 cm^2 com 3 mL de meio e levadas novamente à incubadora. Para a manutenção das células, renovou-se o meio de cultura a cada 48-72 h. A cada transferência de células para

uma nova garrafa contava-se o número de células e registrava-se uma nova passagem celular.

3.6.3. Contagem de células

Para os testes *in vitro* o número de células plaqueadas foi calculado utilizando o método de exclusão por Azul Trypan e a contagem de células em câmara de Neubauer. Para tanto, após a tripsinização da monocamada de células e a resuspensão em 1 mL de meio de cultivo (descrito na seção 3.6.2), 10 µL desta suspensão eram adicionados a 90 µL de solução de Azul Trypan. Este corante não é capaz de penetrar em células que apresentam a membrana plasmática intacta, o que torna possível a distinção das células viáveis a partir do princípio de exclusão. Dez microlitros do preparado contendo o corante eram retirados e aplicados em câmara de Neubauer. A concentração de células era determinada baseando-se em seus quadrantes laterais e de acordo com a equação abaixo:

$$\text{Número de células/mL} = \frac{\text{Número de células contadas}}{\text{Número de quadrantes contadas}} \times \text{Fator de diluição} \times 1 \times 10^4$$

3.6.4. Avaliação da viabilidade celular pelo ensaio do MTT

O princípio desse método consiste em medir indiretamente a viabilidade celular pela absorção do sal tetrazólio MTT {brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]} pelas células, sendo reduzido no interior da mitocôndria, por meio da atividade enzimática de desidrogenases, ao produto chamado azul de formazan (MOSMANN, 1983). Assim, somente as células viáveis com mitocôndrias ativas, reduzem o MTT, de forma que a quantificação dos cristais de formazan detectada, por espectrofotometria, permite fazer uma correlação com a proporção de células vivas.

Após 24 horas que as células foram submetidas aos diferentes tratamentos, o meio de cultivo de cada poço era substituído por 150 μL de meio novo contendo uma solução de MTT (5 mg/mL) a 10%. As células foram levadas à incubadora a 37 °C por duas horas e meia para a metabolização do MTT. Após esse período, o meio contendo a solução de MTT foi removido e os cristais de formazan de cada poço foram solubilizados pela adição de 200 μL de DMSO. Após homogeneização dos cristais, foi realizada a leitura de absorbância a 595 nm, em espectrofotômetro (SpectraMax) conjugado com leitora de placas. O ensaio foi realizado com as amostras em triplicata, seguindo o protocolo estabelecido por SILVEIRA-LACERDA (2009).

3.6.5. A fonte luminosa LED (Light Emitting Diode)

A fonte de luz utilizada na avaliação da geração de oxigênio singleto e nos experimentos *in vitro* foi a mesma. Foram utilizados bancos de 20 diodos emissores de luz (LED – do inglês *Light Emitting Diode*). O circuito de alimentação foi montado pelo Professor Dr. Paulo Souza do Instituto de Física da Universidade de Brasília. O controle da corrente de alimentação capaz de garantir a estabilidade da iluminação foi realizado por um controlador LED, especificado na tabela 2.

O espectro de emissão do LED foi determinado utilizando um espectrofotômetro portátil e um potencímetro digital, ambos especificados na tabela 2. A partir do valor do espectro de emissão do LED foi definido o valor de potência máxima do LED e os valores de potência em função da distância, assim como a posição do banco de LEDs em relação ao material a ser irradiado. Para garantir a reprodutibilidade da intensidade luminosa emitida pelo banco de LEDs, optou-se por realizar periodicamente a aferição da energia por unidade de tempo mediante potencímetro. As medidas registradas pelo potencímetro e a área do detector permitiram determinar que a fonte de luz possuía densidade de potência de 0,04 W/cm^2 .

Dessa forma, a fluência aplicada nos ensaios foi determinada segundo a equação abaixo:

$$\text{Fluência (J/cm}^2\text{)} = \frac{\text{Potência (W) x Tempo de irradiação (s)}}{\text{Área irradiada do detector (cm}^2\text{)}}$$

Estudos prévios desenvolvidos por MONGE-FUENTES (2014), utilizando este equipamento, mostrou que a fluência necessária para gerar citotoxicidade nas células de melanoma murino (B16F10) utilizadas neste estudo, foi de 85,01 J/cm², com 5 cm de distância, em relação ao fundo da placa, em ângulo reto com 10 minutos de irradiação

3.6.6. Determinação da toxicidade do LED na viabilidade celular

Este ensaio foi realizado com a finalidade de determinar se apenas a irradiação da luz LED, sem a presença de micelas de Pluronic[®] F127 com Alumínio-Cloro-Ftalocianina (NP F127/AICIPc) era capaz de induzir citotoxicidade e assim conduzir à morte celular (Figura 11). As condições de irradiação de luz LED utilizada neste ensaio foram as mesmas utilizadas em estudo prévio desenvolvido por MONGE-FUENTES (2014), conforme descrito na seção 3.6.5. O experimento foi baseado em resultados desenvolvidos previamente por MONGE-FUENTES (2014).

Para tanto, 1 x 10⁴ células/poço foram cultivadas em placas de 96 poços nas condições descritas na seção 3.6.2. Após o período de 24 horas o meio de cultivo foi descartado, e as células foram lavadas por duas vezes com PBS e mantidas em 100 µL de PBS. A placa foi então irradiada com o LED, conforme seção 3.6.5. Após o tratamento, o PBS foi removido e as células foram cultivadas por 24 horas, quando então o possível efeito do *LED* na viabilidade celular foi determinado por MTT conforme descrito na seção 3.6.4. Foram realizados três experimentos independentes.

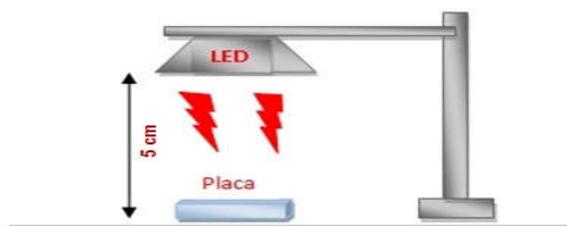


Figura 11: Esquema ilustrativo do LED em fluxo laminar utilizando um suporte de metal. Diodo emissor de luz com 85,1 J/cm² (LED) para irradiação de placa de 96 poços com células B16 F10 e B16F10FF.

3.6.7. Determinação da toxicidade das micelas de Pluronic[®] F127 com Alumínio-Cloro-Ftalocianina (NP F127/AICIPc) na viabilidade celular

Este ensaio foi realizado com a finalidade de determinar se apenas a formulação de micelas de Pluronic[®] F127 com Alumínio-Cloro-Ftalocianina (NP F127/AICIPc), ou as micelas de Pluronic[®] F127 sem o fotossensibilizante (NP F127) e ainda apenas o Alumínio-Cloro-Ftalocianina, sem qualquer irradiação da luz LED, eram capazes de induzir citotoxicidade e assim conduzir à morte celular.

Para tanto, 1×10^4 células/poço foram cultivadas em placas de 96 poços nas condições descritas na seção 3.6.2. Após o período de 24 horas o meio de cultivo foi descartado, e as células lavadas por duas vezes com PBS e então foram adicionados 100 μ L de NP F127/AICIPc, nas três diferentes concentrações (tabela 4), assim como de NP F127 e 0,01 μ g/mL de AICIPc. A placa foi protegida de irradiação luminosa pela cobertura com papel alumínio. As células permaneceram expostas a estas soluções por 15, 20 e 25 minutos, na incubadora de células. Em seguida, a placa foi transferida para o fluxo laminar e as células foram lavadas por duas vezes com PBS. A fim de manter o mesmo tempo experimental de quando são irradiadas, as células

permaneceram em PBS por mais 10 minutos, no interior do fluxo laminar. Após o tratamento, o PBS foi removido e as células cultivadas sob as condições descritas na seção 3.6.2 por 24 horas, quando então a viabilidade celular foi determinada por MTT conforme descrito na seção 3.6.4. Foram realizados três experimentos independentes e os grupos experimentais em triplicatas.

3.6.8 Avaliação da Terapia Fotodinâmica mediada por micelas de Pluronic® F127 com Alumínio-Cloro-Ftalocianina (NP F127/AICIPc)

Este ensaio foi realizado com a finalidade de determinar a eficácia da formulação de micelas de Pluronic® F127 com Alumínio-Cloro-Ftalocianina (NP F127/AICIPc) como fotossensibilizante a ser empregado na terapia fotodinâmica, avaliando a viabilidade celular.

Para tanto, 1×10^4 células/poço foram cultivadas em placas de 96 poços. Após o período de 24 horas o meio de cultivo foi descartado, e as células lavadas por duas vezes com PBS e então foram adicionados 100 μ L de NP F127/AICIPc, nas três diferentes concentrações (tabela 4), assim como de NP F127 e AICIPc. A placa foi protegida de irradiação luminosa pela cobertura com papel alumínio. Os tempos de incubação foram previamente analisados para a escolha de um tempo inicial de incubação. As células permaneceram expostas a estas soluções por 15, 20 e 25 minutos, na incubadora de células. Em seguida, a placa foi transferida para o fluxo laminar e as células foram lavadas duas vezes com PBS e mantidas em 100 μ L desta solução, quando então a placa foi irradiada com o LED, conforme seção 3.6.5. Após o tratamento, o PBS foi removido e as células cultivadas sob as condições descritas na seção 3.6.2 por 24 horas, quando então a viabilidade celular foi determinada por MTT conforme descrito na seção 3.6.4. Foram realizados três experimentos independentes e os grupos em triplicatas.

3.6.9 Avaliação da eficácia de duas sessões de Terapia Fotodinâmica mediada por micelas de Pluronic® F127 com Alumínio-Cloro-Ftalocianina (NP F127/AICIPc)

Este ensaio foi realizado com a finalidade de verificar se a aplicação de duas sessões de terapia fotodinâmica, com intervalo de 24 horas entre elas, aumentaria a eficácia da formulação de micelas de Pluronic[®] F127 com Alumínio-Cloro-Ftalocianina (NP F127/AICIPc), no tratamento de melanoma murino de células transformadas para a expressão de luciferase (B16F10FF), avaliando a viabilidade desta linhagem celular.

Os grupos que sofreram irradiação pelo LED, 24 horas após o plaqueamento, o meio de cultivo foi descartado, e as células lavadas por duas vezes com PBS e então foram adicionados 100 µL de NP F127/AICIPc, nas três diferentes concentrações (tabela 5), assim como de NP F127 e AICIPc. As células permaneceram expostas a estas soluções por 15, 20 e 25 minutos, na incubadora de células. Em seguida, a placa foi transferida para o fluxo laminar e as células foram lavadas duas vezes com PBS e mantidas em 100 µL desta solução, quando então a placa foi irradiada com o LED, conforme seção 3.6.5. Após o tratamento, o PBS foi removido e as células cultivadas sob as condições descritas na seção 3.6.2. Passadas 24 horas após a primeira aplicação de TFD, o meio de cultivo foi descartado e as células lavadas por duas vezes com PBS e então foram adicionados 100 µL de NP F127/AICIPc, nas três diferentes concentrações (tabela 4), assim como de NP F127 e AICIPc. As células permaneceram expostas a estas soluções por 15, 20 e 25 minutos, na incubadora de células. Em seguida, a placa foi transferida para o fluxo laminar e as células foram lavadas duas vezes com PBS e mantidas em 100 µL desta solução, e então a placa foi submetida a uma nova aplicação de TFD. Após o tratamento, o PBS foi removido e as células cultivadas sob as condições descritas na seção 3.6.2. Então, 24 horas após a segunda aplicação de terapia fotodinâmica, a viabilidade celular foi determinada por MTT conforme descrito na seção 3.6.4. Para isto, foram realizados três experimentos independentes em triplicata.

3.6.10 .Avaliação da eficácia de duas sessões de Terapia Fotodinâmica mediada por micelas de Pluronic® F127 com Alumínio-Cloro-Ftalocianina (NP F127/AICIPc), analisando a dinâmica de proliferação celular

Para confirmar a eficácia do tratamento de melanoma murino de células transformadas para a expressão de luciferase (B16F10FF) com duas sessões de terapia fotodinâmica medicada por NP F127/AICIPc, a capacidade de proliferação destas células foi analisada. Utilizou-se o sistema xCELLigence™ (Roche/ACEA), que emprega o instrumento RTCA (*Real Time Cell Analyzer*) que é mantido dentro de uma incubadora de cultura de células e que utiliza placas com microelétrodos de ouro para monitorar a proliferação celular em tempo real, por meio da detecção automatizada do índice de biomassa celular determinado pela impedância eletrônica.

Vale ressaltar que este ensaio foi realizado somente sob as condições de tempo de exposição e concentração da formulação NP F127/AICIPc em que a aplicação de duas sessões de terapia fotodinâmica foi mais eficaz.

Para esse ensaio, primeiramente eram colocados 100 µL de meio de cultura/poço em placa E-Plate16 (Roche/ACEA) para obter os valores basais. Uma vez estabilizado o sistema, 3×10^3 células sem tratamento, foram colocadas em cada poço. A placa foi mantida por 30 minutos no fluxo laminar, para a decantação das células e depois colocada no equipamento de RTCA, na incubadora de células. A proliferação celular foi analisada durante 24h. Depois desse tempo, o sistema de detecção foi pausado, o meio de cultura desprezado, os poços lavados uma vez com PBS e em seguida as células foram expostas a 100 µL de NP F127/AICIPc a 10 µg/mL. A placa foi protegida de irradiação luminosa pela cobertura com papel alumínio e mantida na incubadora de células por 25 minutos. Em seguida, a placa foi transferida para o fluxo laminar e as células foram lavadas por uma vez com PBS para eliminar resíduos da formulação e mantidas em 100 µL desta solução, quando então metade da placa foi irradiada com o LED, conforme seção 3.6.5. e a outra metade foi protegida da irradiação luminosa por papel alumínio. Após o tratamento, o PBS foi substituído por meio de cultivo e a placa reconectada ao equipamento de RTCA na incubadora. Após 24 horas, o sistema foi novamente pausado, o meio de

cultivo removido e as células lavadas por uma vez com PBS e mantidas em 100 µL desta solução, mantendo as mesmas condições, quando então a mesma metade da placa previamente irradiada foi novamente irradiada com o LED, conforme seção 3.6.5. e a outra metade foi protegida da irradiação luminosa por papel alumínio. Após o tratamento, o PBS foi substituído por meio de cultivo e a placa reconectada ao sistema do RTCA na incubadora de células. Este experimento foi realizado com duas exposições as micelas, com dois processos de incubação e duas aplicações de TFD, ou seja, foi realizado conforme o ensaio de viabilidade celular do item 3.6.9. Ao longo de 163 horas (seis dias e 19 horas), o valor de impedância na placa foi mensurado a cada 30 minutos, sendo que a dinâmica da proliferação celular (índice celular em função do tempo) foi analisada utilizando o software RTCA (Roche/ACEA). Este ensaio foi realizado em septuplicata.

3.7. Análise Estatística

Os dados foram avaliados por meio de estatística paramétrica ou não paramétrica de acordo com a distribuição da normalidade. Para os dados paramétricos foram realizada ANOVA. O programa estatístico utilizado foi o GraphPad Prims 6 (GraphPad software, EUA).

4. RESULTADOS

4.1 Caracterização coloidal das micelas de Pluronic® F127 com Alumínio-Cloro-Ftalocianina (NP F127/AICIPc)

Na caracterização das diferentes amostras das micelas de Pluronic® F127 com Alumínio-Cloro-Ftalocianina (NP F127/AICIPc) foram avaliados, logo após o preparo, as seguintes propriedades coloidais: diâmetro hidrodinâmico (DH), o índice de polidispersão (IPD), o potencial zeta (Pz) e o potencial hidrogeniônico (pH).

Os valores das propriedades coloidais avaliadas estão expressos na tabela 05. Observa-se que a formulação de micelas contendo 1 µg/mL de AICIPc apresentou

um ligeiro aumento no diâmetro hidrodinâmico com a incorporação do fotossensibilizante quando comparado com a formulação de micelas sem AICIPc (NP F127). O índice de polidispersão também permaneceu bastante próximo ao da amostra de micelas sem o fotossensibilizante, indicando que esta quantidade de AICIPc incorporada nas micelas não alterou a monodispersão da formulação.

Como esperado, nas maiores concentrações de AICIPc incorporada nas micelas, 5 e 10 µg/mL, observou-se um aumento significativo no diâmetro hidrodinâmico (DH), quando comparado com as micelas sem o fotossensibilizante. Um aumento significativo do índice de polidispersão também foi observado na amostra com 5 µg/mL de AICIPc, mostrando que nesta concentração do fotossensibilizante incorporado, a formulação tornou-se polidispersa, após a preparação das amostras de micelas de Pluronic® F127 com Alumínio-Cloro-ftalocianina (NP F127/AICIPc) ou sem o fotossensibilizante (NP F127).

Tabela 06: Valores médios do diâmetro hidrodinâmico (DH), do índice de polidispersão (IPD), do potencial zeta (Pz) e do potencial hidrogeniônico (pH) logo após o preparo das formulações.

Formulações	DH (nm)	IPD	Pz (mV)	pH
NP F127	25,88 ± 0,42	0,35 ± 0,05	-0,73 ± 0,88	6
NP F127/AICIPc 1 µg/mL	27,35 ± 0,21	0,34 ± 0,02	-2,52 ± 0,01	6
NP F127/AICIPc 5 µg/mL	71,33 ± 3,16	0,66 ± 0,02	-1,53 ± 0,01	7
NP F127/AICIPc 10 µg/mL	52,09 ± 2,17	0,33 ± 0,17	-0,37 ± 0,01	7

NP F127 (micelas sem FS); NP F127/AICIPc 1 µg/mL (com 1 µg/mL de AICIPc); NP F127/AICIPc 5 µg/mL (com 5 µg/mL de AICIPc); NP F127/AICIPc 10 µg/mL (com 10 µg/mL de AICIPc).

Quanto ao potencial zeta (Pz), observou-se na tabela 06 que as micelas mantêm a carga negativa após a incorporação do fotossensibilizante, até mesmo

nas maiores concentrações de ALCIPc . Ainda pode-se observar que o potencial hidrogeniônico (pH) das micelas nas duas maiores concentrações, tornou-se ligeiramente mais alcalino quando o fotossensibilizante foi incorporado.

4.2 Avaliação da estabilidade coloidal das micelas de Pluronic® F127 com Alumínio-Cloro-Ftalocianina (NP F127/AICIPc)

A determinação da estabilidade coloidal das micelas de Pluronic® F127 com diferentes concentrações de Alumínio-Cloro-Ftalocianina (NP F127/AICIPc), assim como das micelas sem o fotossensibilizante (NP F127) acondicionadas em diferentes temperaturas (4 °C, ± 25 °C e 37 °C) foi realizada ao longo de 63 dias, sendo analisadas as mesmas propriedades coloidais: o diâmetro hidrodinâmico (DH), o índice de polidispersão (IPD), o potencial zeta (Pz) e o potencial hidrogeniônico (pH).

A Figura 12 mostra a variação do diâmetro hidrodinâmico (DH) das micelas de Pluronic® F127 sem o fotossensibilizante (NP F127, figura 12A) e com diferentes concentrações de Alumínio-Cloro-Ftalocianina (NP F127/AICIPc, figuras 12B, C e D) armazenadas ao longo de 42 dias, nas temperaturas de 4, ~25 e 37 °C. Os valores obtidos entre 42 e 63 dias não foram inseridos, pois todas as amostras, sob as três diferentes temperaturas de armazenamento, tiveram o seu DH aumentado, em média, mais de 100 vezes, inviabilizando uma apresentação gráfica adequada.

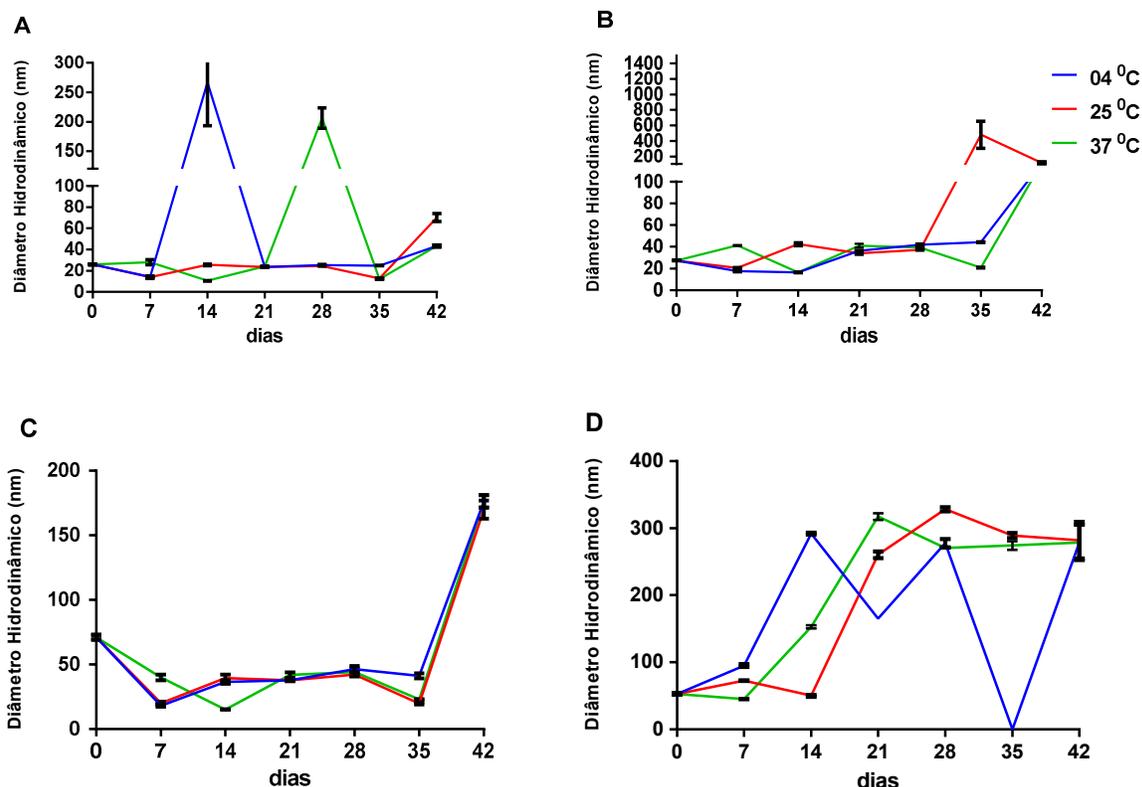


Figura 12. Variação do Diâmetro Hidrodinâmico (DH) por dispersão dinâmica de luz (DLS) das micelas de Pluronic® F127, com ou sem fotossensibilizante armazenadas, sob as condições de 4 °C (linha azul), ~25 °C (linha vermelha) e 37 °C (linha verde) ao longo de 42 dias. **A**– micelas sem AICIPc (NP F127). **B**– micelas com 1 µg/mL de AICIPc. **C**– micelas com 5 µg/mL de AICIPc. **D**– micelas com 10 µg/mL de AICIPc. Os dados estão representados como média ± E.P.M. para triplicatas (AICIPc = Alumínio-Cloro-Ftalocianina).

Observou-se que na amostra contendo micelas sem AICIPc (Figura 12A), quando armazenada a 37 °C, houve uma variação significativamente maior do valor médio do DH, após 28 dias de estocagem. Esta variação não foi observada na amostra estocada a ~25 °C, comparado ao valor determinado logo após a preparação da amostra, ou seja, esta manteve-se em torno de 25 nm. Após 14 dias, a amostra mantida a 4 °C também teve um aumento significativo do DH, porém a partir do 21º

dia o seu valor médio de DH manteve-se próximo ao que foi determinado após a preparação da amostra, no período de até 42 dias.

A amostra contendo a menor concentração de fotossensibilizante incorporado às micelas (Figura 12B), quando mantida a 25 °C, teve uma variação não significativa do DH até 28 dias. Contudo, após 35 dias, seu diâmetro foi alterado significativamente, aumentando mais de 40 vezes em comparação ao valor inicial ($p < 0,0001$). Quando comparado ao valor de DH determinado após a preparação, as amostras estocadas a 4 e 37 °C mantiveram-se estáveis ao longo dos 42 dias, com variações não significativas, apesar de, após 42 dias, os valores médios de DH, de ambas as amostras, terem aumentado (Figura 12).

Micelas com 5 µg/mL de AICIPc incorporado (Figura 12C), armazenadas em qualquer das temperaturas, tiveram diminuição significativa ($p < 0,0001$) dos valores médios de DH logo após 7 dias de estocagem. No entanto, em seguida as amostras a 4 e 25 °C, mostraram um aumento significativo ($p < 0,001$) de DH, mas ainda assim bem inferior ao determinado inicialmente. Esses valores médios de DH menores mantêm-se, significativamente, estáveis por 2 e 3 semanas, quando a 25 e 4 °C, respectivamente. Este mesmo comportamento é observado nas amostras armazenadas a 37 °C, porém o ligeiro aumento do DH ocorre somente após 21 dias e manteve-se assim estável por 2 semanas. Após 42 dias, todas as amostras já se desestabilizaram com o aumento significativo ($p < 0,0001$) do DH, quando comparado ao valor determinado logo após a preparação (Figura 12).

Já as micelas com 10 µg/mL de fotossensibilizante (Figura 12D), mantiveram o DH estável, por até 2 semanas, apenas quando estocadas a 25 °C, quando comparado ao valor determinado inicialmente. Esta estabilidade foi somente de 1 semana para amostras estocadas a 4 e 37 °C. Após estes períodos, os valores médios de DH aumentaram significativamente ($p < 0,0001$) para amostras estocadas em todas as temperaturas.

De um modo geral, a temperatura de ~25 °C foi a que melhor manteve os DH das formulações, ou seja, próximo ao observado logo após a preparação, por pelo menos uma semana, no máximo duas semanas (Figura 12).

Na Figura 13 é mostrado a variação do Índice de Poldispersão (IPD) das micelas de Pluronic® F127 sem o fotossensibilizante (NP F127, Figura 13A) e com diferentes concentrações de Alumínio-Cloro-Ftalocianina (NP F127/AICIPc, Figuras 13B, C e D) armazenadas ao longo de 42 dias, nas temperaturas de 4, ~25 e 37 °C. Os valores obtidos entre 42 e 63 dias não foram inseridos, pois para todas as amostras, sob as três diferentes temperaturas de armazenamento, o equipamento zetasizer apresentou valores que indicavam alta heterogeneidade da amostra, inviabilizando uma apresentação gráfica adequada.

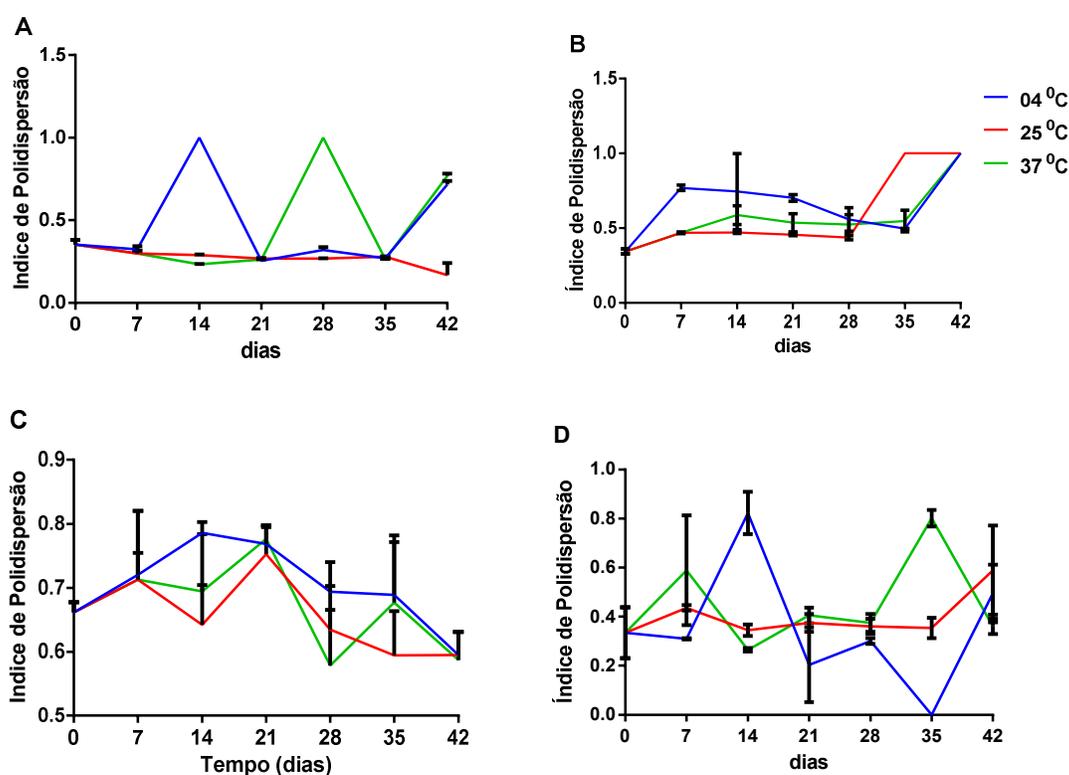


Figura 13. Variação do Índice de Poldispersão (IPD) por dispersão dinâmica de luz (DLS) das micelas de Pluronic® F127, com ou sem fotossensibilizante armazenadas, sob as condições de 4 °C (linha azul), ~25 °C (linha vermelha) e 37 °C (linha verde) ao longo de 42 dias. **A** – micelas sem fotossensibilizante (NP F127). **B** – micelas com 1 µg/mL de AICIPc. **C** – micelas com 5 µg/mL de AICIPc. **D** – micelas com 10 µg/mL de AICIPc. Os dados estão representados como média ± E.P.M. para triplicatas (AICIPc = Alumínio-Cloro-Ftalocianina).

Observou-se que as amostras contendo micelas sem AICIPc (Figura 13A) mantiveram o índice de polidispersão (IPD) com variação não significativa até 21 e 35 dias, somente quando mantidas a 37 e ~ 25 °C, respectivamente, permanecendo como soluções monodispersas. A amostra armazenada a 4 °C mostrou-se estável apenas por 7 dias.

Amostra de micelas contendo 1 $\mu\text{g/mL}$ de fotossensibilizante (Figura 13B) tornou-se significativamente ($p < 0,001$) polidispersa já com uma semana de armazenamento, quando mantida a 4 °C, comparado ao valor inicial. Já as amostras mantidas a ~ 25 e 37 °C mantiveram-se monodispersas, com variações de IPD não significativas, por 28 e 35 dias de estocagem, respectivamente; comparadas com o valor determinado logo após a preparação.

Amostra de micelas contendo 5 $\mu\text{g/mL}$ de AICIPc (Figura 13C) manteve, com variações não significativas, seu índice de polidispersão ao longo dos 42 dias, em todas as condições de temperatura de armazenamento. Para a amostra com 10 $\mu\text{g/mL}$ de fotossensibilizante (Figura 13D) incorporado nas micelas, o armazenamento a 4 e 37 °C, ao longo dos 42 dias, não teve variação significativa do IPD. No entanto, amostra mantida a ~ 25 °C manteve-se monodispersa somente por uma semana, quando comparado ao IPD determinado no início.

De forma semelhante ao Diâmetro Hidrodinâmico (DH), a temperatura de ~ 25 °C foi a que melhor manteve os IPDs das formulações próximos ao observado logo após a preparação, por pelo menos uma semana.

Na Figura 14 é mostrada a variação do Potencial Zeta (Pz) das micelas de Pluronic® F127 sem o fotossensibilizante (NP F127, Figura 14A) e com diferentes concentrações de Alumínio-Cloro-Ftalocianina (NP F127/AICIPc, Figuras 14 B, C e D) armazenadas ao longo de 42 dias, nas temperaturas de 4, ~ 25 e 37 °C. A fim de manter o mesmo padrão de apresentação de dados de DH e IPD, os valores de Pz obtidos entre 42 e 63 dias não foram inseridos.

Observou-se na Figura 14 que ao longo dos 42 dias de armazenamento, nas três diferentes temperaturas, o Potencial Zeta (Pz) das micelas sem o fotossensibilizante, com 1 $\mu\text{g/mL}$, 5 $\mu\text{g/mL}$ e 10 $\mu\text{g/mL}$ de AICIPc não teve variação significativa, mantendo-se, em boa parte do tempo, com carga negativa.

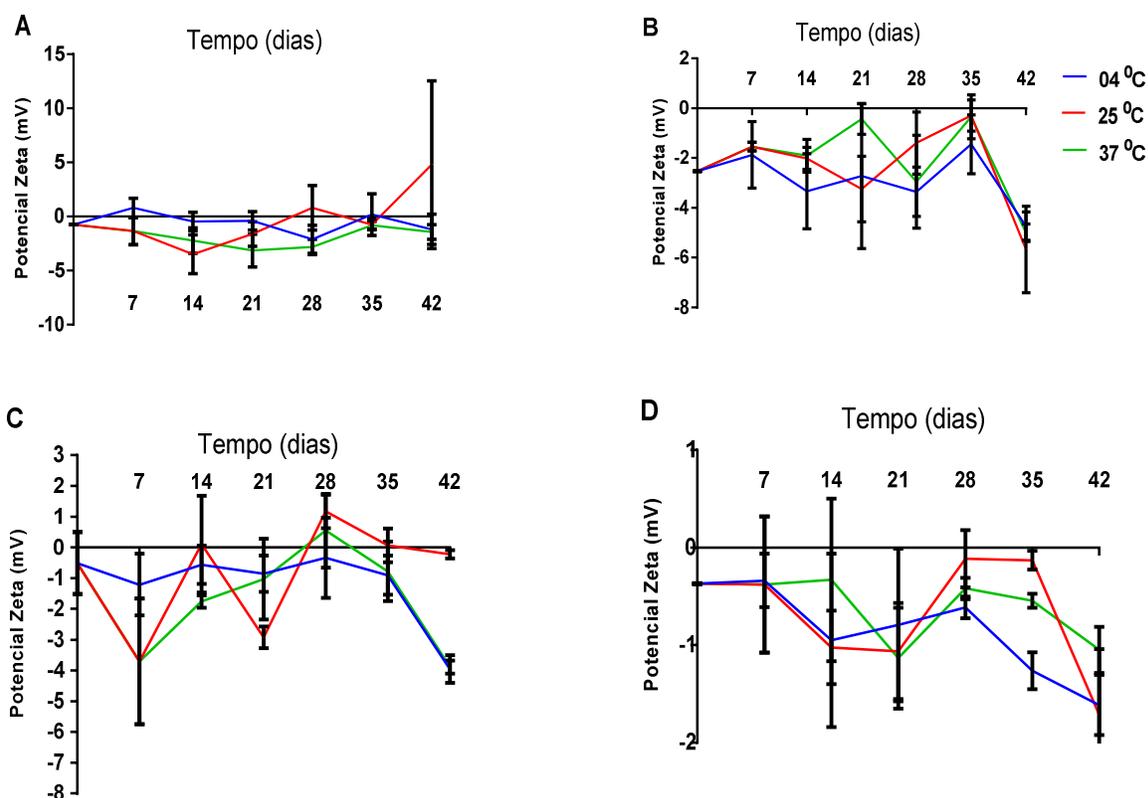


Figura 14. Variação do Potencial Zeta (Pz) por dispersão de luz eletroforética das micelas de Pluronic[®] F127, com ou sem fotossensibilizante armazenadas, sob as condições de 4 °C (linha azul), ~25 °C (linha vermelha) e 37 °C (linha verde) ao longo de 42 dias. **A** – micelas sem fotossensibilizante (NP F127). **B** – micelas com 1 µg/mL de AICIPc. **C** – micelas com 5 µg/mL de AICIPc. **D** – micelas com 10 µg/mL de AICIPc. Os dados estão representados como média ± E.P.M. para triplicatas (AICIPc = Alumínio Cloro Ftalocianina).

Quanto ao valor do potencial hidrogeniônico (pH) das micelas de Pluronic[®] F127 (Figura 15A,B,C) sem fotossensibilizante e com a menor concentração de Alumínio-Cloro-Ftalocianina (1 µg/mL) não foi observado nenhuma variação, permanecendo em 6 ao longo dos 63 dias, sob as três diferentes temperaturas de armazenamento. Já a formulação com 5 µg/mL de AICIPc, após uma semana de armazenamento em qualquer das temperaturas, teve o valor de pH medido em 6, sendo que inicialmente este era de 7. As micelas de Pluronic[®] F127 com 10 µg/mL, que também apresentavam inicialmente um pH de 7, passou a 6 após uma semana, apenas

quando armazenada a 4 °C (Figuras A) e após duas semanas quando armazenadas a 25 °C (Figura B) e 37 °C (Figura C). Apesar da ligeira acidificação das formulações com maior concentração de fotossensibilizante, elas ainda estavam dentro da neutralidade.

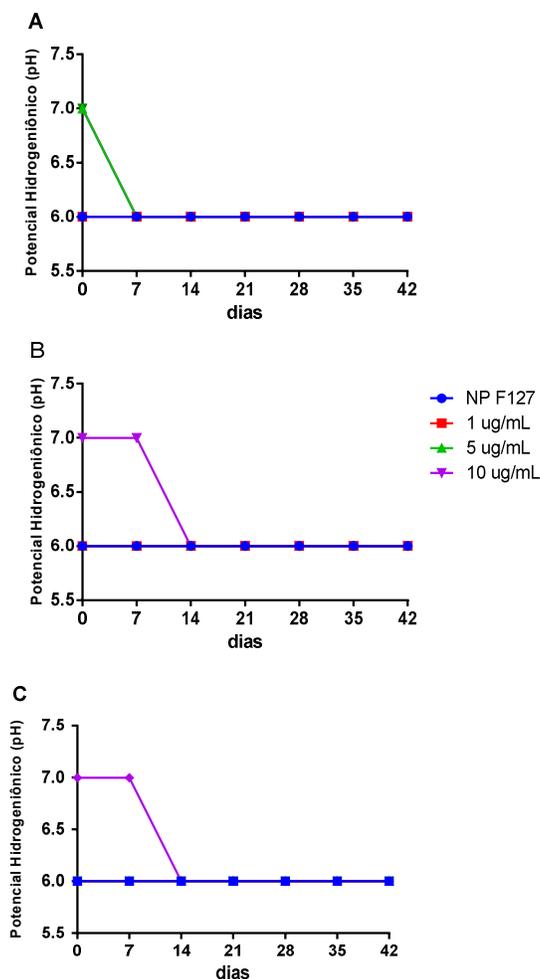


Figura 15. Variação do Potencial Hidrogeniônico (pH) das micelas de Pluronic® F127, com ou sem fotossensibilizante armazenadas, sob as condições de 4 °C (A), ~25 °C (B) e 37 °C (C) ao longo de 42 dias. Os dados estão representados como média ± E.P.M. para triplicatas (AICIPc = Alumínio–Cloro-Ftalocianina) e (NP F127 = micela sem Alumínio-Cloro-Ftalocianina).

Diante dos resultados expostos acima, observou-se que, de um modo geral, as micelas de Pluronic® F127 com diferentes concentrações de Alumínio-Cloro-

Ftalocianina (NP F127/AICIPc) mantiveram uma melhor estabilidade coloidal quando armazenadas a temperatura ambiente ($\sim 25\text{ }^{\circ}\text{C}$) por até 14 dias. Assim, para os estudos *in vitro*, decidiu-se utilizar amostras que tenham sido armazenadas nesta condição até duas semanas após a sua preparação, quando então um novo lote de micelas era preparado.

4.3 Caracterização fotofísica das micelas de Pluronic® F127 com Alumínio-Cloro-Ftalocianina (NP F127/AICIPc)

A caracterização fotofísica por espectroscopia das micelas de Pluronic® F127 com $1\text{ }\mu\text{g/mL}$ de Alumínio-Cloro-Ftalocianina (NP F127/AICIPc), assim como das micelas sem o fotossensibilizante (NP F127) mostrou picos de absorção e de emissão de luz na região do comprimento de onda do vermelho. Na Figura 16A, observa-se o espectro de absorbância com um único pico de absorção a 670 nm para a formulação com fotossensibilizante incorporado na concentração de $1\text{ }\mu\text{g/mL}$, semelhante a uma amostra padrão de AICIPc. Na figura 16B, observa-se o espectro de emissão de fluorescência (excitação em 360 nm) da NP F127/AICIPc com $1\text{ }\mu\text{g/mL}$ de fotossensibilizante com um pico de fluorescência a 680 nm , diferentemente das micelas sem fotossensibilizante (NP F127) que não apresentam pico de emissão.

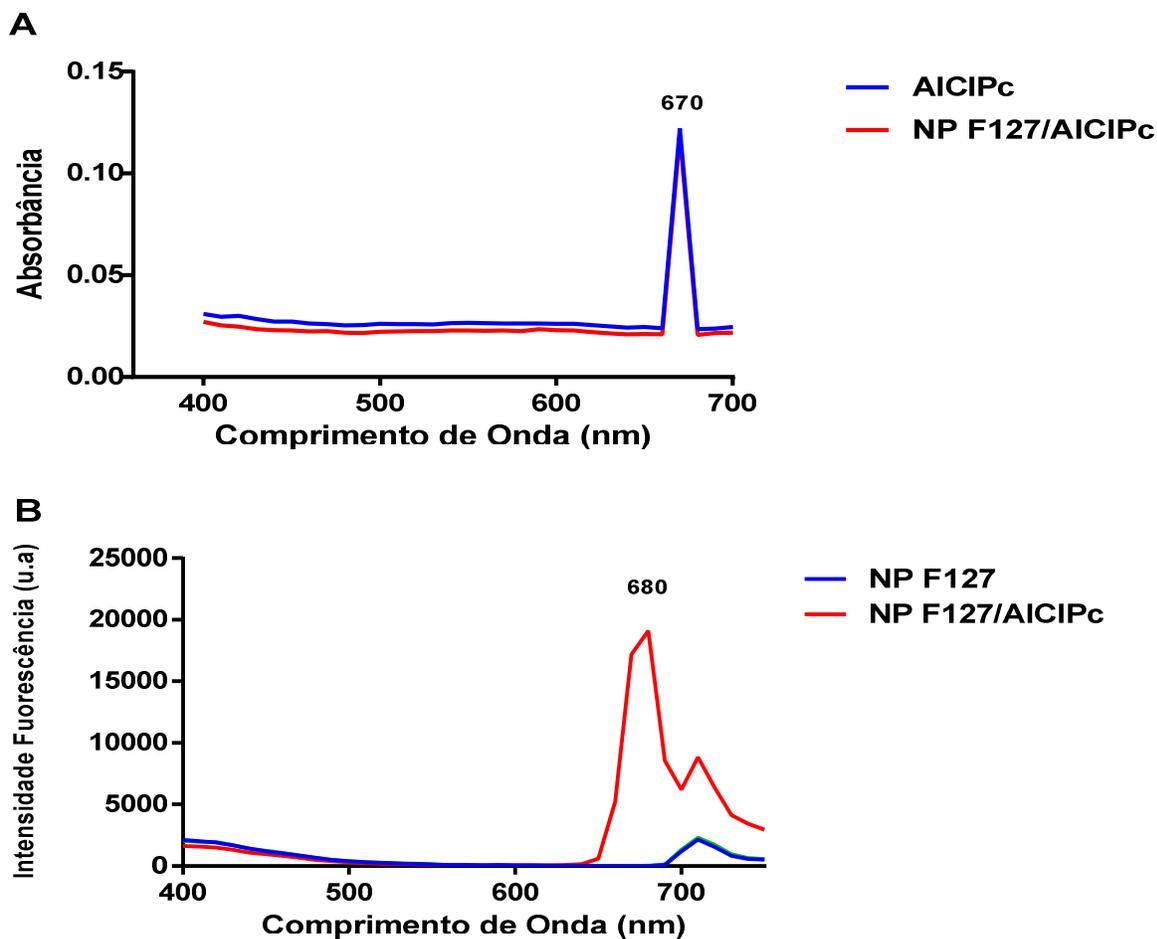


Figura 16. Espectro de absorção **(A)** e de emissão de fluorescência **(B)** com excitação a 360 nm de micelas de Pluronic[®] F127 sem fotossensibilizante e com 1 $\mu\text{g/mL}$ de Alumínio-Cloro-Ftalocianina (NP F127/AICIPc), após a preparação. Em **A**- pico único de absorção de 670 nm para a formulação com 1 $\mu\text{g/mL}$ de AICIPc. Em **B**- pico de emissão de fluorescência a 680 nm para micelas de Pluronic[®] F127 contendo 1 $\mu\text{g/mL}$ de AICIPc e ausência de emissão de luz para Pluronic[®] F127 em PBS.

4.4 Avaliação da Geração de Oxigênio Singlete pelas micelas de Pluronic[®] F127 com Alumínio-Cloro-Ftalocianina (NP F127/AICIPc)

As micelas de Pluronic[®] F127 com diferentes concentrações de Alumínio-Cloro-Ftalocianina (NP F127/AICIPc) foram capazes de gerar espécies reativas de oxigênio (ERO) segundo a técnica de decaimento do 1,3-difenil-isobenzofurano (DBF). Vale ressaltar que esta técnica é uma avaliação indireta da produção de ERO, pois é mensurada a absorvância que decai de forma diretamente proporcional à geração de ¹O₂, e não a produção em si de ERO.

Observa-se na Figura 17 que há um decaimento da absorvância do DBF de forma mais acentuada para a formulação que contém a maior concentração de AICIPc incorporada nas micelas, quando comparada com as formulações que contêm as menores concentrações do fotossensibilizante, em relação ao tempo de exposição ao LED. Todas as concentrações de fotossensibilizante apresentaram produção de ERO significativa ($p < 0,0001$) tanto em relação ao início da exposição ao LED quanto em relação ao controle ($p < 0,0001$). Apenas as micelas sem AICIPc não apresentaram decaimento de absorvância significativa, o que demonstra que não houve produção de ERO.

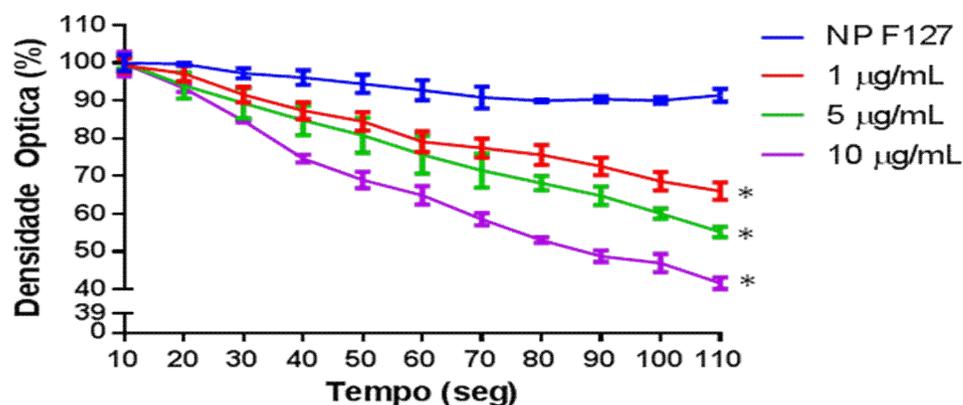


Figura 17. Valores percentuais da densidade óptica referente ao decaimento da absorvância do 1,3-difenil-isobenzofurano (DBF) em relação ao tempo de exposição ao LED de micelas de Pluronic[®] F127 sem (NP F127) e com diferentes concentrações de Alumínio-Cloro-Ftalocianina (NP F127/AICIPc a 1, 5 e 10 µg/mL). Os dados estão representados como média ± E. P. M. para triplicatas. * indica diferença estatística significativa com $p < 0,0001$.

4.5 Determinação da toxicidade do LED na viabilidade celular

Na Figura 18 é mostrado se a irradiação de luz LED, sem a presença de micelas de Pluronic[®] F127 com Alumínio-Cloro-Ftalocianina (NP F127/AICIPc) era capaz de induzir citotoxicidade e assim conduzir à morte tanto de células de melanoma (B16F10) quanto de melanoma modificado para expressar luciferase (B16F10FF). Pode-se observar que não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) na viabilidade de ambos os tipos celulares, após 10 minutos de irradiação do LED, quando comparada com as células que não foram irradiadas.

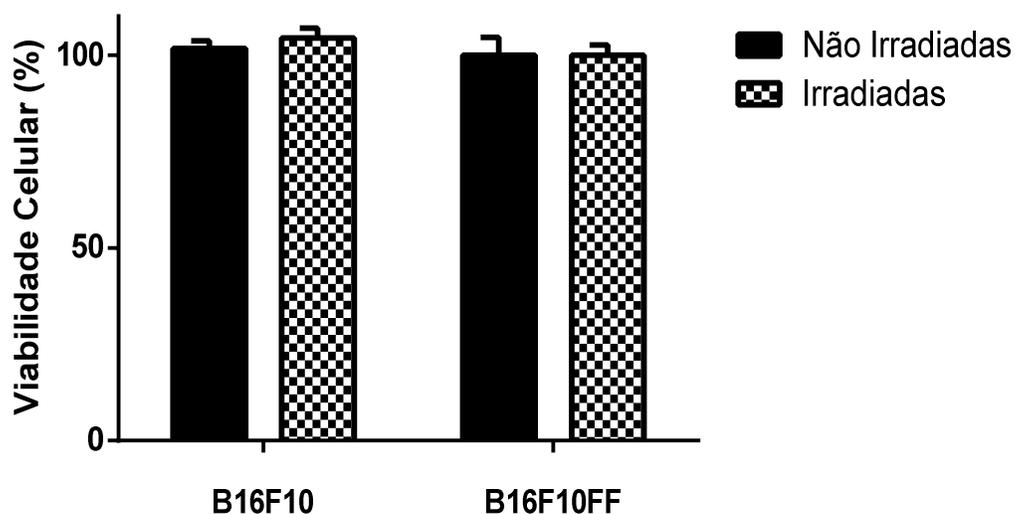


Figura 18. Viabilidade de células de melanoma murino (B16F10) e de melanoma modificada para expressar luciferase (B16F10FF) expostas ou não por 10 minutos de irradiação de diodo emissor de luz (LED) a $85,1 \text{ J/cm}^2$, avaliada posteriormente pelo método MTT. Os dados estão representados como média \pm E. P. M. Foram realizados três experimentos em triplicata. Não houve diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$).

4.6 Determinação da toxicidade das micelas de Pluronic[®] F127 com Alumínio-Cloro-Ftalocianina (NP F127/AICIPc) na viabilidade celular

Na Figura 19 é mostrada se apenas as exposições de células de melanoma murino - B16F10 (Figura 19A) e melanoma murino modificada com FireFly Luciferase - B16F10FF (Figura 19B) às formulações de micelas de Pluronic® F127 com diferentes concentrações de Alumínio-Cloro-Ftalocianina (NP F127/AICIPc), ou às micelas de Pluronic® F127 sem o fotossensibilizante (NP F127) e ainda, apenas ao Alumínio-Cloro-Ftalocianina (AICIPc), por 15, 20 ou 25 minutos, sem qualquer irradiação da luz LED, para avaliar se eram capazes de induzir citotoxicidade e assim conduzir à morte destas células.

Observa-se na Figura 19A que apenas 73% ($p < 0,05$) das células de melanoma murino (B16F10) permaneceram viáveis após 20 minutos de exposição a micelas de Pluronic® F127 com 10 $\mu\text{g/mL}$ de AICIPc, quando comparado com as células mantidas por 15, 20 e 25 minutos sem incubação com qualquer tipo de formulação (controle) e com a exposição por 20 minutos tanto de Alumínio-Cloro-Ftalocianina quanto de micelas sem AICIPc. As demais exposições não alteraram significativamente a viabilidade destas células, tanto comparado aos controles quanto entre as formulações, nos diferentes tempos estudados.

Em relação às células de melanoma murino modificada com FireFly Luciferase - B16F10FF (Figura 19B), verificou-se que não houve alteração significativa ($p > 0,05$) na viabilidade destas células em nenhuma das exposições às formulações, por qualquer dos tempos estudados, quando comparado aos controles (células não expostas) e entre as formulações.

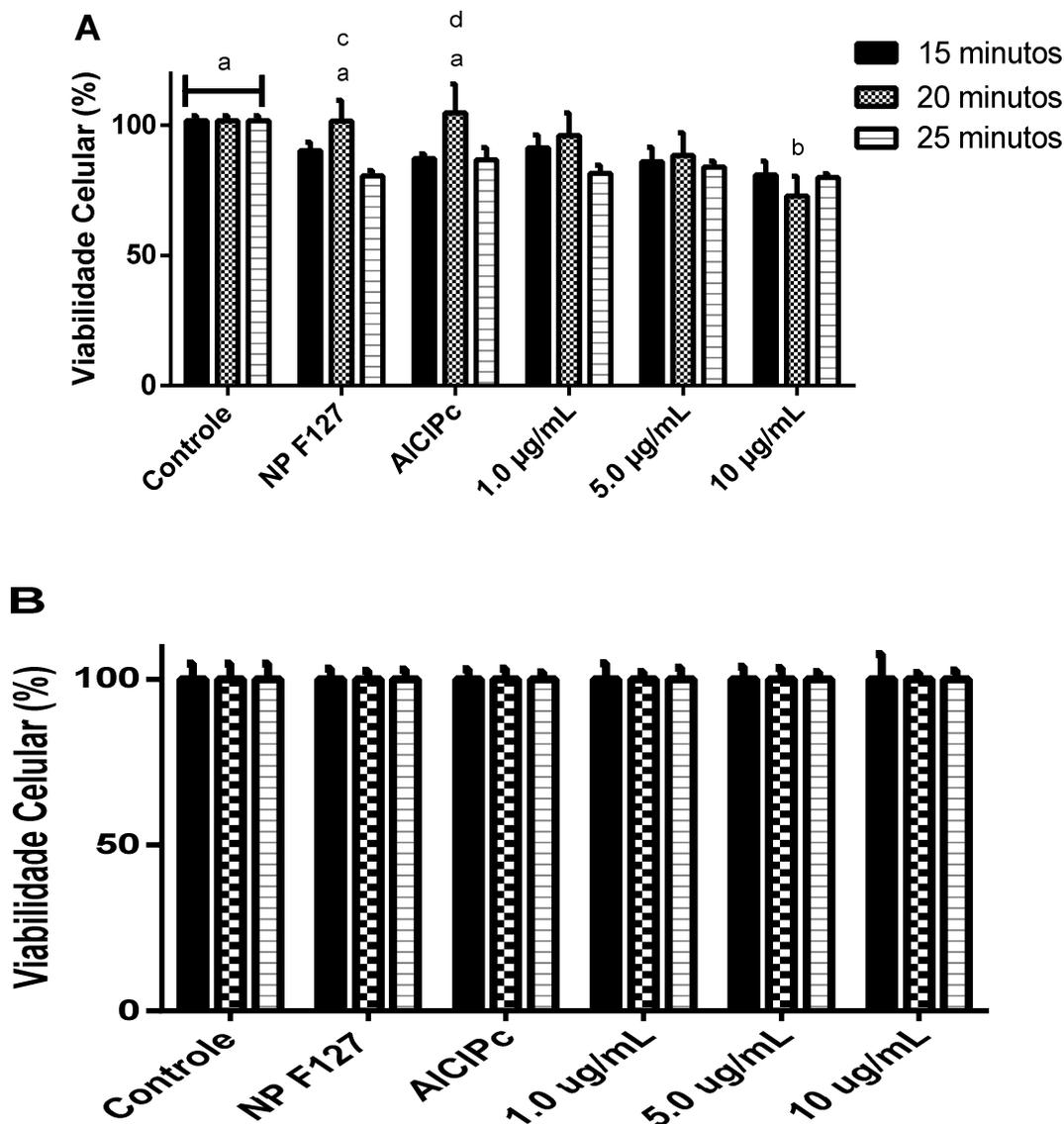


Figura 19. Viabilidade de células de melanoma murino, B16F10 **(A)** e de melanoma modificada para expressar luciferase, B16F10FF **(B)** expostas ou não (controle) às formulações de micelas de Pluronic® F127 com diferentes concentrações de Alumínio-Cloro-Ftalocianina (NP F127/AICIPc à 1, 5, 10 µg/mL), ou às micelas de Pluronic® F127 sem o fotossensibilizante (NP F127) e ainda, apenas ao alumínio-loro-ftalocianina (AICIPc), por 15, 20 ou 25 minutos, sem qualquer irradiação da luz LED, avaliada posteriormente pelo método MTT. Os dados estão representados como média ± E. P. M. Foram realizados três experimentos em triplicata. Letras diferentes significam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

4.7 Avaliação da Terapia Fotodinâmica mediada por micelas de Pluronic® F127 com Alumínio-Cloro-Ftalocianina (NP F127/AICIPc)

Uma vez determinado que somente a irradiação do LED ou a exposição, por diferentes tempos, às formulações de micelas sem e com o fotossensibilizante, porém sem irradiação do LED, não causaram efeitos citotóxicos, de significância biológica, nas células B16F10 e B16F10FF, a terapia fotodinâmica mediada por micelas de Pluronic® F127 com Alumínio-Cloro-Ftalocianina (NP F127/AICIPc) foi avaliada.

Na Figura 20 é mostrado se as exposições de células B16F10 (Figura 20A) e B16F10FF (Figura 20B) às formulações de micelas de Pluronic® F127 com diferentes concentrações de Alumínio-Cloro-Ftalocianina (NP F127/AICIPc), ou às micelas de Pluronic® F127 sem o fotossensibilizante (NP F127) e ainda, apenas ao Alumínio-Cloro-Ftalocianina (AICIPc), por 15, 20 ou 25 minutos, e 10 minutos de irradiação da luz LED a $85,1 \text{ J/cm}^2$, eram capazes de induzir citotoxicidade e assim conduzir à morte destas células.

Observa-se na Figura 20A que houve uma diminuição significativa de 24% ($p < 0,001$), na viabilidade de células B16F10 após a exposição por 25 minutos à NP F127 sem o fotossensibilizante quando comparada aos controles. O fotossensibilizante (AICIPc) sozinho, também reduziu significativamente ($p < 0,0001$) a viabilidade destas células, independente do tempo de exposição, quando comparado aos controles, com redução da viabilidade entre 27 e 46%.

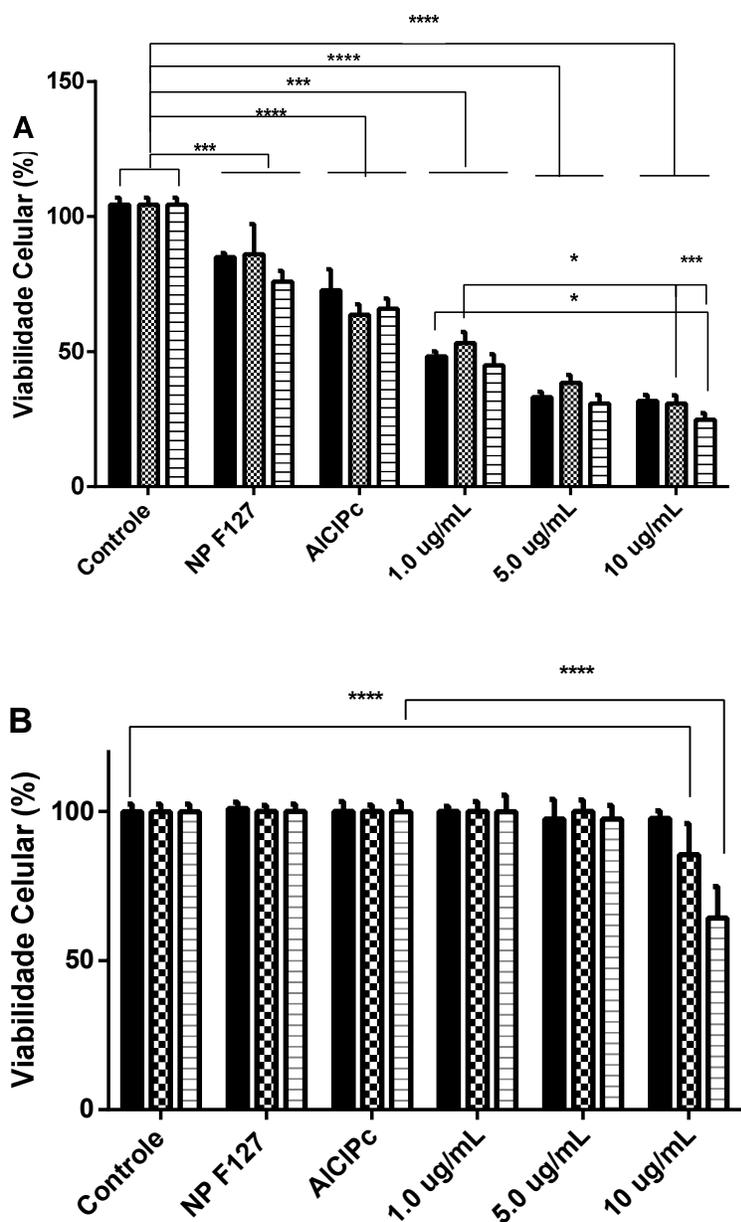


Figura 20. Viabilidade de células de melanoma murino, B16F10 **(A)** e de melanoma modificada para expressar luciferase, B16F10FF **(B)** expostas ou não (controle) às formulações de micelas de Pluronic® F127 com diferentes concentrações de Alumínio-Cloro-Ftalocianina (NP F127/AICIPc à 1, 5, 10 µg/mL), ou às micelas de Pluronic® F127 sem o fotossensibilizante (NP F127) e ainda, apenas ao Alumínio-Cloro-Ftalocianina (AICIPc), por 15, 20 ou 25 minutos, após irradiação por 10 minutos de diodo emissor de luz (LED) a 85,1 J/cm², avaliada posteriormente pelo método MTT. Os dados estão representados como média ± E. P. M. Foram realizados três experimentos em triplicata. * = diferença estatística com p<0,05; *** = diferença estatística com p<0,001 e **** = diferença estatística com p<0,0001.

Amostra de micelas de Pluronic[®] F127 com 1 µg/mL de AICIPc, independente do tempo de exposição, também reduziu significativamente ($p < 0,0001$) a viabilidade de B16F10 entre 47 e 65%, quando comparado aos controles (Figura 20A). Porém, a análise comparativa desta formulação com o efeito citotóxico causado pelo fotossensibilizante sozinho (AICIPc), mostrou uma diferença significativa ($p < 0,05$) na viabilidade celular somente na comparação da exposição das células por 15 minutos. Ou seja, nesta concentração de fotossensibilizante somente nos primeiros 15 minutos de exposição é que o AICIPc incorporado em micelas foi mais eficaz. A partir de 20 min de exposição o efeitos citotóxicos são iguais, mostrando que a citotoxicidade é dose-dependente.

Da mesma forma, amostra de micelas de Pluronic[®] F127 com 5 µg/mL de AICIPc, independente do tempo de exposição, também reduziu significativamente ($p < 0,0001$) a viabilidade de B16F10 entre 62 e 69%, quando comparado aos controles (figura 20A). Quando o efeito citotóxico desta formulação foi comparado com a exposição a AICIPc sozinho, independente do tempo de exposição, a viabilidade celular média diminuiu significativamente ($p < 0,0001$), de 67% (AICIPc) para 34% (NP F127/AICIPc a 5 µg/mL). No entanto, a comparação da citotoxicidade desta formulação com a de micelas contendo 1 µg/mL mostrou diferença significativa ($p < 0,05$) somente quando as células foram expostas por 25 minutos (viabilidade de 31%) em relação a exposição por 20 min a NP F127/AICIPc a 1 µg/mL (viabilidade de 53%).

Células de B16F10 (Figura 20A) quando expostas tanto por 15, 20 ou 25 minutos a amostra de micelas de Pluronic[®] F127 com 10 µg/mL de AICIPc tiveram sua viabilidade reduzida significativamente ($p < 0,0001$) entre 68 e 75%, nos dois maiores tempos, quando comparado aos controles. Esta formulação foi significativamente ($p < 0,0001$) mais eficiente que o fotossensibilizante sozinho em qualquer dos tempos de exposição, tendo reduzido o percentual de células viáveis de 67 para 29%. Quando o efeito citotóxico desta formulação foi comparado com a exposição a micelas de Pluronic[®] F127 com 1 µg/mL de AICIPc, houve significativamente ($p < 0,05$) mais morte do que das células, quando expostas a maior

concentração de fotossensibilizante por 25 minutos quando comparado a exposição por 15 minutos a NP F127/AICIPc com 1 µg/mL, a mesma significância foi observada na redução da viabilidade quando expostas por 20 minutos, porém a morte celular foi mais significativa ($p < 0,001$) quando as células foram expostas por 25 minutos a maior concentração do que por 20 minutos na concentração de 1 µg/mL. Quando os efeitos citotóxicos das formulações NP F127/AICIPc a 5 e 10 µg/mL foram comparadas, não foi observada nenhuma diferença significativa ($p > 0,05$) na viabilidade destas células.

Em relação às células B16F10FF (Figura 20B), verificou-se que, comparado ao controle, não houve alteração significativa ($p > 0,05$) na viabilidade destas células quando expostas, independente do tempo à NP F127, fotossensibilizante e NP F127/AICIPc na dose de 1 e 5 µg/mL. Também foi observado adiminuição na viabilidade celular quando expostas por 15 e 20 minutos a NP F127/AICIPc a 10 µg/mL. A viabilidade somente foi reduzida significativamente ($p < 0,0001$), 64%, quando as células foram expostas, por 25 minutos, a maior concentração de AICIPc em micelas, comparado ao controle e aos demais grupos.

4.8 Avaliação da eficácia de duas sessões de Terapia Fotodinâmica mediada por micelas de Pluronic® F127 com Alumínio-Cloro-Ftalocianina (NP F127/AICIPc)

Uma vez determinado que as células de melanoma murino modificadas com FireFly Luciferase (B16F10FF) não tinham a sua viabilidade celular alterada, significativamente, seja apenas pela irradiação do LED, pela exposição por diferentes tempos, às formulações de micelas sem e com o fotossensibilizante, com uma única sessão de TFD ou com as formulações mas sem irradiação do LED, uma nova abordagem terapêutica foi realizada, já que este era o tipo celular de interesse de uso em futuros estudos de diagnóstico de câncer por imagens de bioluminescência.

Assim, a terapia fotodinâmica mediada por micelas de Pluronic® F127 com Alumínio-Cloro-Ftalocianina (NP F127/AICIPc) em diferentes concentrações foi avaliada, em duas sessões, onde após 24 horas da primeira sessão de TFD, foi

realizada uma segunda sessão afim de avaliar o comportamento e a viabilidade celular, uma vez que apenas uma sessão não foi suficiente para eliminar totalmente as células tumorais.

Na Figura 21 é mostrada se as exposições de células de melanoma murino modificada com FireFly Luciferase - B16F10FF (Figura 19) às formulações de micelas de Pluronic® F127 com diferentes concentrações de Alumínio-Cloro-Ftalocianina (NP F127/AICIPc), ou às micelas de Pluronic® F127 sem o fotossensibilizante (NP F127) e ainda, apenas ao Alumínio-Cloro-Ftalocianina (AICIPc), por 15, 20 ou 25 minutos, e 10 minutos de irradiação da luz LED a 85,1 J/cm², seguida de uma nova exposição às diferentes formulações, pelos mesmos tempos, assim como uma segunda sessão de TFD, nas mesmas condições da anterior, com um intervalo de 24 horas entre elas, eram capazes de induzir uma maior citotoxicidade.

Observa-se na figura 21 que houve uma diminuição significativa, 44% ($p < 0,0001$), na viabilidade de B16F10FF após a exposição por 20 e 25 minutos à NP F127 sem o fotossensibilizante, e de 17% ($p < 0,05$) quando expostas por 15, comparadas aos controles. De forma similar, o fotossensibilizante (AICIPc) sozinho, também reduziu significativamente ($p < 0,0001$) a viabilidade destas células, principalmente após 20 e 25 minutos de exposição, quando comparado aos controles, com redução da viabilidade de 65 e 58%, respectivamente. Da mesma forma, a exposição por 15 minutos causou uma redução menor, apenas de 82,5% ($p < 0,05$). Interessantemente, NP F127/AICIPc com as três diferentes concentrações de fotossensibilizante, independente do tempo de exposição, causaram a morte, de forma igualmente significativa ($p < 0,0001$), de 93,2 a 97,5% das células, o que não foi observado com a aplicação de uma única TFD.

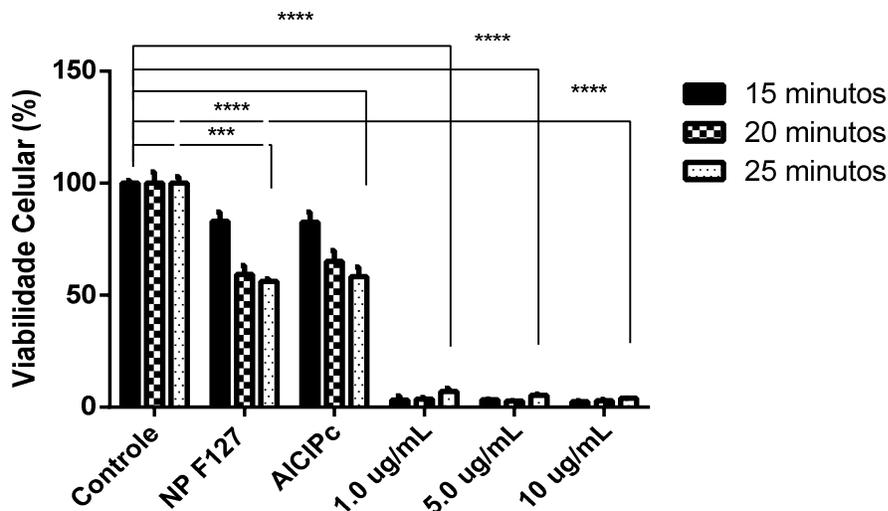


Figura 21. Viabilidade de células de melanoma murino modificadas para expressar luciferase, B16F10FF expostas ou não (controle) às formulações de micelas de Pluronic® F127 com diferentes concentrações de Alumínio-Cloro-Ftalocianina (NP F127/AICIPc à 1, 5, 10 $\mu\text{g/mL}$), ou às micelas de Pluronic® F127 sem o fotossensibilizante (NP F127) e ainda, apenas ao Alumínio-Cloro-Ftalocianina (AICIPc), por 15, 20 ou 25 minutos, após irradiação por 10 minutos de diodo emissor de luz (LED) a $85,1 \text{ J/cm}^2$, seguida de uma nova exposição às diferentes formulações, pelos mesmos tempos, assim como uma segunda sessão de irradiação de LED, nas mesmas condições da anterior, com um intervalo de 24 horas entre elas, avaliada posteriormente pelo método MTT. Os dados estão representados como média \pm E. P. M. Foram realizados três experimentos em triplicata. * = diferença estatística com $p < 0,05$; *** = diferença estatística com $p < 0,001$ e **** = diferença estatística com $p < 0,0001$.

4.9 Avaliação da eficácia de duas sessões de Terapia Fotodinâmica mediada por micelas de Pluronic® F127 com Alumínio-Cloro-Ftalocianina (NP F127/AICIPc), analisando a dinâmica de proliferação celular.

Para confirmar a eficácia do tratamento de melanoma murino de células transformadas para a expressão de luciferase (B16F10FF) com duas sessões de terapia fotodinâmica medicada por NP F127/AICIPc, a capacidade de proliferação destas células foi analisada, utilizou-se o sistema xCELLigence™ (Roche/ACEA). Vale ressaltar que este ensaio foi realizado somente com a exposição das células a NP F127/AICIPc 10 µg/mL, por 25 minutos; e em duas sessões de TFD.

Na Figura 22 é mostrado se as exposições de células de melanoma murino modificada com FireFly Luciferase (B16F10FF) a micelas de Pluronic® F127 com 10 µg/mL de Alumínio-Cloro-Ftalocianina (NP F127/AICIPc), por 25 minutos, e 10 minutos de irradiação da luz LED a 85,1 J/cm², seguida de uma nova exposição a mesma formulação e igual tempo de incubação, assim como uma segunda sessão de TFD, nas mesmas condições da anterior, com um intervalo de 24 horas entre elas, eram capazes de alterar a sua proliferação.

Observa-se na figura 22 que nas primeiras 24 horas as células proliferam igualmente em todos os poços conforme as células controle, pois em todos os poços só estão presentes as células, não houve exposição a NP F127/AICIPc e nem irradiação com LED. Passadas 24 horas, algumas células foram expostas por 25 minutos a 10 µg/mL NP F127/AICIPc e aplicada a primeira TFD – irradiadas, outras células foram apenas irradiadas pelo LED, sem o fotossensibilizante – controle irradiadas; outras células expostas ao AICIPc mas não irradiadas pelo LED – não irradiadas; e células sem exposição ao fotossensibilizante e também não irradiadas – controle não irradiada. Observa-se que logo após a aplicação da 1ª TFD, há uma maior diminuição do índice celular das células irradiadas, quando comparado ao controle não irradiada. Cerca de quatro horas após a TFD, estas células conseguem recuperar a sua capacidade proliferativa, tanto as células do controle não irradiadas quanto as células irradiadas, porém as irradiadas têm uma recuperação ligeiramente menor (não significativa – $p > 0,05$) que o controle.

Na figura 22 também é mostrado que 24 horas após a 1ª TFD as diferenças nos índices celulares dos grupos são pequenas, não significativas ($p > 0,05$). Uma nova exposição ao fotossensibilizante em micelas e a aplicação de uma segunda TFD causou um efeito similar ao da primeira aplicação da TFD, ou seja, uma queda

no índice celular, principalmente das células expostas e irradiadas. Novamente, estas células recuperam a capacidade de proliferar, sendo que as células expostas e irradiadas aparentam uma recuperação menor, porém esta não difere significativamente ($p>0,05$) do controle não irradiadas. Após 80 horas, as células do controle não expostas e nem irradiadas têm o índice celular reduzido significativamente mais do que as demais células, pois as células entram em confluência mais rápido, o que causa um número maior de células mortas, quando comparado aos demais grupos, onde o método utilizado avalia qualitativamente.

O RTCA das células B16F10FF, gerou perfis de resposta celular dependente de tempo após o tratamento com TFD. A primeira sessão de TFD ocorreu 24 horas após o plaqueamento, onde pode-se observar o decaimento do IC, seguido de uma recuperação do crescimento. Na segunda sessão de TFD ocorreu 24 horas após a primeira sessão de TFD, onde se observa novamente um decaimento do IC, também seguido de uma recuperação da proliferação celular.

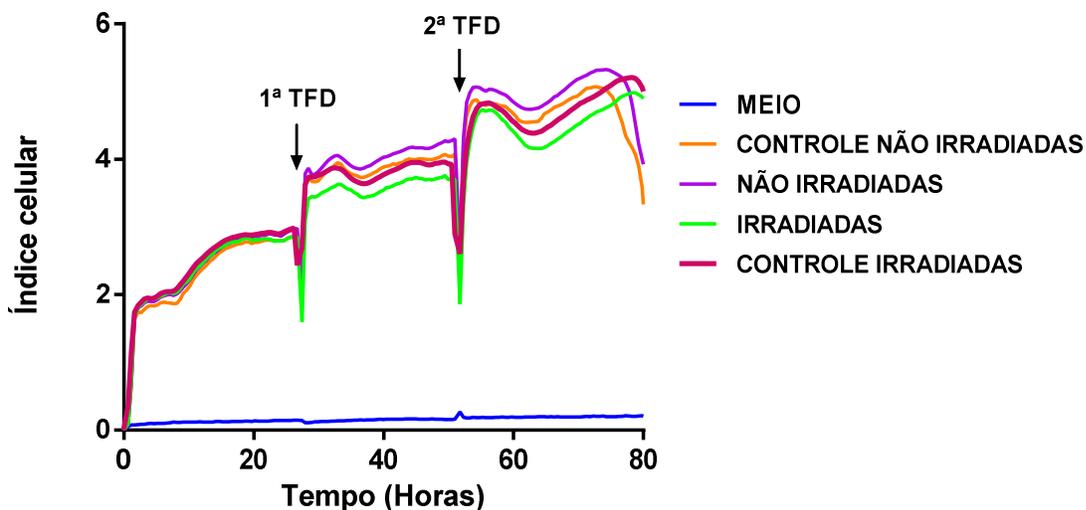


Figura 22. Avaliação de duas sessões de TFD com duas incubações de 25 minutos com micelas de NP F127/AICIPc 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. A 1ª aplicação após 24 horas e a 2ª após a primeira aplicação de TFD, ilustram o decaimento da proliferação celular nos grupos controle de células irradiadas e células irradiadas. e analisando pela dinâmica de proliferação celular.

5. DISCUSSÃO

A Organização Mundial de Saúde estima que, no ano de 2030, haverá 27 milhões de casos de câncer, 17 milhões de mortes por câncer. A cada ano, globalmente, ocorrem cerca de 2,5 milhões de casos de câncer não-melanoma e aproximadamente 132.000 casos de melanoma. Em muitos países o melanoma é considerado um problema de saúde pública, sendo ele então responsável por 75-80% das mortes relacionadas ao câncer de pele (NCBI, 2015). Segundo estimativas de câncer no Brasil, foram previstos para 2014, 2.960 novos casos de melanoma em homens e 2.030 em mulheres (INCA, 2016). Para este mesmo ano, foi previstos aproximadamente, 76.100 novos casos nos Estados Unidos (NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2015).

O melanoma cutâneo é um câncer de fácil detecção por ser facilmente visualizado. Quando um melanoma é detectado em seus estágios iniciais ele apresenta um bom prognóstico. Contudo, após o processo de progressão tumoral, gerando metástases, ele se torna um tumor de difícil tratamento (FIDLER, 2003). Sendo assim, apesar da sua baixa taxa de incidência, sua letalidade é elevada, pois a taxa de sobrevida de cinco anos dos pacientes com metástase em linfonodos varia de 13 a 69% dos casos, dependendo da quantidade de linfonodos afetados. Quando há a metastização em outros órgãos, o tempo médio de sobrevida é estimado em oito meses, sendo que somente 10% dos pacientes sobrevivem mais de cinco anos após o diagnóstico (CHUDNOVSKY *et al.*, 2005; GARBE *et al.*, 2011; NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2015; CANCER RESEARCH UK, 2015).

A terapêutica mantém-se de certa forma estacionária nos últimos 30 anos, baseando-se na terapia convencional química e/ou radiação, bem como na cirurgia (FARRELL, *et al.* 2011). A remoção cirúrgica de um tumor sólido e do tecido de margem de segurança é das opções eletivas para o tratamento quando a localização e o tamanho da neoplasia permitem a remoção cirúrgica do tumor. No entanto, este procedimento não elimina metastização e é ineficaz contra tumores não-sólidos. Adicionalmente, estudo de SHAPIRO & FUNGMAN (1957) mostrou a ineficácia das

terapias convencionais quando usadas individualmente, a multiterapia, ou seja, a combinação de ciclos de quimioterapia, radioterapia e imunoterapia (após cirurgia ou sem cirurgia), uma escolha assertiva (FENG *et al.*, 2003; GU *et al.*, 2007).

A nanotecnologia vem sendo utilizada como meio de diagnóstico ou terapêutica e, recentemente, com uma co-função de ambos. Como forma de tratamento, a nanotecnologia pode se valer de nanosistemas como as micelas poliméricas carreadoras de fotossensibilizantes para aplicação da terapia fotodinâmica (TFD) em patologias como cânceres dos tipos: bucal, bexiga, pulmão, pele (primário e metastático do seio), intestino, trato digestivo superior, bexiga, dentre outros, assim como também na detecção e delineamento de lesões por fluorescência (MACHADO, 2000). Estes resultados correlacionam-se com diversos estudos anteriores que afirmam a importância da nanotecnologia no aumento da biodisponibilidade e farmacocinética de terapias oncológicas clássicas (FONSECA, *et al.* 2002; MANDAL, *et al.* 2009; YONCHEVA, *et al.* 2012; ZHANG, *et al.* 2013).

A proposta desse trabalho foi avaliar a utilização de micelas de Pluronic[®] F127 para o carregamento de AICIPc, sendo o Pluronic[®] F127 um copolímero tri-bloco de poli(óxido de etileno) (PEO) e poli(óxido de propileno) (PPO), também chamado de polaxamer (Figura 07) (SCHMOLKA, 1972) com tamanho maior que 100 nm (TAILLEFER *et al.*, 2000). O segmento PPO é relativamente hidrofóbico comparado aos segmentos de PEO circundantes. Graças à diferença de hidrofobicidade entre o PEO e o PPO, esse copolímero rapidamente configura-se em micelas quando em água, se a quantidade de polímero estiver acima da CMC, que neste trabalho, foi de 0,15:3% (peso/volume).

Devido ao estudo *in vitro*, que necessitava das micelas em um baixo grau de gelificação para que fosse possível o processo de internalização das mesmas pelas células tumorais B16F10 e B16F10FF em cultivo e, portanto, não possuem o mesmo sistema encontrado *in vivo*, foi utilizado nesse trabalho a CMC do Pluronic[®] F127.

Em função de sua natureza, dificuldades técnicas são encontradas na caracterização físico-química das nanopartículas poliméricas. A caracterização das micelas engloba a avaliação da distribuição de tamanho das partículas (o diâmetro hidrodinâmico), do índice de polidispersão e a determinação do potencial zeta e do

pH e, ainda, a avaliação da estabilidade em função do tempo e da temperatura de armazenamento (MAGENHEIM & BENITA 1991; LEGRAND *et al.*, 1999).

Neste trabalho, os valores médios do diâmetro hidrodinâmico (DH), encontrados ao longo do período de avaliação da estabilidade, foram maiores do que os determinados logo após a síntese, para a maioria das formulações armazenadas tanto a 4 quanto a 37 °C. As formulações mantidas a 25 °C tiveram este parâmetro mais conservado ao longo do tempo.

Os valores médios do diâmetro hidrodinâmico observados no período de 42 dias, indicam que o aumento nos tamanhos micelares observado quando as formulações foram armazenadas a 4°C, foi acompanhada por um aumento da hidratação do núcleo micelar de AICIPc, segundo relata BASAK & BANDYOPADHYAY (2013). Mas, o aumento da temperatura também provoca desidratação micelar pronunciada, de acordo com os achados de RAISING *et al.*, (1984), pois a temperatura elevada promove a expulsão das moléculas de água da rede de polímeros, que mudam a sua configuração espacial podendo deixar a micela com DH aumentado. Isso acontece com todos os Pluronicos, já que a agregação de F127 está igual e fortemente influenciada pela temperatura (PRASAD *et al.*, 1979; TURRO & CHUNG, 1984; RASSING & MCKENNA, 1984; WANKA *et al.*, 1994; HOLLAND *et al.*, 1995; CHU & ZHOU, 1996;). Portanto, o ocorrido na avaliação da estabilidade para as micelas de NP F127/AICIPc está dentro do esperado. Outro fator que pode estar ocasionando o aumento do DH é um provável aprisionamento de moléculas de água pelas cadeias poliméricas, a partir das ligações de hidrogênio com as correntes de poli (oxietileno) (SCHERLUND *et al.*, 2000; LIN & ALEXANDRIDIS, 2002; FOSTER & COSGROVE, 2009).

Vale ressaltar que um fenômeno interessante acontece com vários copolímeros de polioxietileno. Eles apresentam o chamado “cloud point” ou “clouding temperature” (“ponto de turvação” ou “temperatura de nuvem”). O “cloud point” ocorre à medida que a temperatura do sistema aumenta, sua solubilidade em água diminui devido à quebra das ligações de hidrogênio entre o polioxietileno e a água, e o sistema começa a formar uma segunda fase que lhe confere turbidez; a

temperatura a partir da qual o sistema forma essa nova fase faz com que as propriedades do surfactante possam ser perdidas a partir de então (MYERS, 1992).

Em relação ao índice de polidispersão (IPD), nas três temperaturas de armazenamento, a avaliação da estabilidade das formulações mostrou que os valores de IPD aumentam conforme a concentração do fotossensibilizante AICIPc aumenta também, a exceção da formulação NP F127 10 µg/mL, que apresentou valores quase idênticos nas três temperaturas, sendo que estes valores são menores do que os das NP F127 1 µg/mL e NP F127 5 µg/mL. A temperatura que teve um melhor IPD foi a de ~25 °C. Porém, pelos valores apresentados, todas as formulações em todas as temperaturas, apresentaram-se polidispersas ou tendendo à polidispersão (ANTON & VANDAME, 2009; SOLÈ *et al.*, 2012; FRYD & MASON, 2012).

Outro parâmetro igualmente importante na avaliação da estabilidade é o potencial zeta (Pz), que reflete o potencial de superfície das partículas. O Pz é influenciado pelas mudanças na interface com o meio dispersante, em razão da dissociação de grupos funcionais na superfície da partícula ou da adsorção de espécies iônicas presentes no meio aquoso de dispersão (MAGENHEIM & BENITA 1991; MOSQUEIRA *et al.*, 2000). Os valores encontrados neste trabalho, ao longo do período de avaliação da estabilidade, mostram que as micelas com o fotossensibilizante, em diferentes concentrações, permanecem com uma carga de superfície resultante ainda negativa, tendendo a neutra, como quando recém-preparadas, independente da temperatura de armazenamento.

Os poloxameros, os tensoativos não-iônicos, como o Pluronic F127[®], tendem a reduzir o valor absoluto deste parâmetro (LEGRAND *et al.*, 1999). Em módulo, um valor de potencial zeta relativamente alto é importante para uma boa estabilidade físico-química da suspensão coloidal, pois grandes forças repulsivas tendem a evitar a agregação em função das colisões ocasionais de nanopartículas adjacentes (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). Os resultados apresentados para o potencial zeta (Figura 8A, B,C,D) demonstram que a NP F127/AICIPc apresentou uma superfície relativamente neutra, mesmo com a adição de alumínio-cloro-ftalocianina, que é considerada levemente positiva. Os valores do potencial zeta, se comparados

com a NP F127 sem AICIPc, apresentaram pouca variação quanto a sua carga. Isso demonstra que esse sistema não tem muita estabilidade, mas em contrapartida, possui uma ótima atividade biológica.

Em estudo sobre carga de nanopartículas foi demonstrado que partículas com um potencial entre -30 mV e +30 mV são mais estáveis em suspensão e apresentam menor agregação, assim como também foi demonstrado que partículas neutras apresentam menor taxa de opsonização se comparadas às partículas altamente carregadas (SWAMI *et al.*, 2012). Estes dados foram confirmados por um estudo de XIAO *et al.*, (2011) que avaliou o efeito de partículas com o mesmo tamanho, mas cargas diferentes, quando incubadas com macrófagos de rato. Os autores mostraram que partículas com um potencial muito negativo ou muito positivo eram facilmente internalizadas pelos macrófagos (XIAO *et al.*, 2011).

Portanto, as partículas devem apresentar uma superfície neutra ou relativamente negativa, para não interagir com o sistema imunitário ou com proteínas do soro, garantindo uma atividade biológica máxima (AGGARWAL *et al.* 2009).

Os valores de pH encontrados nas formulações de NP F127/AICIPc apresentaram uma basicidade (pH 7) para a F127/AICIPc 10 µg/mL a ~25 °C, na leitura inicial (logo após o preparo) que permaneceu até o sétimo dia, a partir de então, todas as concentrações da F127/AICIPc, em todas as três temperaturas avaliadas, apresentaram pH igual a seis, que permaneceu ao longo de todo o período de avaliação da estabilidade, indicando que nem o polímero utilizado, nem o alumínio-cloro-ftalocianina, alteraram esse parâmetro.

No trabalho realizado por Calvo e colaboradores (1992) foi observada a alteração do pH, que pode ser um indício de degradação do polímero e que em suspensões de nanocápsulas e de nanoesferas, após seis meses de armazenamento, ocorre a diminuição do pH destas formulações (CALVO *et al.*, 1992).

No presente estudo, os espectros de absorção e de emissão de fluorescência encontram-se na faixa do visível de 650-700 nm (EDWARDS & GOUTERMAN, 1970), característicos das ftalocianinas em etanol, no estado não agregado (RICO *et al.*, 2013). Tem sido relatado que, ao utilizar solventes com polaridade mais elevada,

observou-se o deslocamento das bandas de emissão deslocam-se no espectro de absorção (RAUF *et al.*, 2012), mas isto não ocorreu em nosso trabalho, mesmo sendo o fotossensibilizante alumínio-cloro-ftalocianina solubilizado em etanol, pois as concentrações do fotossensibilizante utilizadas foram baixas (POZO-INSFRAN *et al.*, 2004).

Segundo a técnica de decaimento do 1,3-difenil-isobenzofurano (DBF), ocorreu um decaimento da absorbância do DBF de forma mais acentuada para a formulação que contém a maior concentração de AICIPc incorporada nas micelas, quando comparada com as formulações que contêm as menores concentrações do fotossensibilizante, em relação ao tempo de exposição ao LED. Todas as concentrações de fotossensibilizante utilizadas apresentaram produção de ERO significativa tanto em relação ao início da exposição ao LED quanto em relação ao controle, as micelas sem AICIPc, que não apresentou decaimento de absorbância significativa (Figura 15).

A capacidade de geração de ERO pela alumínio-cloro-ftalocianina juntamente com o perfil de absorção e emissão mostram que as amostras da NP F127/AICIPc testadas apresentam propriedades fotofísicas ideais para seu uso como mediador da TFD no tratamento de células neoplásicas.

O Melanoma é um tipo de tumor que favorece a aplicação de TFD utilizando o fotossensibilizador alumínio-cloro-ftalocianina (AICIPc). O alumínio-cloro-ftalocianina é um fotossensibilizante hidrofóbico que atua principalmente na organela mitocôndria. Por ter atividade nesta organela, KESSEL & LUO (1998) demonstraram que o fotossensibilizante AICIPc é um rápido indutor de apoptose, contrastando assim, com outros fotossensibilizantes que agem nos lisossomos ou na membrana plasmática.

A toxicidade das formulações NP F127/AICIPc foi averiguada por meio do ensaio de MTT, para as linhagens celulares de melanoma murino e melanoma murino modificada com FireFly Luciferase. A determinação da toxicidade do LED na viabilidade celular mostrou que não houve diferença na viabilidade de ambos os tipos celulares, após 10 minutos de irradiação do LED, quando comparada com as células que não foram irradiadas. Estudos prévios que indicam que as matrizes das

nanopartículas (principalmente os poloxâmeros) são mais tóxicas para células normais do que para células tumorais como as células B16 F10 e B16F10FF (WEI *et al.* 2009).

As células B16F10 e B16F10FF expostas às micelas com diferentes concentrações de alumínio-cloro-ftalocianina (NP F127/AICIPc), ou às micelas sem o fotossensibilizante (NP F127) e ainda, apenas a alumínio-cloro-ftalocianina (AICIPc), por 15, 20 ou 25 minutos, sem qualquer irradiação da luz LED, mostrou que apenas 73% das células B16F10 permaneceram viáveis após 20 minutos de exposição. Verificou-se também que não houve alteração na viabilidade das células B16F10FF em nenhuma das exposições às formulações, por qualquer dos tempos estudados, quando comparado às células não expostas.

A TFD com micelas com concentração de 1 µg/mL de fotossensibilizante, independente do tempo de exposição, reduziu significativamente a viabilidade de B16F10 entre 47 e 65%, em relação ao controle, sendo mais eficaz no tempo de incubação de 15 minutos e com 5 µg/mL de AICIPc, independente do tempo de exposição, a micela também reduziu significativamente a viabilidade de B16F10 entre 62 e 69%, quando comparadas ao controle sem TFD. A viabilidade somente foi reduzida significativamente a 64%, quando as células foram expostas, por 25 minutos, a maior concentração de AICIPc em micelas, comparado ao controle e aos demais grupos.

Células B16F10FF tratadas com duas TFD e duas exposições a NP F127/AICIPc, apresentaram para as três diferentes concentrações de fotossensibilizante, independente do tempo de exposição, morte celular de 93,2 a 97,5% o que não foi observado com a aplicação de uma única terapia.

Contudo, as células de melanoma murino (B16F10) demonstraram ser mais sensíveis à TFD com micelas (NP F127/AICIPc) em todas as concentrações se comparada a célula B16F10FF, que apresentou uma pequena porcentagem de morte celular apenas para a NP F127 10 µg/mL, em todos os tempos de incubação aplicados.

A terapia fotodinâmica que utiliza altas concentrações de fotossensibilizantes e valores de fluência que permitem a viabilidade de 10% das células tumorais tratadas,

são consideradas como terapias de altas doses (PIETTE *et al.*, 2003). O resultado deste trabalho nos mostrou exatamente isso: a viabilidade das células B16F10 próximo de 15%, para as células B16F10FF com viabilidade de 7%, ambas tratadas com duas aplicações de TFD.

Contudo, vale ressaltar que o melanoma aqui tratado contém um alto conteúdo de melanina, sendo esse um fator que complica o tratamento com TFD, visto que, o sistema é fotoativado em um comprimento de onda dentro da faixa de absorção da melanina (LANGMACK *et al.*, 2001). Assim, a habilidade da luz em penetrar o tumor para ativar a NP F127/AICIPc pode ter sido parcialmente diminuída devido ao alto conteúdo de melanina presente das células B16F10 e B16F10FF. Além disso, a melanina possui um efeito antioxidante (DAVIDS e KLEEMAN, 2011) que atua como mais um mecanismo de resistência à TFD. Ciente deste fator complicador, foi importante ter realizado os experimentos nestes modelos de melanoma, considerando que a maioria dos melanomas são melanóticos, contendo diferentes graus e tipos de melanina e pigmentação (BECHET *et al.*, 2008; CAMERIN *et al.*, 2010; KANO *et al.*, 2013; MASTER *et al.*, 2012)

O fato das células B16F10FF terem um grande percentual de morte após uma segunda aplicação de TFD, contrapõe-se aos estudos de VARRIALE *et al.*, 2002, que relata a eficiência da TFD em uma única aplicação. Na maioria dos estudos descritos na literatura, não foi relatado dados correspondentes a duas terapias fotodinâmicas aplicadas em células modificadas com FireFly Luciferase.

Em trabalhos em que se utilizaram valores de fluência semelhantes com TFD mediada por outros FS foram observados resultados parecidos em células de melanoma B16F10 (CARVALHO, 2013; PIETTE *et al.*, 2003). Um estudo realizado por ZHAO e colaboradores (2009), onde foram utilizadas várias concentrações de silicone ftalocianina (Pc4) livre e encapsulada em partículas de sílica, que foram aplicadas e posteriormente irradiadas na fluência de $22,5 \text{ J/cm}^2$, mostrou uma viabilidade celular de aproximadamente 20%. Alguns trabalhos com fluências menores (MADURAY *et al.*, 2011) veicularam tetra-sulftalocianinas de alumínio para o tratamento de células de fibroblastos e melanoma. A fluência de $4,5 \text{ J/cm}^2$ mostrou viabilidade de 48% para as células de melanoma e 78% para os

fibroblastos. Para os resultados apresentados, foi possível observar que a toxicidade nas células tumorais foi um evento dependente tanto da concentração de FS utilizado quanto da dose de energia aplicada, o que está de acordo com a literatura (KOLAROVA *et al.*, 2007; KASTLE *et al.*, 2011).

Os resultados apresentados do RTCA indicam que quando foi aplicada a primeira TFD, ocorreu um decaimento do índice celular, seguido de uma recuperação das células. Quando foi aplicada a segunda terapia fotodinâmica, novamente, ocorreu um decaimento do índice. As células que não foram expostas à NP F127/ALCIPc, tiveram sua morte ocasionada por confluência, enquanto as células que receberam a TFD, tiveram uma recuperação seguida do decaimento do índice celular.

A metodologia desse ensaio utiliza a impedância, que é uma medida da total oposição ao fluxo de corrente elétrica em um circuito de corrente alternada, feita por dois componentes: resistência ôhmica e reactância. A Utilização da impedância para uma leitura celular foi descrita por GIAEVER & KEESE, em 1993. Contudo, mais dados precisam ser gerados com um grande conjunto de compostos para provar a boa correlação entre medidas celulares de impedância e parâmetros de toxicidade clássicos (ATIENZAR *et al.*, 2011).

O RTCA foi usado para reunir informações sobre diferentes processos celulares, incluindo a proliferação celular e a citotoxicidade da NP F127/ALCIPc (ABASSI *et al.*, 2009), como no trabalho de FRANKE *et al.*, 2010, que observou a análise realizada em tempo real (RTCA), em células de melanoma tratadas com N69 (fator indutor de apoptose), foi utilizado para indicar os efeitos da citosina-ferro contendo análogos N69 e avaliar o envolvimento da caspase na rota do processo de apoptose. Os resultados do RTCA revelaram uma diminuição dependente da dose de N69 e da densidade celular.

Nesse estudo observou-se que a NP F127 ALCIPc *in vitro* é capaz de causar morte celular nas células B16F10, enquanto as células B16F10FF, mostraram-se mais resistentes à TFD. Por isso, foi necessária a repetição da TFD com nova exposição às micelas de ALCIPc para que houvesse uma diminuição da viabilidade celular. Os efeitos da NP F127 ALCIPc nas células B16F10FF, com duas exposições

às micelas e duas aplicações de TFD, levaram ao aumento da citotoxicidade que foi de 7%.

Os estudos *in vitro* foram utilizados para guiar o estabelecimento de uma nova terapêutica antes da realização de estudos de toxicologia *in vivo* (MACDONALD & ROBERTSON, 2009) e proporcionaram informações relevantes sobre a potencial toxicidade das formulações empregadas.

6. CONCLUSÃO

- Os resultados da caracterização das amostras mostraram que: 1) nas maiores concentrações de AICIPc incorporada às micelas foi observado um aumento significativo no diâmetro hidrodinâmico (DH), quando comparado com as micelas sem o fotossensibilizante; 2) a temperatura de 25 °C foi a que melhor manteve os DH das formulações por pelo menos uma semana, no máximo duas semanas; 3) as amostras mantidas a ~25 e 37 °C mantiveram-se monodispersas, com variações de IPD não significativas por 28 a 35 dias de estocagem, ao longo de 42 dias de armazenamento, 4) o Potencial zeta das micelas sem o fotossensibilizante e com as diferentes concentrações de AICIPc manteve-se, em boa parte do tempo, com carga negativa.

- Portanto, os resultados indicaram que, a temperatura de ~25 °C escolhida para a execução dos ensaios *in vitro*, foi a que melhor manteve os parâmetros ao longo do tempo de avaliação. porém ajustes na formulação são necessários para que haja uma maior estabilidade do sistema.

- Quanto ao valor do potencial hidrogeniônico (pH) das micelas de Pluronic® F127, apesar de uma ligeira acidificação das formulações com maior concentração de fotossensibilizante, elas estavam dentro da neutralidade. Uma vez que a literatura descreve que nanopartículas com pH levemente ácidas, quase neutras, são ideais para o uso *in vivo*.

- A mínima concentração de polímero para que ocorra a formação de micelas (CMC) foi útil para os estudos *in vitro*. Porém, altera os parâmetros responsáveis por uma melhor estabilidade do sistema. Para possíveis estudos *in vivo*, a CMC ideal deve ser utilizada no preparo das formulações da NP F127/AICIPc, ou seja, uma maior quantidade de polímero F127 dará ao sistema de micelas um maior grau de gelificação e conseqüentemente, uma maior estabilidade e um possível uso por via tópica.

- A caracterização fotofísica por espectroscopia das micelas de Pluronic[®] mostrou picos de absorção e de emissão de luz na região do comprimento de onda do vermelho. Foi observado que o espectro de absorbância apresentou um pico de absorção a 670 nm para a formulação com fotossensibilizante. Também foi observado o espectro de emissão de fluorescência (excitação em 360 nm) da NP F127/AICIPc com um pico de fluorescência a 680 nm, diferentemente das micelas sem fotossensibilizante (NP F127) que não apresentam pico de emissão. Os resultados estão de acordo com a descrição da literatura para a alumínio-clorofalocianina.

- As micelas de Pluronic[®] F127 com diferentes concentrações de a-cloro-ftalocianina (NP F127/AICIPc) foram capazes de gerar espécies reativas de oxigênio (ERO) segundo a técnica de decaimento do 1,3-difenil-isobenzofurano (DBF). Todas as concentrações de fotossensibilizante apresentaram produção de ERO significativa ($p < 0,0001$) tanto em relação ao início da exposição ao LED quanto em relação ao controle ($p < 0,0001$).

- A determinação da toxicidade do LED na viabilidade celular mostrou que a TFD não foi capaz de induzir citotoxicidade e conduzir à morte tanto de células de melanoma (B16F10) quanto de melanoma modificado para expressar luciferase (B16F10FF).

- A determinação da toxicidade das micelas com 10 µg/mL de AICIPc, , mostrou que apenas 73% das células de melanoma murino (B16F10) permaneceram viáveis após 20 minutos de exposição.

- Em relação às células de melanoma murino modificada com FireFly Luciferase (B16F10FF), verificou-se que não houve alteração significativa na viabilidade destas células em nenhuma das exposições às formulações, por qualquer dos tempos estudados, quando comparado aos controles (células não expostas) e entre as formulações sem aplicação da TFD.

- As células B16F10, após a TFD mediada por micelas de Pluronic[®] F127 com Alumínio-Cloro-Ftalocianina (NP F127/AICIPc), apresentaram diminuição da viabilidade celular por dose dependente, com redução da viabilidade entre 27 e 46%, independente do tempo de exposição, quando comparado aos controles.

- As células B16F10FF, após a TFD mediada por micelas de Pluronic[®] F127 com Alumínio-Cloro-Ftalocianina (NP F127/AICIPc), demonstrou que a viabilidade somente foi reduzida a 64%, quando as células foram expostas, por 25 minutos, a maior concentração de AICIPc em micelas, comparado ao controle e aos demais grupos, diferentemente das células B16F10.

- Interessantemente, a NP F127/AICIPc com as três diferentes concentrações de fotossensibilizante, após duas aplicações da TFD, nas células B16F10FF, independente do tempo de exposição, causaram a morte de 93,2 a 97,5% das células, o que não foi observado com a aplicação de uma única TFD, para a mesma linhagem celular.

- Células modificadas com FireFly Luciferase (B16F10FF) apresentam um padrão que difere das células B16F10. Alguns estudos relacionados à biologia molecular dessa linhagem poderiam esclarecer certas questões como a possibilidade da TFD interferir ou não na expressão da bioluminescência, e/ou possíveis diferenças relacionadas ao processo de modificação para expressão de luciferase.

- Os resultados apontam que a TFD mostra-se mais eficiente em células de melanoma murino do que em células de melanoma modificadas. Esses resultados mostram uma maior sensibilidade das células tumorais B16F10, talvez por produzirem uma menor quantidade de melanina. Esse fator permanece obscuro e deve ser explorado a fim de orientar uma nova e melhor terapêutica.

- Uma variação interessante e potencialmente útil na liberação da luz é fracionar a dose total de luz em séries de duas ou mais exposições separadas, cada uma delas pontuada por intervalos de tempo definidos. O efeito potencial do fracionamento da dose total de luz é alcançar um maior efeito geral da TFD, mesmo sem aplicar uma quantidade maior de FS (BOLOGNIA *et al.*, 2015). Os dados de viabilidade celular da linhagem B16F10 em séries de duas exposições separadas de TFD, mostraram que essa metodologia proporciona uma aplicação de maior quantidade de exposição a luz, sem o aumento da quantidade do FS, embora também ocorra a relação dose x tempo de incubação das micelas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABASSI, Y. A.; XI, B.; ZHANG, W.; YE, P.; KIRSTEIN, S. L.; GAYLORD, M. R.; FEINSTEIN, S. C.; WANG, X.; XU, X. Kinetic Cell-Based Morphological Screening: Prediction of Mechanism of Compound Action and Off-Target Effects. *Chem. Biol.* 16, 712–723, 2009.
- AGGARWAL, B. B.; BANERJEE, S.; BHARADWAJ, U.; SUNG, B.; SHISHODIA, S.; G. Curcumin induces the degradation of cyclin E expression through ubiquitin-dependent pathway and up-regulates cyclin-dependent kinase inhibitors p21 and p27 in multiple human tumor cell lines. *Biochem Pharmacol.*, v. 73, pp. 1024–1032, 2007.
- ALEXANDRIDIS, P.; HOLZWARTH, J.; HATTON, T., *Macromolecules* 27, 2414, 1994.
- ALTAN-BONNET, G.; KRAMER, F. R. Nucleic acid hybridization: Robust sequence
- ANTON, N.; VANDAMME, T.F. The universality of low-energy nano-emulsification. *Int. J. Pharm.* v. 377, p. 142–147, 2009.
- ATIENZAR, F. A.; TILMANT, K.; GERETS, H. H.; TOUSSAINT, G.; SPEECKAERT, S.; HANON, E.; DEPELCHIN, O.; DHALLUIN, S. The Use of Real-Time Cell Analyzer Technology in Drug Discovery: Defining Optimal Cell Culture Conditions and Assay Reproducibility with Different Adherent Cellular Models. *Society for Laboratory Automation and Screening*, 2011.
- ATTWOOD, D.; COLLETT, J.H.; TAIT, C.J. The Micellar Properties of The Poly(oxyethylene) -poly(oxypropylene) Copolymer Pluronic F127 in Water and Electrolyte Eolution. *Internutionul Journal of Pharmaceutics*, 26 25-33, 1985.
- BADER, H.; RINGSDORF, H.; SCHMIDT, B. Water soluble polymers in medicine, *Angew. Makromol. Chem.* 123/124 (1984) 457–485.
- BARNHILL, R. L.; LEVY, M. A. Regressing thin cutaneous malignant melanomas (< or = 1.0 mm) are associated with angiogenesis. *Am J Pathol.* v. 143, n.1, pp. 99–104, 1993.
- BASAK, R.; BANDYOPADHYAY, R. Encapsulation of Hydrophobic Drugs in Pluronic F127 Micelles: Effects of Drug Hydrophobicity, Solution Temperature, and Ph. *Langmuir*, v. 29, p. 4350 4356, 2013.

- BATRAKOVA, E. V.; LI, S.; ELMQUIST, W. F.; MILLER, D. W.; ALAKHOV, V. Y.; KABANOV, A. V. Mechanism of sensitization of MDR cancer cells by Pluronic block copolymers: Selective energy depletion. *British Journal of Cancer.*, v. 85, n. 12, p. 1987–199, 2001.
- BATRAKOVA, E.; LI, S.; BRYNSKIKH, A. M.; SHARMA, A. K.; LI, Y.; BOSKA, M.; GONG, N.; MOSLEY, R. L.; ALAKHOV, V. Y.; GENDELMAN, H. E.; KABANOV, A. V. Effects of pluronic and doxorubicin on drug uptake, cellular metabolism, apoptosis and tumor inhibition in animal models of MDR cancers. *Journal of Controlled Release.*, v. 143, n. 3. pp. 290–301, 2010.
- BATRAKOVA, E. V.; KABANOV, A. V. Review Pluronic block copolymers: Evolution of drug delivery concept from inert nanocarriers to biological response modifiers. / *Journal of Controlled Release.*, v. 130, pp. 98–106, 2008.
- BECHET, D.; COULEAUD, P.; FROCHOT, C.; VIRIOT, M.L.; GUILLEMIN, F.; BARBERI-HEYOB, M. Nanoparticles as vehicles for delivery of photodynamic therapy agents. *Trends Biotechnol.* v. 26, n.11, pp. 612-621, 2008.
- BRAKMANE, G.; WINSLET, M.; SEIFALIAN, A. M. Systematic review: the applications of nanotechnology in gastroenterology. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, v. 36, n. 3, p. 213–221, 2012.
- BOHORQUEZ, M.; KOCH, C.; TRYGSTAD, T.; PANDIT, N. A Study of the Temperature-Dependent Micellization of Pluronic F127. *Journal of Colloid and Interface Science*, v, 216, pp. 34–40, 1999.
- BOLOGNIA, J; JOSEPH L.; JORIZZO, JULIE V. SCHAFFER. *Dermatologia Medical*, pp.135, 2015.
- BONETT, R. M.; HOOPFER, E. D.; DENVER, R. J. Molecular mechanisms of corticosteroid synergy with thyroid hormone during tadpole metamorphosis. *General and Comparative Endocrinology*, v. 168, In. 2, pp. 209–219, 2010.
- BOISSY, R. E. The melanocyte. Its structure, function, and subpopulations in skin, eyes, and hair. *Dermatologic Clinics.*,v. 6(2), p. 161-173, 1988.
- CALVO, P.; REMUNAN-LOPEZ, C.; VILA-JATO, J. L.; ALONSO, M. J.; *Colloid Polym. Sci.*, v. 275, n. 46, 1997.
- CALVO, P.; VILA-JATO, J. L.; ALONSO, M. J.; *J. Pharm. Sci.*, v. 85, pp. 530, 1996.
- CALZAVARA-PINTON, P.; VENTURINI, M.; SALA, R. Photodynamic therapy: update 2006 Part 2: Clinical results. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology.*, 2007.

CANCER RESEARCH UK MANCHESTER INSTITUTE.
www.cruk.manchester.ac.uk/.

CARINA SILVA DE PAULA. Desenvolvimento e Caracterização Fotofísica de Nanoestruturas Contendo AICIPc para a Terapia Fotodinâmica, 2014.

CHEN, W.; PENG, J.; SU, Y.; ZHENG, L.; WANG, L.; JIANG, Z. Separation of oil/water emulsion using Pluronic F127 modified polyethersulfone ultrafiltration membranes *Separation and Purification Technology*, v. 66, n. 3, 7, pp. 591–597, 2009.

CHEN, W.; PENG, J.; SU, Y.; ZHENG, L.; WANG, L.; JIANG, Z. Separation of oil/water emulsion using Pluronic F127 modified polyethersulfone ultrafiltration membranes *Separation and Purification Technology*, v. 66, n. 3, 7, pp. 591–597, 2009.

CHIN, L.; MERLINO, G.; DEPINHO, R. A. Malignant melanoma: modern black plague and genetic black box. *GENES & DEVELOPMENT*, v. 12, pp. 3467–3481, 1998.

CHU, B.; ZHOU, Z. *Surf. Sci. Ser.* 60, 67, 1996.

CILIA, R.; KO, J. H.; CHO, S. S.; VAN EIMEREN, T.; MAROTTA, G.; PELLECCIA, G.; PEZZOLI, G.; ANTONINI, A.; STRAFELLA, A. P. Reduced dopamine transporter density in the ventral striatum of patients with Parkinson's disease and pathological gambling. *Neurobiology of Disease*, v. 39, p. 98–104, 2010.

CHUDNOVSKY, Y.; KHAVARI, P. A.; ADAMS, A. E. Melanoma genetics and the development of rational therapeutics. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 115, n. 4, 2005.

COGHLIN, C.; MURRAY, G. I. Review Current and emerging concepts in tumour metastasis. *The Journal of Pathology*, v. 222, n. 1, p. 1–15, 2010.

CUENCA, C. M. R. *Trabalho de Conclusão de Curso em Química como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Química. Micelas Poliméricas Termorreversíveis como Sistemas para Liberação Modificada de Fármacos por via Tópica.* Centro de Ciências Naturais e Humanas- UFABC, 2013.

CZERSKA, M.; MIKOLAJEWSKA, K.; ZIELINSKI, M.; GROMADZINSKA, J.; WASOWICZ, W. Współczesne markery stresu oksydacyjnego. *Med Pr*, v. 66, n. 3, pp. 393–405, 2015.

- DAVIDS, L. M.; KLEEMANN, B. Combating melanoma: The use of photodynamic therapy as a novel, adjuvant therapeutic tool. *Cancer Treat. Rev.* v. 37, pp. 465–475, 2011.
- DETTY, M. R.; GIBSON, S. L.; WAGNER, S. J. Current clinical and preclinical photosensitizers for use in photodynamic therapy. *J Med Chem.*, v. 29, n.47(16), p. 3897-915, 2004.
- DEUTSCH, G. B.; KIRCHOFF, D. D.; FARIES, M. B. Metastasectomy for Stage IV Melanoma. *Surgical Oncology Clinics of North America.*, v. 24, n. 2, p. 279–298, 2015.
- DING, H.; YU, H.; DONG, Y.; TIAN, R.; HUANG, G.; BOOTHMAN, D. A.; GAO, J. Photoactivation switch from type II to type I reactions by electron-rich micelles for improved photodynamic therapy of cancer cells under hypoxia. *Journal of Controlled Release*, 156(3), p. 276–280, 2011.
- DONATI, P.; PAOLINO, G.; DONATI, M.; PANETTA, C. Cutaneous mastocytosis combined with eruptive melanocytic nevi and melanoma. Coincidence or a linkage in the pathogenesis? *J Dermatol Case Rep*, v. 3, pp. 70-74, 2014.
- DURMUS, M.; AHSEN, V. Water-soluble cationic gallium(III) and indium(III) phthalocyanines for photodynamic therapy. *Journal of Inorganic Biochemistry.*, v. 104, p. 297–309, 2010.
- EDWARDS, L.; GOUTERMAN, M. Porphyrins XV. Vapor absorption spectra and stability: phthalocyanines. *J. Mol. Spectr.* 33, 293-310, 1970.
- ELDER, D. E. "Metastatic melanoma." *Pigment cell*, v. 8, pp. 182-204, 1987.
- ESCOBAR-CHÁVEZ, J. J.; M. LÓPEZ-CERVANTES, A.; NAÏK, Y. N.; QUINTANAR-GUERRER, K. D.; GANEM-QUINTANAR, A. *Pharm Pharmaceut Sci*; v. 3, pp. 339-358, 2006.
- FALEIROS, R. R.; LEISE, B. B.; WESTERMAN, T.; YIN, C.; NUOVO, G. J.; BELKNAP, J. K. In vivo and in vitro evidence of the involvement of CXCL1, a keratinocyte-derived chemokine, in equine laminitis. *Journal of Veterinary Internal Medicine / American College of Veterinary Internal Medicine.*, v. 23(5), pp. 1086–96, 2009.
- FAROKHZAD, O.; Langer, R. Impact of nanotechnology on drug delivery. *Acs Nano*, v. 3, n. 1, pp. 16–20, 2009.
- FAYTER, D.; CORBETT, M.; HEIRS, M.; FOX, D.; EASTWOOD, A. A systematic review of photodynamic therapy in the treatment of pre-cancerous skin

conditions, Barrett's oesophagus and cancers of the biliary tract, brain, head and neck, lung, oesophagus and skin. NIHR Journals Library, 2003.

FARRELL, T. S. C. Reflective Language Teaching: From Research to Practice, 2015.

FENG, S. S.; ZHAO, L.; ZHANG Z *et al.* "Chemotherapeutic engineering: vitamin E TPGS-emulsified nanoparticles of biodegradable polymers realized sustainable paclitaxel chemotherapy for 168 h in vivo," *Chemical Engineering Science.*, v. 62, n. 23, pp. 6641–6648, 2007.

FERRARI, M.; ROCHA-FILHO, P. A. Multiple emulsions containing amazon oil: açai oil (*Euterpe oleracea*). *Braz. J. Pharmacog.* v. 21, 2011.

FESSI, H.; PUISIEUX, F.; DEVISSAGUET, J-PH.; AMMOURY, N.; BENITA, S.; Int. J. Pharm. 1989, 55, r1.

FIDLER, I. J.; BUCANA, C. Lymphocytes Mechanism of Tumor Cell Resistance to Lysis by Syngeneic. *Cancer Res*; v. 37, pp. 3945-3956, 1977.

FIGUEIREDO, L. C.; CORDEIRO, L. N.; ARRUDA, A. P.; DENISE, M.; CARVALHO, F.; MARQUES, E.; COUTINHO, M. Câncer de pele: estudo dos principais marcadores moleculares do melanoma cutâneo Skin cancer: main molecular markers of cutaneous melanoma. *Revisão de Literatura Câncer de Pele*, 49(3), p. 179–183, 2003.

FINSEN, N. R. The red-light treatment of small-pox. is the treatment of small-pox patients in broad daylight warrantable. *The British Medical Journal*, 1903.

FITZPATRICK. Tratado de Dermatologia. 7. Ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2011.

FONSECA, C.; SIMOES, S.; GASPAR, R. Paclitaxel-loaded PLGA nanoparticles: preparation, physicochemical characterization and in vitro anti-tumoral activity. *J Control Release.*, v. 83, n. 2, pp. 273-286, 2002.

FOSTER, B.; COSGROVE, T.; ESPIDEL, Y. PFGSE-NMR study of pH-triggered behavior in Pluronic-Ibuprofen solutions. *Langmuir*, v. 25, n. 12, pp. 6760, 2009.

FRANKE, J. C.; PLOTZ, M. A.; PROKOP, GEILEN, C. C.; SCHMALZ, H-G.; EBERLE, J. New caspase-independent but ROS-dependent apoptosis pathways are targeted in melanoma cells by an iron-containing cytosine analogue. *Biochemical Pharmacology*, v. 79, pp. 575–586, 2010.

FRYD, M. M.; MASON, T. G. Advanced Nanoemulsions. *Annu. Rev. Phys. Chem.* v.

63, p. 493–518, 2012.

- GARBE, C.; EIGENTLER, T. H.; KEILHOLZ, U.; HAUSCHILD, A.; KIRKWOOD, J. M. Systematic Review of Medical Treatment in Melanoma: Current Status and future Prospects. *Oncologist*, v. 16, n. 1, pp. 5-24, 2011.
- GARCIA-FUENTES, M.; ALONSO, M. J. Chitosan-based drug nanocarriers: Where do we stand? *Journal of Controlled Release.*, v. (2), pp 496–504, 2012.
- GEMMA, N.; JIAYI, P.; TORCHILIN, V. P. Micelle-like Nanoparticles as Carriers for DNA and siRNA. *Mol. Pharmaceutics*, v. 12, pp. 301–313, 2015.
- GIL, E. S.; HUDSON, S. M. Stimuli-responsive polymers and their bioconjugates. *Progress in Polymer Science* v. 29, n. 12, pp. 1173–1222, 2004.
- GILISSEN, M. J.; VAN DE MERBEL-DE WIT, L. E.; STAR, W. M.; KOSTER, J. F.; SLUITER, W. Effect of photodynamic therapy on the endothelium-dependent relaxation of isolated rat aortas. *Cancer Res.* 53, 2548–52, 1993.
- GON, A. S.; MINELLI, L.; GUEMBAROVSKI, A. L. Melanoma cutâneo primário em Londrina. *An Bras Dermatol*; v. 76, n. 4, pp. 413-26, 2001.
- GONZÁLEZ, N.; PRIN, J. L.; BENÍTEZ, J. L.; RAMÍREZ, A.; GARCÍA, A.; RAMÍREZ, M.; SABINO, M. A.; GÁSCUE, B. R. D. Estudio de la cinética de difusión en hidrogeles sintetizados a partir de acrilamida-co-ácido acrílico con turba y almidón vía calentamiento convencional y bajo radiación microondas. *Rev. LatinAm. Metal. Mat.*, v. 32, n. 1, pp. 136-144, 2012.
- GOYDOS, J. S.; MANN, B.; KI, H. J.; GABRIEL, E. M.; ALSINA, J.; GERMINO, F. J.; SHIH, W.; GORSKI, D. H. Detection of B-BRAF and N-RAS mutations in human melanoma. *J. AM Coll Surg* ., v. 200, n. 3, p. 362-370, 2005.
- GMEINER, W. H.; GHOSH, S. Nanotechnology for cancer treatment. *Nanotechnology Reviews.*, v. 3, n. 2, p. 111–122, 2014.
- GROVER, G. J.; DZWONCZYK, S.; PARHAM, C. S.; The endothelin-1 receptor antagonist BQ-123 reduces infarct size in a canine model of coronary occlusion and reperfusion. *Cardiovascular Research*, v. 27, pp.1613-1618, 1993.
- GUPTA, P. B.; KUPERWASSER, C.; BRUNET, J. P. The melanocyte differentiation program predisposes to metastasis after neoplastic transformation. Examines the melanocyte as the source of aggressiveness of melanoma. *Nat Genet*, v. 37 n. 10, pp. 1047–1054, 2005.

- HAASS, N. K.; HERLYN, M. Normal Human Melanocyte Homeostasis as Paradigm for Understanding Melanoma. *J. Investig Dermatol Symp Proc*, v. 10, n. 2, pp. 153-163, 2005.
- HOFFMAN, A. S.; STAYTON, P. S.; VOLGA, B.; CHEN, G.; CHEN, J.; CHEUNG, C.; CHILKOTI, A.; DING, L.; DONG, R.; FONG, C. A.; LACKEY, C. J.; LONG, M.; MIURA, J. E.; MORRIS, N.; MURTHY, Y.; NABESHIMA, T. G.; PARK, O. W.; PRESS, T.; SHIMOBOJI, S.; SHOEMAKER, H. J.; YANG, N.; MONJI, R. C.; NOWINSKI, C. A.; COLE, J. H.; PRIEST, J. M.; HARRIS, K.; NAKAMAE, T.; NISHINO, T.; MIYATA, T. Really smart bioconjugates of smart polymers and receptor proteins, *J. Biomed. Mater. Res*, v. 52, pp. 577–586, 2000.
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Review The Hallmarks of Cancer. *Cell*; v. 100, n. 1, 7 p. 57–70, 2000.
- HOLLAND, R.; PARKER, E.; GUINEY, K.; ZELD, F.; *J. Phys. Chem.*, v. 99, pp. 11981, 1995.
- HOU, J. L. B. A.; REED, K. B.; KNUDSON, R. M.; MIRZOYEV, S. A.; LOHSE, C. M.; FROHM, M. L.; BREWER, J. D.; OTLEY, C. C.; ROENIGK, R. K. *Dermatologic Surgery*, v. 41, n. 2 – p. 211–218, 2015.
- HSU, M-Y.; MEIER, F.; HERLYN, M. Melanoma development and progression: a conspiracy between tumor and host. *Differentiation*, v. 70, n. 9-10, pp. 522–536, 2002.
- HU, C. M.; ZHANG, L. Nanoparticle-based combination therapy toward overcoming drug resistance in cancer. *Biochem Pharmacol*. v. 83, n.8, pp. 1104-1111, 2012.
- INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER José Alencar Gomes da Silva (INCA). Estimativa 2014 incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro (2016).
- ISO TC 229 (INTERNATIONAL, 2005),
- JEMAL, A.; BRAY, F.; CENTER, M M.; FERLAY, J.; WARD, E.; FORMAN, D. Global Cancer statistics. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*., v. 61, n. 2, p. 69–90, 2011.
- JHAVERI, A. M.; TORCHILIN, V. P. Multifunctional polymeric micelles for delivery of drugs and siRNA. *Frontiers in Pharmacology | Pharmacology of Anti-Cancer Drugs*, v. 5, n. 77, pp. 1-26, 2014.
- JIN, Y.; ZHANG, X.; ZHANG, B.; KANG, H.; DU, L.; LI, M. Nanostructures of an amphiphilic zinc phthalocyanine polymer conjugate for photodynamic therapy of psoriasis. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. , 128, p. 405–409, 2015.

- JONES, C.; COOPER, M.; MANG, T. S.; WILSON, B. D.; STOLL, H. L.; *J. Am. Acad. Dermatol.*, v. 27, pp. 979, 1992.
- JONES, M. C.; LEROUX, J.-C. Polymeric micelles - a new generation of colloidal drug carriers. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, v. 48, pp. 101-111, 1999.
- JORIS, F.; MANSCHAN, B. B.; PEYNSHAERT KAREN.; DE SMEDT, S. C.; BRAECKMANSAD, K.; SOENENA, S. J. Assessing nanoparticle toxicity in cell-based assays: influence of cell culture parameters and optimized models for bridging the in vitro–in vivo gap. *Chem. Soc. Rev.*, v. 42, n.8339, 2013.
- KANG, I-C.; KIM, D-S.; JANG, Y.; CHUNG, K-H. Suppressive Mechanism of Salmosin, a Novel Disintegrin in B16 Melanoma Cell Metastasis. *Biochemical and Biophysical Research Communications.*, v. 275, n. 1, p. 169–173, 2000.
- KANO, A.; TANIWAKI, Y.; NAKAMURA, I.; SHIMADA, N.; MORIYAMA, K. Tumor delivery of Photofrin[®] by PLL-g-PEG for photodynamic therapy. *J. C ontrol. Release.* v. 167, p. 315-21, 2013.
- KÄSTLE, M.; GRIMM, S.; NAGEL, R.; BREUSING, N.; GRUNE, T. Combination of PDT and inhibitor treatment affects melanoma cells and spares keratinocytes. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 50, n. 2, pp. 305–312, 2011.
- KESSEL, D.; LUO, Y. Mitochondrial photodamage and PDT-induced apoptosis. *J.Photochem. Photobiol. B: Biol.* v. 42, p. 89-95, 1998.
- KOLAROVA, H.; LENOBEL, R.; KOLAR, P.; STRNAD, M. Sensitivity of different cell lines to phototoxic effect of disulfonated chloroaluminium phthalocyanine. *Toxicology in Vitro: An International Journal Published in Association with BIBRA*, v. 21, n. 7, pp.1304–1306, 2007a.
- KOLAROVA, H.; NEVRELOVA, P.; BAJGAR, R.; JIROVA, D.; KEJLOVA, K.; STRNAD, M. In vitro photodynamic therapy on melanoma cell lines with phthalocyanine. *Toxicology in Vitro.*, v. 21, 2, pp. 249–253, 2007b.
- LANGMACK, K.; MEHTA, R.; TWYMAN, P.; NORRIS, P. Topical photodynamic therapy at low fluence rates--theory and practice. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* v. 60, p. 37-43 2001.
- LEGRAND, P.; BARRATT, G.; MOSQUEIRA, V.; FESSI, H.; DEVISSAGUET, J-Ph.; S.T.P. Pharma Sci., v. 9, n. 411, 1999.
- LEVY, A. P.; LEVY, N. S.; GOLDBERG, M. A. Post-transcriptional Regulation of Vascular Endothelial Growth Factor by Hypoxia. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 271, pp. 2746-2753, 1996.

- LI, G.; SATYMOORTHY, K.; HERLYN, M. N-Cadherin-mediated Intercellular Interactions Promote Survival and Migration of Melanoma Cells. *CANCER RESEARCH*, v. 61, PP. 3819–3825, 2001.
- LIM, J.; HIPALGAONKAR, K.; ANDREWS, S. C.; MAJUMDAR, A.; YANG, P. Quantifying Surface Roughness Effects on Phonon Transport in Silicon Nanowires. *Nano Lett.*, v. 12, n. 5, p. 2475–2482, 2012.
- LIU, X. Partitioning of amphiphilic and charged molecules on polymeric surfaces by physisorption. A dissertation submitted to the Graduate Faculty of North Carolina State University, 2011.
- LONGO, J. P. F.; LOZZI, S. P.; SIMIONI, A. R.; MORAIS, P. C.; TEDESCO, A. C., AZEVEDO, R. B. Photodynamic Therapy with aluminum-chloro-phthalocyanine induces necrosis and vascular damage in mice tongue tumors. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v. 94, pp. 143–146, 2009.
- MCCAUGHAN, JR.; J. S.; GUY, J. T.; HICKS, W.; LAUFMAN, L.; NIMS, T. A.; WALKER, J.; *Arch. Surgery*, v. 124, pp. 211, 1989.
- MACDONALD, I. J.; DOUGHERTY, T. J. Basic principles of photodynamic therapy. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines.*, 5, p. 105–129, 2011.
- MACHADO, A. E. H. terapia fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e perspectivas. *QUÍMICA NOVA*, v. 23, n. 2, 2000.
- MADURAY, K.; KARSTEN, A.; ODHAV, B.; NYOKONG, T. In vitro toxicity testing of zinc tetrasulfophthalocyanines in fibroblast and keratinocyte cells for the treatment of melanoma cancer by photodynamic therapy. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, v.103, n. 2, p. 98–104, 2011.
- MANDAL, B. B.; KUNDU, S. C. Self-assembled silk sericin/poloxamer nanoparticles as nanocarriers of hydrophobic and hydrophilic drugs for targeted delivery. *Nanotechnology.*, v. 20, n. (35), pp. 355101, 2009.
- MCMAHON, K. S.; WIEMAN, T. J.; MOORE, P. H.; FINGAR, V. H. Effects of photodynamic therapy using mono-l-aspartyl chlorin e6 on vessel constriction, vessel leakage and tumor response. *Cancer Res.* 54, 5374–5379, 1994.
- MAFTOUM-COSTA, M.; NAVES, K.; OLIVEIRA, A.; TEDESCO, A.; DASILVA, N.,; PACHECO-SOARES, C. Mitochondria, endoplasmic reticulum and actin filament behavior after PDT with chloroaluminum phthalocyanine liposomal in HeLa cells. *Cell Biology International.*, 32(8), p. 1024–1028, 2008.

- MAGDER, S. Reactive oxygen species: toxic molecules or spark life? *Critical Care*, v.10, n.1, 2006, p. 1-8, 2006.
- MAGENHEIM, B.; BENITA, S.; S.T.P. *Pharma Sci.*, v. 1, n. 221, 1991.
- MAJUMDAR, A. Bioassays based on molecular nanomechanics. *Disease Markers.*, 18(4), p. 167–174, 2002.
- MANDAL, B. B.; KUNDU, S. C. (2009). Self-assembled silk sericin/poloxamer nanoparticles as nanocarriers of hydrophobic and hydrophilic drugs for targeted delivery. *Nanotechnology*. 20 (35): 355101.
- MARITIM, A. C.; SANDERS, R. A.; WATKINS, J. B. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. *J Biochem Mol Toxicol.*, v.17, n. 1, pp 24-38, 2003.
- MASTER, A. M.; QI, Y.; OLEINICK, N. L.; GUPTA A.S. EGFR-mediated intracellular delivery of Pc 4 nanoformulation for targeted photodynamic therapy of cancer: in vitro studies. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. v. 8, p. 655-64, 2012.
- MARTINS, J.; ALMEIDA, L.; LARANJINH, J. Simultaneous Production of Superoxide Radical and Singlet Oxygen by Sulphonated Chloroaluminum Phthalocyanine Incorporated in Human Low-density Lipoproteins: Implications for Photodynamic Therapy. *Photochemistry and Photobiology.*, v. 80, n. 2, p. 267–273, 2004.
- MEYER-BETZ, F. Research on the biological (photodynamic) action of hematoporphyrin and other derivatives of blood and bile pigments. *Deutsches Archiv. fur Klinische. Medizin.*, v. 112, p. 476-503, 1913.
- MACDONALD, J. S.; ROBERTSON, R. T. Toxicity Testing in the 21st Century: A View from the Pharmaceutical Industry. *Toxicol. Sci.*, v. 110, pp. 40–46, 2009.
- MOGHIMI, S. M.; HUNTER, A. C. (Poloxamers and poloxamines in nanoparticle engineering and experimental medicine. *Trends Biotechnol.*, v.18, n. 10, pp. 412-420, 2000.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.*, v. 65, pp. 55–63, 1983.
- MODY, V.; SIWALE, R.; SINGH, A.; Mody, H. Introduction to metallic nanoparticles. *J Pharm Bioallied Sci.*, v. 2(4), pp. 282–289, 2010.

- MONGE-FUENTES, V. TESE DE DOUTORADO. Terapia fotodinâmica mediada por nanoemulsão à base de óleo de açaí (*Euterpe oleraceae Martius*) para o tratamento de melanoma *in vitro* e *in vivo*, 2014.
- MOSQUEIRA, V. C. F.; LEGRAND, P.; PINTO-ALPHANDARY, H.; PUISIEUX, F.; BARRATT, G.; *J. Pharm. Sci.*, v. 89, n. 614, 2000.
- MUELLER, D. W.; BOSSERHOFF, A.K. "Role of miRNAs in the progression of malignant melanoma". *Br J Cancer*, v. 101, n. 4, 2009.
- NATIONAL CANCER INSTITUTE. New analysis of breast cancer subtypes could lead to better risk stratification; Annual Report to the Nation shows that mortality and incidence for most cancers continue to decline. *NCI Press Release*, 2015.
- NUNES, X. P. Biological Oxidations and Antioxidant Activity of Natural Products. *Phytochemicals as Nutraceuticals - Global Approaches to Their Role in Nutrition and Health*, 1–21, 2012.
- NURIMAR, C. F.; CALMON, R.; MACEIRA, J. P.; CUZZI, T.; CESAR, S. SILVA, C. Melanoma cutâneo: estudo prospectivo de 65 casos. *An. Bras. Dermatol.*, v.80, n.1, 2005.
- O'CONNOR, A. B.; DWORKIN, R. H. Treatment of Neuropathic Pain: An Overview of Recent Guidelines. *The American Journal of Medicine*, v. 122, n.10, S22–S32, 2009.
- OCHEKPE, N. A.; OLORUNFEMI, P.O.; NGWULUKA, N. C. Nanotechnology and Drug Delivery Part 1: Background and Applications. *Trop J Pharm Res*, v. 8, n. 3, pp. 265-274, 2009.
- Organização Mundial de Saúde (OMS). www.who.int.
- PEER, D.; KARP J. M.; HONG, S.; FAROKHZAD, O. C.; MARGALIT, R.; LANGER, R. Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. *Nature Nanotechnology*, v. 2, pp. 751 – 760, 2007.
- PIETTE, J.; VOLANTI, C.; VANTIEGHEM, A.; MATROULE, J-Y.; HEBRAKEN, Y.; AGOSTINIS, P. Cell death and growth arrest in response to photodynamic therapy with membrane-bound photosensitizers. *Apoptosis - from Signalling Pathways to Therapeutic Tools Biochemical Pharmacology*, v. 66, n. 8, pp. 1651–1659, 2003.
- PLAETZER, K.; KIESSLICH, T.; VERWANGER, T. KRAMMER, B. The Modes of Cell Death Induced by PDT: An Overview. *Medical Laser Application*, v. 18, 1, pp. 7–19, 2003.

- PORTILHO, F. A.; CAVALCANTI, C. E. D. O.; MIRANDA-VILELA, A. L.; ESTEVANATO, L. L. C.; LONGO, J. P. F.; ALMEIDA SANTOS, M. D. F. M.; LACAVALA, Z. G. M. Antitumor activity of photodynamic therapy performed with nanospheres containing zinc-phthalocyanine. *Journal of Nanobiotechnology*, 11, 41, 2013.
- PRASSAD, K.; LUONG, T.; FLORENCE, A.; PARIS, J.; VAUTION, C.; SEILLER, M.; AND PUISIEUX, F.; *J. Colloid Interface Sci.* **69**, 225 (1979).
- PREMI, S. *et al.* Chemiexcitation of melanin derivatives induces DNA photoproducts long after UV exposure. *Science*. v. 347, n. 6224, p. 842-47. 2015.
- POZO-INSFRAN, D.; BRENES, C.H.; TALCOTT, S. T. Phytochemical Composition and Pigment Stability of Açai (*Euterpe oleracea* Mart.). *J. Agric. Food Chem.* v. 52, 1539-1545, 2004.
- PULIDO, J. Z. Melanoma Maligno. *Rev. Bras. Oncologia Clínica.*, v. 4, n. 11, p. 25-29, 2007.
- RASSING, J.; MACKENNA, W.; BANDOPADHYAY, S.; EYRING, E. Ultrasonic and ¹³C-nmr studies on gel formation in aqueous solutions of the ABA block polymer Pluronic-127, *J. Mol. Liquid.*, 27, 165-178, 1984.
- RASSING, J.; ATWOOD, D. Ultrasonic velocity and light scattering studies on polyoxyethylene-polyoxypropylene copolymer Pluronic F-127 in aqueous solution, *Int. J. Pharm.*, 13, 47-55, 1983.
- RAUF, M. A.; HISAINDEE, S.; GRAHAM, J.P.; NAWAZ, M. Solvent effects on the absorption and fluorescence spectra of Cu (II) - phthalocyanine and DFT calculations. *J Mol Liq* 168: 102-109, 2012.
- RICO, C. I.; RODRÍGUEZ, J.; CONDE, C. A.; MANTILLA, J. C.; ESCOBAR, P. *Skin permeation and biodistribution of chloroaluminum phthalocyanine (ClAlPc) nanoemulsion applied topically in Wistar rats.* *Rev. Argent. Dermatol.*, v. 94, n. 2, 2013.
- ROBERTSON, C. A. THE EFFICACY OF PHOTODYNAMIC THERAPY ON HUMAN MALIGNANT MELANOMA CELLS, 2010.
- RONSEIN, G. E.; MIYAMOTO, S.; BECHARA, E.; DI MASCIO, P.; MARTINEZ, G. R. Oxidação de proteínas por oxigênio singleto: Mecanismos de dano, estratégias para detecção e implicações biológicas. *Química Nova*, 29(3), p. 563-568, 2006.
- SANTA, C.F.; OSORIO, B. I. L. Materiales poliméricos en nanomedicina: transporte y liberación controlada de fármacos. *Rev. Acad. Colomb. Cienc.* v. 37, n. 142, pp. 115-124, 2013.

- SIBAUD, V.; RESSEGUIER, S.; RADUT, R.; ATTAL, J.; MEYER, N.; DELORD, J. P. Correction to "Nanovectorization of TRAIL with Single Wall Carbon Nanotubes Enhances Tumor Cell Killing". Acute skin reaction suggestive of pembrolizumab-induced radiosensitization. *Melanoma Res*, 2015.
- SILVEIRA-LACERDA, E. P.; VILA-NOVA, C. A. S. T.; PEREIRA, F. C.; HAMAGUCHI, A.; PAVANIN, L. A.; GOULART, L. R.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; SOARES, A. M.; SANTOS, W. B.; NORMIZO, A. The ruthenium complex cis (chloro) tetraammineruthenium (III) chloride immune stimulatory activity on human peripheral blood mononuclear cells. *Biol Trace Elme Res.*, 2009.
- SCHAFFAZICK, S. R. ; GUTERRES, S. S.; FREITAS, L. DE L; POHLMANN, A. R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. *Quim. Nova*, v. 26, n. 5, pp. 737, 2003.
- SCHERLUND, M.; BRODIN, A.; MALMSTEN, M. Micellization and gelation in block copolymer systems containing local anesthetics. *Int. J.Pharm*, v. 37, 2000.
- SCHMOLKA, R. Physical basis for poloxamer interactions, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 720, pp. -97, 1994.
- SCHMERLING, R. A.; BUZAID, A. C. encontro anual da american society of clinical oncology (asco) Onco &, 2013.
- SCHWEITZER, V. G.; VISSCHER, D.; *Otolaryngol. Head Neck Surg.*, v. 102, pp. 639, 1990.
- SHAPIRO, D. M.; FUGMANN, R. A. A Role for Chemotherapy as an Adjunct to Surgery: *The Journal of Cancer Research*, pp. 1098-1101, 1957.
- SOCIEDADE BRASILEIRA DE DERMATOLOGIA. www.sbd.org.br
- SOLÈ, I.; SOLANS, C.; MAESTRO, A.; GONZALEZ, C.; GUTIERREZ, J. M. Study of nano-emulsion formation by dilution of microemulsions. *J. Colloid Interface Sci.* v.376, p. 133–139, 2012.
- SULAIMON, S. S.; KITCHELL, B. E. Review article the biology of melanocytes. *Veterinary Dermatology*, v. 14, 2, pp. 57–65, 2003a.
- SULAIMON, S. S.; KITCHELL, B. E. The basic biology of malignant melanoma: molecular mechanisms of disease progression and comparative aspects.

Journal of Veterinary Internal Medicine / American College of Veterinary Internal Medicine, v. 17, pp.760–772, 2003b.

- SPILLER, W.; KLIESCH, H.; WOHRELE, D.; HACKBARTH, S.; RODER, B.; SCHNURPFEIL, G. Singlet oxygen quantum yields of different photosensitizers in polar solvents and micellar solutions. *Journal of Porphyrin Phthalocyanines*, 2(2), pp.145-158, 1998.
- SWAMI, A.; SHI, J.; GADDE, S.; VOTRUBA, A.; KOLISHETTI, N.; FAROKHZAD, O. Nanoparticles for Targeted and Temporally Controlled Drug Delivery. In: Svenson S, Prud'homme RK, eds. *Multifunctional Nanoparticles for Drug Delivery Applications: Springer US*: 9-29, 2012.
- TAILLEFER, J.; BRASSEUR, N.; VAN LIER, J. E.; LENAERTS, V.; LE GARREC D.; LEROUX, J.C. In-vitro and in-vivo evaluation of pH-responsive polymeric micelles in a photodynamic cancer therapy model. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 53, pp.155±166, 2001.
- TAILLEFER, J.; JONES, M. C.; BRASSEUR, N.; VAN LIER, J. E.; LEROUX, J. C. Preparation and characterization of pH-responsive polymeric micelles for the delivery of photosensitizing anticancer drugs. *J. Pharm. Sci.*, v. 89, pp. 52-62, 2000.
- TANDON, V.; Bhagavatula, S. K.; Nelson, W. C.; Kirby, B. J.; *Electrophoresis*, v. 29, n. 109, 2008.
- TORCHILIN, V.P. Structure and design of polymeric surfactant-based drug delivery systems. *J Control Release.*, v. 73, n. (2-3), pp. 137-172, 2001.
- TSAO, H.; CHIN, L.; GARRAWAY, L. A.; FISCHER, D. E. Melanoma: from mutations to medicine. *Genes & Development*, v. 26, p. 1131–1155, 2015.
- TURRO, N.; CHUNG, C. *Macromolecules*, v. 17, pp. 2123 1984.
- VAN-BEEK, E.; BALM, A.; NIEWEG, O.; HAMMING-VRIEZE, O.; LOHUIS, P. C. KLOP, W. M. Treatment of Regional Metastatic Melanoma of Unknown Primary Origin. *Cancers.*, 7(3), p. 1543–1553, 2015.
- VROUENRAETS, M.B.; VISSER, G.W.M.; SNOW, G.B.; VAN DONGEN, G.A.M.S. Basic principles, applications in oncology and improved selectivity of photodynamic therapy, *Anticancer Res.*, v. 23, pp. 505–522, 2003.

- WAINWRIGHT, M. Photodynamic Therapy: The Development of New Photosensitisers. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry - Anti-Cancer Agents)*, v. 8, n. 3, pp. 280-291(12), 2008.
- WANKA, G.; HOFFMANN, H.; ULBRICHT, W. *Macromolecules*, v. 27, pp. 4145, 1994.
- WANG, M.; THANOUT, M. Review. Targeting nanoparticles to cancer. *Pharmacological Research*, v. 62, n. 2, p. 90–99, 2010.
- WILSON, B. D.; MANG, T. S.; COOPER, M.; STOLL, H.; *Facial Plast. Surg.* **1989**, 6, 185.
- WOJTOVICH, A. P.; FOSTER, T. H. Optogenetic control of ROS production. *Redox Biology.*, 2(1), p. 368–376, 2014.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. www.who.org.
- XIAO, K.; LI, Y.; LUO, J.; LEE, J.S.; XIAO, W.; GONIK, A.M.; AGARWAL, R.G.; LAM, K.S. The effect of surface charge on in vivo biodistribution of PEG-oligocholic acid based micellar nanoparticles. *Biomaterials*. 32 (13): 3435-3446, 2011.
- YAMAMOTO, N.; HOMMA, S.; NAKAGAWA, Y. Activation of mouse macrophages by in vivo and in vitro treatment with a cyanine dye, lumin. *J Photochem Photobiol B*.13,295-306, 1992.
- YANO, T.; HATOGAI, K.; Morimoto, H.; YODA, Y.; KANEKO, K. Photodynamic therapy for esophageal cancer. *Ann Transl Med.*, v. 2, n. 3, p. 29, 2014.
- YEE, D.; BUTTS, C.; JOY, A.; SMYLLIE, M.; FENTON, D.; CHU, Q.; HANSON, J.; ROA, W. Clinical trial of post-chemotherapy consolidation thoracic radiotherapy for extensive-stage small cell lung cancer. *Radiotherapy and Oncology.*, v. 102, n. 2, p. 234–238, 2012.
- ZAKARIA, A.B.; PICAUD, F.; RATTIER, T.; PUDLO, M.; DUFOUR, F.; SAVIOT, L.; CHASSAGNON, R.; LHERMINIER, J.; GHARBI, T.; MICHEAU, O.; HERLEM, G. Antitumor activity of photodynamic therapy performed with nanospheres containing zinc-phthalocyanine. v. 12;15, n. 8, pp. 5664, 2015.
- YONCHEVA, K.; CALLEJA, P.; AGUEROS, M.; PETROV, P.; MILADINOVA, I.; TSVETANOV, C.; IRACHE, J.M. Stabilized micelles as delivery vehicles for paclitaxel. *Int J Pharm.* v.436, n. (1-2), pp. 258-264, 2012.
- SCHERLUND, M.; BRODIN, A.; MALMSTEN, M. Micellization and gelation in block copolymer systems containing local anesthetics. *Int. J. Pharm.*, v. 211, pp. 37, 2000.

YU, G.; DENG, Y.; DALTON, S.; ATWOOD, D.; PRICE, C.; BOOTH, C. *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, 25, 2537, 1992.

PICAUD, F.; RATTIER, T.; PUDLO, M.; DUFOUR, F.; SAVIOT, L.; CHASSAGNON, R.; LHERMINIER, J.; GHARBI, T.; MICHEAU, O.; HERLEM, G. Antitumor activity of photodynamic therapy performed with nanospheres containing zinc-phthalocyanine., v. 12, n. 15(8), p. 5664, 2015.

ZHAO, BAOZHONG.; YIN, J- J.; BILSKI, P. J.; CHIGNELL, C. F.; ROBERTS, J. E.; HE, Y-Y. Enhanced Photodynamic Efficacy towards Melanoma Cells by Encapsulation of Pc4 in Silica Nanoparticles. *Toxicol Appl Pharmacol*, v. 241(2), pp. 163–172, 2009.

ZHANG, Y.; LAM, Y. M. Study of Mixed Micelles and Interaction Parameters for Polymeric Nonionic and Normal Surfactants *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, v. 6, 1–5, 2006.