



Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal

**AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DA TERAPIA FOTODINÂMICA
MEDIADA POR NANOEMULSÃO À BASE DE ÓLEO DE AÇAÍ CONTRA
CÂNCER DE PELE NÃO-MELANOMA**

Brasília, DF

Agosto, 2013



Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal

KHELLIDA LOIANE VIEIRA RAMOS

**AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DA TERAPIA FOTODINÂMICA
MEDIADA POR NANOEMULSÃO À BASE DE ÓLEO DE AÇAÍ CONTRA
CÂNCER DE PELE NÃO-MELANOMA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biologia Animal.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Bentes de Azevedo

Brasília- DF

Agosto, 2013

KHELLIDA LOIANE VIEIRA RAMOS

**AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DA TERAPIA FOTODINÂMICA
MEDIADA POR NANOEMULSÃO À BASE DE ÓLEO DE AÇAÍ CONTRA
CÂNCER DE PELE NÃO-MELANOMA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biologia Animal.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Ricardo Bentes de Azevedo - Presidente

Universidade de Brasília

Profa. Dra. Graziella Anselmo Joanitti

Universidade de Brasília

Prof. Dr. Valdir F. Veiga Junior

Universidade do Amazonas

Dr. Luis Alexandre Muehlmann

Nanodynamics

Brasília- DF

Agosto de 2013

Dedico este trabalho aos meus pais, irmãs e ao meu esposo. Por toda a dedicação a mim dispensada, pelo carinho e compreensão. Por terem sido sempre o meu porto seguro e a minha inspiração.

Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

A Deus meu eterno agradecimento por me abençoar com a vida, com a saúde e a oportunidade de seguir nesta longa caminhada. Por estar sempre ao meu lado me guardando e sendo meu fiel amigo!

Aos meus amados pais, por serem meu exemplo de coragem e persistência. Pelo amor e dedicação dispensados a mim e por toda a formação do meu caráter. Por todo o esforço realizado para que eu pudesse estudar e alcançar mais esta vitória!

Ao meu amado esposo, por todo amor e compreensão. Por viver e fazer dos meus sonhos e projetos os seus. Por fazer a vida ser ainda mais linda e feliz. Muito obrigada por todo o apoio e confiança!

Às minhas queridas irmãs e ao meu irmão por toda a confiança e estímulo dedicados a mim. Por estarem sempre ao meu lado repletos de amizade e sempre à disposição para me ouvir. Por todas as brincadeiras para me fazer sorrir na luta deste o ensino médio! Amo vocês!

Aos meus queridos e amados avós, por serem meu orgulho e meu exemplo de luta e de vitória. Por estarem sempre torcendo pelo meu sucesso e sendo felizes por eu estar conquistando aquilo que tanto almejavam e que não lhes foi possível! Meu imenso amor e gratidão!

A todos os meus amigos por terem me acompanhado nessa jornada e me ajudado a vencer! Por todo carinho e amizade, muito obrigada!

Ao meu querido amigo e orientador, prof. Dr. Ricardo Bentes de Azevedo por toda confiança, amizade e auxílio dispensados a mim. Por ser sempre meu exemplo de estudo, de profissional e de busca pelos próprios ideais, não importando quão difícil seja. Por sempre me inspirar a fazer e a dedicar o meu melhor à pesquisa! Meu eterno carinho e admiração!

À Zélia Ramos, por todo empenho e dedicação em me ajudar. Por estar sempre torcendo para que tudo desse certo neste trabalho. Por sempre tentar otimizar o tempo para que os materiais chegassem rápido, foi de grande valia a sua presença e auxílio! Muito obrigada!

Ao meu amigo Dr. Cláudio Cavalcanti, por sempre torcer pelo meu sucesso. Por acreditar no meu potencial e ter contribuído tanto neste trabalho! Pela amizade e empenho em me ajudar!

Ao Dr. Luis A. Muehlmann por todo auxílio e paciência comigo. Por toda ajuda dispensada a mim durante esta caminhada, por sempre me socorrer em situações difíceis e pela amizade!

À todos os meus amigos e companheiros do laboratório, por tornar o ambiente de trabalho tão agradável e descontraído e por toda a ajuda. Em especial, às minhas amigas que contribuíram muito pelo sucesso deste projeto, principalmente Victoria Monge; Ludmila e Mayara Simonelly.

A todos os alunos e técnicos do laboratório de microscopia eletrônica, por toda ajuda e disponibilidade em abrir as portas a mim, principalmente à aluna Natália pelo auxílio no microscópio confocal.

À bioterista Janaína, por toda preocupação e ajuda com os animais necessários durante a pesquisa.

Enfim, à todos que contribuíram direta ou indiretamente neste estudo e que torceram para que o sucesso fosse alcançado.

Ao CNPq, à FAP/DF, à CAPES e ao INCT de Nanobiotecnologia, pelo fomento dos projetos e estudos em nanotecnologia.

À Universidade de Brasília por toda a infraestrutura disponível para a realização deste estudo. Por toda a qualidade no ensino e por toda a história atrás do nome.

RESUMO

O câncer é definido como um conjunto de mais de cem doenças caracterizado por desordens celulares ocasionadas por múltiplas alterações genéticas que conduzem a um desequilíbrio na proliferação e morte celular. No Brasil, as estimativas para o ano de 2012 e 2013 apontam a ocorrência de aproximadamente 518.510 casos novos de câncer, dentre os quais, o mais incidente será o câncer de pele não melanoma. Devido a tantos efeitos colaterais das terapias convencionais no tratamento das neoplasias, a terapia fotodinâmica (TFD) desponta como uma alternativa segura e altamente eficaz no tratamento de diversos tipos de câncer. A sua alta eficácia decorre da indução direta de morte das células neoplásicas, da destruição da microvasculatura tumoral e do reforço da imunidade antitumoral. A TFD é realizada combinando-se o oxigênio molecular, luz de comprimento de onda específico e um fotossensibilizante. Assim, o objetivo deste trabalho foi desenvolver uma nanoemulsão (nanoA) à base de óleo de açaí como fotossensibilizante para uso na TFD e investigar os efeitos biológicos *in vitro e in vivo* no tratamento de câncer de pele não-melanoma. Para formulação da nanoA, foi utilizado água, óleo e surfactante Tween 80 e utilizou-se o método de temperatura de inversão de fase (PIT). Para a avaliação dos aspectos morfológicos e coloidais da nanoA utilizou-se recursos de microscopia eletrônica de transmissão e aparelho de dispersão dinâmica de luz Zetasizer, respectivamente. As propriedades fotofísicas foram avaliadas com leituras dos espectros de absorbância e fluorescência em espectrofotômetro. A nano A apresentou pico de absorção e emissão na região do vermelho, o que é bom para fotossensibilizantes a serem aplicados na TFD já que corresponde à janela óptica tecidual. O diâmetro hidrodinâmico obtido foi de 117,5 nm, o diâmetro médio de 74 nm, o índice de polidispersividade de 0,144 e potencial zeta de -0.536mV; características essas que viabilizam o uso da nanoA em sistemas biológicos devido a monodispersividade e pequeno diâmetro, favorecendo a retenção e permeação no tumor (EPR). A capacidade de geração de espécies reativas de oxigênio foi medida através do método de decaimento por benzofurano, comprovando a atividade fotoquímica do óleo, viabilizando seu uso como fotossensibilizante na TFD. A avaliação *in vitro* consistiu em análises de incorporação e distribuição da nanoA em células de carcinoma epidermóide humano A431 e em fibroblasto humano Detroit, assim como na avaliação da citotoxicidade das linhagens submetidas a diferentes concentrações da nanoA na ausência e na presença de luz. A linhagem normal mostrou-se inerte à incubação com a

nanoA enquanto que a tumoral foi mais sensível nos menores tempos de exposição à nano tanto no escuro quanto pós-irradiação. O tempo necessário à incubação foi de quinze minutos e de irradiação equivalente à 10 minutos. A avaliação *in vivo* consistiu em análises clínica e histopatológica de tumores induzidos por injeção ortotópica de células A431 em camundongos nude, tratados com três sessões de TFD além de análises sanguíneas. Tanto a terapia quanto o fármaco sozinho apresentaram atividade antitumoral. A TFD foi responsável por 33% de regressão total enquanto que a nanoemulsão sozinha por 16% de regressão total e 33% de regressão parcial. Estes resultados indicam que esta inédita nanoemulsão é em potencial um novo fármaco para aplicação antitumoral, considerando a alta resistência do carcinoma estudado e a grande eficácia do tratamento alcançado.

Palavras-chave: Carcinoma epidermóide, terapia fotodinâmica, nanoemulsão, agente antitumoral, açai, não-melanoma, *Euterpe oleracea*.

ABSTRACT

Cancer is defined as a set of more than hundred diseases characterized by cellular disorders caused by multiple genetic alterations that leads to imbalance between cell proliferation and death. In Brazil, approximately 518,510 new cases of cancer have been estimated from 2012 to 2013, majority being of non melanoma form of skin cancer. Due to so many side effects of the conventional therapies in the treatment of the neoplasias, the photodynamic therapy (PDT) emerges as a safe and highly efficient alternative in the treatment of several types of cancer. This high efficiency results from the straight induction of death of cancer cells, from the destruction of the tumor vasculature and to the reinforcement of the antitumor immunity. PDT is employed with combination molecular oxygen, specific wavelength and photosensitizers. So, the objective of this work was to develop a nanoemulsion (nanoA) with açai oil as a photosensitizer for the application in PDT and investigates the biological effects *in vitro* and *in vivo* to evaluate the efficacy in the treatment of non melanoma skin cancer. For This formulation used water, oil and Tween 80 surfactant by the method of phase inversion temperature (PIT). For morphological and colloidal evaluation of nanoA transmission electronic microscopy, scanning electronic microscopy and dynamic dispersal of light Zetasizer were used. The photo-physical properties were evaluated with readings of the spectrum of absorbance and fluorescence in a spectrophotometer. The peak of absorption and emission was in the red region, which is good for application in PDT. The hydrodynamic diameter obtained was 117.5 nm, the middle diameter was 74 nm, the polydispersity index was 0.144 and the zeta potential was -0.536 mV. These features enabled the use of nanoA in biological systems, due to the monodispersity and small diameter favoring the permeation and retention in the tumor (EPR). The capacity of generation of reactive oxygen species was measured through the decline method for benzofuran proving the photochemical activity of the oil, enabling it's use as a photosensitizer in PDT. The *in vitro* evaluation consisted of analyses of internalization and distribution of the nanoA in human epidermoid carcinoma cells A431 and in human fibroblast Detroit, as well as of evaluation the cytotoxicity of the cell line subjected to different concentrations of nanoA in the absence and in the presence of light. The normal cell line appeared inert to the incubation with the nanoA whereas the tumoral was more sensitive. The time necessary for nanoemulsion association on cells was fifteen minutes. The *in vivo* evaluation of the effects of nano A consisted of clinic and

histopathological analyses of ortotopic induced tumor by injection of A431 cells in nude mice, treated with three sessions of PDT. As much as drug therapy alone showed antitumor activity. PDT was responsible for 33 % of total regression while the nanoemulsion alone for 16 % of total regression and 33 % of partial regression. These results indicate that this nanoemulsion is good as photosensitizer and a potential new antitumor drug for application in squamous cell carcinoma (SCC), considering the high resistance of this carcinoma and the great efficiency of the treatment.

Key Words: epidermoid carcinoma cell; photodynamic therapy; nanoemulsion; antitumor agent, açai oil, non melanoma, *Euterpe oleracea*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Etapas da carcinogênese

Figura 2: Janela ótica do espectro de absorção para aplicação da TFD

Figura 3: Mecanismos fotoquímicos e fotofísicos da TFD

Figura 4: Ilustração esquemática de inversão de fase por temperatura

Figura 5: Diagrama esquemático de nanoemulsão do tipo óleo/água ou água/óleo

Figura 6: Montagem para aplicação *in vivo* da terapia fotodinâmica

Figura 7: Diâmetro hidrodinâmico e índice de polidispersão da nanoemulsão com proporção de 1:3 (óleo: tensoativo)

Figura 8: Diâmetro hidrodinâmico e índice de polidispersão (PDI) da nanoemulsão com proporção de 1:4 (óleo: tensoativo)

Figura 9: Diâmetro hidrodinâmico e índice de polidispersão (PDI) da nanoemulsão com proporção de 1:5 (óleo: tensoativo)

Figura 10: Eletromicrografia de transmissão da nanoemulsão

Figura 11: Distribuição gaussiana da frequência do diâmetro das nanogotículas

Figura 12: Distribuição dos valores de diâmetro hidrodinâmico por dispersão dinâmica da luz

Figura 13: Avaliação da estabilidade coloidal da NanoA até 180 dias de armazenamento.

Figura 14: Espectro de absorbância e fluorescência da nanoemulsão

Figura 15: Produção de oxigênio singlete por irradiação da nanoemulsão

Figura 16: Espectro do comprimento de onda emitido pelo Diodo Emissor de Luz – LED

Figura 17: Perfil de incorporação da nano A pela linhagem A431 expostas por diferentes tempos.

Figura 18: Internalização da nanoemulsão pela linhagem Detroit por microscopia confocal.

Figura 19: Internalização da nanoemulsão pela linhagem A431 por microscopia confocal.

Figura 20: Percentual de viabilidade celular após incubação com a nano A por 24h em diferentes concentrações

Figura 21: Percentual de viabilidade celular da linhagem Detroit após incubação no escuro com a nano A por até 2h

Figura 22: Percentual de viabilidade celular da linhagem A431 após incubação no escuro com a nano A por até 2h

Figura 23: Percentual de viabilidade celular da linhagem Detroit após incubação no escuro com a nano A e após aplicação de TFD

Figura 24: Percentual de viabilidade celular da linhagem A431 após incubação no escuro com a nano A e após aplicação de TFD

Figura 25: Percentual de viabilidade celular da linhagem Detroit e A431 após aplicação de TFD por tempo fracionado de irradiação

Figura 26: Peso corporal de cada grupo experimental acompanhados por 21 dias

Figura 27: Variação do volume tumoral, peso do tumor e peso relativo de cada grupo experimental

Figura 28: Percentual de regressão total, regressão parcial e crescimento tumoral cada grupo estudado

Figura 29: Comparação do efeito macroscópico pós-tratamento entre os grupos experimentais.

Figura 30: Crescimento local do tumor sem invasão dos tecidos adjacentes, característicos do modelo ortotópico

Figura 31: Quantificação das enzimas sanguíneas analisadas bioquimicamente.

Figura 32: Prancha histológica retratando o baço, o fígado, o linfonodo cervical, o pulmão e o rim.

Figura 33: Prancha histológica representando o tumor em todos os grupos analisados.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Delineamento dos grupos experimentais utilizados para avaliar a eficácia da Terapia Fotodinâmica em camundongos nude no tratamento de câncer de pele não melanoma

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ANOVA - Análise de variância
- EC 30/ EC 50 – Concentração efetiva tóxica para 30 e 50 % das células
- DAMPS - Danger Associated Molecular Patterns
- DH - Diâmetro hidrodinâmico
- D.O. - Densidade óptica
- DNA - Ácido desoxirribonucleico
- DMEM - Dulbecco Modified Eagle Medium (Invitrogen)
- DMSO - Dimetilsulfóxido
- EDTA - Ácido etilenodiaminatetraacético
- E.P.M - Erro padrão da média
- EPR - Permeação e retenção aumentadas
- H&E - Hematoxilina e Eosina
- INCA - Instituto Nacional do Câncer
- MTT - Brometo de 3(4,5 dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil-tetrazólio
- $^1\text{O}_2$ - Oxigênio singlete
- ROS - Espécies Reativas de Oxigênio
- PBS - Tampão Fosfato Salina
- PS - Fotossensibilizador
- SFB - Soro Fetal Bovino
- TFD - Terapia Fotodinâmica

Conteúdo

INTRODUÇÃO	21
1. CÂNCER	22
1.1 CÂNCER DE PELE	24
1.1.2 CARCINOMA BASOCELULAR.....	25
1.1.3 CARCINOMA ESPINOCELULAR.....	26
1.2 TRATAMENTOS CONVENCIONAIS:.....	28
1.3 TERAPIA FOTODINÂMICA	29
1.3.1 FENÔMENOS FOTOFÍSICOS E FOTOQUÍMICOS.....	31
1.3.2 FOTOSSENSIBILIZANTES	33
1.3.3 ÓLEO DE AÇAÍ.....	34
1.4 NANOEMULSÃO	36
JUSTIFICATIVA	38
2. JUSTIFICATIVA	39
OBJETIVOS	40
3. OBJETIVOS.....	41
3.1 OBJETIVO GERAL	41
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	41
3.2.1 FORMULAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO	41
3.2.2 ETAPA IN VITRO	41
3.2.3 ETAPA IN VIVO.....	41
MATERIAIS E MÉTODOS	43
4. MATERIAIS E MÉTODOS	44
Desenho Experimental:	44
4.1 Materiais	44
4.2 Efeito da Variação da Proporção de Tensoativo Tween-80 sobre Formulação da Nanoemulsão	44
4.2.3 Formulação da Nanoemulsão (nanoA)	45
4.3 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DA NANOEMULSÃO	45
4.3.1 Caracterização Morfológica por Análise de Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	45

4.3.2	Determinação dos valores coloidais da NanoA.....	46
4.4	AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES FOTOFÍSICAS	46
4.4.1	Espectros de Absorbância e Fluorescência	46
4.5	AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES FOTOQUÍMICAS	47
4.5.1	Capacidade de geração de Oxigênio Singlete pelo Método de Decaimento do Benzofurano	47
4.5.2	Avaliação da Estabilidade Coloidal e Fotodinâmica da Nanoemulsão	48
4.6	AVALIAÇÃO IN VITRO	48
4.6.1	Análise do perfil de incorporação da nanoA pelas células A431	48
4.6.2	Análise Do Tempo De Incorporação Da Nano A por Microscopia Confocal ..	48
4.6.3	Análise da toxicidade no escuro.....	49
4.6.4	Viabilidade celular após aplicação de TFD mediante ensaio de MTT	50
4.7	EXPERIMENTAÇÃO IN VIVO	51
4.7.1	Animais.....	51
4.7.2	Indução Tumoral	51
4.7.3	Análise Histopatológica	53
4.8	ANALISE ESTATÍSTICA.....	54
RESULTADOS	55
5. 1	CARACTERIZAÇÃO	56
5.1.2	Efeito da Variação da Proporção de Tensoativo Tween-80 sob Propriedades da Formulação da Nanoemulsão	56
5.1.3	Caracterização Morfológica por Análise de Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	58
5.1.4	Determinação dos valores coloidais da NanoA.....	59
5.1.5	Avaliação da Estabilidade da Nanoemulsão sob Diferentes Condições	60
5.1.6	Avaliação das Propriedades Fotofísicas: Espectros de Absorbância e Fluorescência.....	60
5.1.7	Avaliação das propriedades Fotoquímicas: Geração de Oxigênio Singlete...	61
5.1.8	Espectro de Emissão do LED	63
5.2	EXPERIMENTOS <i>IN VITRO</i>	63
5.2.1	Análise do perfil de incorporação da nano A pelas células A431	63
5.2.2	Análise Do Tempo De Incorporação Da Nano A por Microscopia Confocal ..	64
5.2.3	Análise da toxicidade no escuro sob tempo prolongado de exposição ao fármaco fotossensibilizante pelo ensaio de MTT	67

5.2.4 Análise da toxicidade no escuro sob tempos variados de exposição ao fármaco fotossensibilizante pelo ensaio de MTT	67
5.2.5 Viabilidade celular após aplicação de TFD mediante ensaio de MTT	69
Quantificação da frequência de necrose e apoptose	71
5.3 EXPERIMENTOS <i>IN VIVO</i>	72
5.3.1 Análise Clínica.....	72
DISCUSSÃO	80
CONCLUSÃO	92
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	95

INTRODUÇÃO

1. CÂNCER

O câncer representa hoje um notável problema de saúde pública mundial. Segundo dados divulgados pela Organização Mundial de Saúde (OMS), a estimativa para o ano de 2030 são de 27 milhões de casos incidentes de câncer, 17 milhões de mortes ocasionadas por câncer e 75 milhões de pessoas vivas acometidas por câncer anualmente, sendo os países de baixa e média renda os mais afetados por este aumento na incidência [1].

Nos Estados Unidos, somente no ano de 2010 houveram 570 mil mortes causadas por câncer [2]. No Brasil, segundo estimativas do Instituto Nacional do Câncer (INCA) para o ano de 2012 e 2013 são esperados aproximadamente 520 mil novos casos de câncer, dos quais 134 mil são de cancer de pele não melanoma, sendo então o de maior incidência na população brasileira.

O câncer é um nome genérico responsável por designar um conjunto de mais de 100 tipos e subtipos de neoplasias diferentes [3]Então, o que torna possível um grupo de células comprometer toda a viabilidade do organismo?

As células neoplásicas adquirem ao longo do processo de tumorigênese várias características baseadas na alteração genômica e epigenômica que as permitem proliferar desordenadamente. Neste processo, há três importantes etapas: a Iniciação; a promoção e a progressão, exemplificado na figura 1 [4].

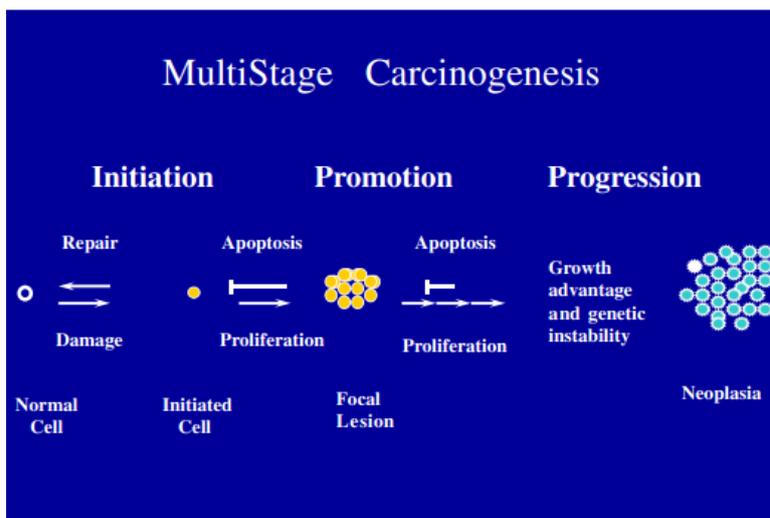


Fig 1: Etapas da carcinogênese / Adaptado de: Klaunig, Wang et al. 2011 [4].

Durante a iniciação, células normais que sofreram dano irreparável no DNA devido à ataque de carcinógenos químicos, radiação ultravioleta entre outros são

chamadas de células iniciadas [4]. Após, segue-se a promoção. Esta é responsável pela expansão das células iniciadas e alteração na modulação da expressão gênica, resultando no aumento de divisões celulares e/ou decréscimo na taxa de apoptose [4]. E na última etapa, a progressão, ocorre o aumento da instabilidade genética e a proliferação celular irreversível e descontrolada [4].

Esta, por sua vez, possui algumas características que as permitem dividir-se e manter-se autosuficientes. Dentre elas:

Síntese dos próprios sinais de crescimento, muitas vezes mimetizados pelos oncogenes (proto-oncogenes mutados com efeito dominante, responsáveis por aumentar a proliferação celular e inibir a apoptose) sendo responsivas a eles e estabelecendo um feedback positivo – estimulação autócrina [3].

- Evasão aos sinais antiproliferativos – estes sinais são responsáveis por manter as células quiescentes, manter a homeostase e podendo bloquear a proliferação [3].
- Capacidade de evitar a apoptose – esta é uma característica tão importante quanto a proliferação descontrolada pois contribui de igual modo para a manutenção da quantidade de células [3].
- Potencial replicativo ilimitado [3].
- Angiogênese – capacidade de indução de formação dos próprios vasos sanguíneos para suprimento de oxigênio e nutrientes. É resultado da alta expressão de fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) [3,1]
- Metástase – capacidade de invasão tecidual formando colônias em ambientes diferentes do sítio primário. São responsáveis por 90% das mortes ocasionadas por câncer [3].

Essas habilidades adquiridas por certas células em determinado tecido, promove o desenvolvimento da neoplasia e o comprometimento do organismo, muitas vezes ocasionando o óbito. Desta maneira, a incidência crescente de câncer na população mundial é preocupante e exige novos tratamentos mais eficazes e menos agressivos [6].

1.1 CÂNCER DE PELE

O câncer de pele é a neoplasia mais comum no mundo. Há vários fatores etiológicos associados com a neoplasia cutânea, como: o fenótipo da pele, a localização geográfica, a quantidade de exposição solar [6], a redução da camada de ozônio, entre outros, porém o fator principal é a radiação ultravioleta (UV) [7]. A radiação UV induz mudanças epigenéticas promovendo a expansão da população de células iniciadas, além de inflamação dérmica, hiperplasia epidérmica, alteração na expressão de múltiplos genes associados com a proliferação, a diferenciação e a produção de citocinas [14], além de formar dímeros de pirimidina, provocar peroxidação lipídica e, formação de espécies reativas de oxigênio (ROS)

O câncer de pele é classificado em dois grandes grupos: o melanoma e o não-melanoma. O melanoma é originário dos melanócitos, e é raro se comparado ao não-melanoma [8]. Porém nas últimas quatro décadas a incidência aumentou consideravelmente. No ano de 2011, mais de 75 mil norte americanos foram diagnosticados com melanoma e mais de 9 mil foram a óbito. Apresenta disseminação linfática para regiões corpóreas distantes do sítio primário possuindo potencial metastático além de ser menos responsivo à terapias sistêmicas [9].

Já o câncer não melanoma, por sua vez, é originado a partir das células epidérmicas, variando apenas a localização na camada da epiderme. Quando originado de células da camada basal da epiderme, resulta em carcinoma basocelular (CBC), e, se originado da camada espinhosa culmina no carcinoma espinocelular (CEC) [8]. Além destes dois subtipos mais frequentes, há tumores originados de outros tipos celulares, como, carcinoma de células Merkel, adenocarcinoma sebáceo entre outros [6, 10].

O câncer de pele não melanoma é o mais comum, acometendo mais de 1,2 milhões de pessoas por ano nos EUA [11,12], essa alta incidência representa uma preocupação pública devido aos altos custos medicamentosos, a morbidade causada e aos resultados cosméticos [13]. No Brasil, o acometimento pela doença é o mais frequente em ambos os sexos [1]. Entre homens, a maior incidência ocorre nas regiões Centro-Oeste, Sul e Norte respectivamente, e, em mulheres ocorre igualmente em todas as regiões [1].

O principal agente etiológico da doença é a radiação ultravioleta (UV), além de outros agravantes como, por exemplo, a imunossupressão em pacientes transplantados [12] onde há diminuição do controle imunológico da pele [1].

1.1.2 CARCINOMA BASOCELULAR

O carcinoma basocelular (CBC) é a neoplasia mais comum no mundo. Deriva das células tronco da camada basal da epiderme e dos folículos pilosos. Apresenta crescimento bastante lento [15;16] e é localmente invasivo com baixo potencial metastático, sendo facilmente tratável por excisão cirúrgica se diagnosticado precocemente [16].

A exposição à radiação ultravioleta é o fator mais representativo no aparecimento da doença, sendo que pessoas que sofreram exposição solar aguda até os 20 anos de idade tem o risco aumentado em três vezes de ser acometido por CBC [16;17]. Já a exposição solar crônica está mais associada ao aparecimento de carcinoma espinocelular (CEC) [16].

A radiação UVB é responsável por gerar produtos mutagênicos no DNA tais como os dímeros de pirimidina e mutações em genes essenciais na regulação das funções celulares, como por exemplo, o *p53*. Já a radiação UVA apresenta efeito indireto na geração de radicais livres corroborando com os danos causados pela radiação UVB. Além disto, a radiação UV causa imunossupressão na pele [16].

A exposição solar fracionada está mais associada ao CBC superficial enquanto que os tipos nodulares são geralmente devido à exposição solar intensa [16]. Há vários subtipos de CBC, variando-se o grau de agressividade. Dentre eles, há o pigmentado, o superficial, o cístico e o nodular, entre outros. Este último, é o mais comum. Histologicamente, o CBC apresenta células basofílicas com núcleo proeminente [19].

A proporção de ocorrência na população é de quatro a cinco CBC para cada um CEC. O registro de CBC pelas entidades de saúde não é obrigatório, podendo ser a frequência ainda mais alta [16].

1.1.3 CARCINOMA ESPINOCELULAR

A pele é uma importante barreira de proteção entre o organismo e agentes externos do ambiente tais como radiação ultravioleta, estresses mecânicos, substâncias tóxicas e infecções. Dentre todas as camadas existentes, a epiderme é de grande relevância visto que é a mais externa sendo a primeira a sofrer qualquer dano proveniente do ambiente. É formada por várias camadas com diferentes tipos celulares, o que lhe confere várias funções, porém é majoritariamente composta por queratinócitos. Neoplasias originadas nos queratinócitos da camada espinhosa da epiderme desencadeia o carcinoma espinocelular (CEC) ou também conhecido por carcinoma de células escamosas [19].

O CEC é a segunda neoplasia do tipo não melanoma mais comum no mundo, sendo que, somente nos EUA são mais de 1,2 milhões de diagnósticos anuais do tipo não melanoma dos quais 20% correspondem ao CEC [20; 21]. Este, por sua vez, é duas vezes mais comum em homens do que em mulheres, muito provavelmente devido à maior exposição solar por consequência de algumas profissões, descuido com o filtro solar e uso de cabelo mais curto além de roupas que não protegem muito a região do tronco e face [23; 24].

Os custos relacionados ao tratamento de neoplasias do tipo não melanoma são muito altos, ultrapassando 1 bilhão de dólares por ano, além de ser de grande impacto social devido ao local de ocorrência ser em grande frequência no rosto, afetando a autoestima e a qualidade de vida do indivíduo [22].

O CEC está associado à exposição solar crônica, ao contrário do CBC que está mais correlacionado à exposição solar intermitente [26;30]. Este é o fator de maior relevância para o desenvolvimento do tumor primário. Há outros fatores que também contribuem para o aparecimento da doença, como exposição à arsênio, infecções virais por HPV, tratamento com imunossuppressores para transplante de órgãos, inflamação crônica e úlceras [21;24,27]. Há também outros agravantes que aumentam a vulnerabilidade ao CEC como características fenotípicas tais como pele e olhos claros além de predisposição genética [21;24,27] como xeroderma pigmentoso e albinismo oculocutâneo que tornam o indivíduo mais suscetível à quebras no DNA mediante exposição à radiação ultravioleta por defeito no mecanismo de reparo do DNA ou por deficiência na produção de melanina, respectivamente [18; 21].

A radiação UVA é considerada fator promotor de tumor pois causa a ativação da transdução de sinal da proteína quinase C, além de ser um potente modulador de imunossupressão cutânea, principalmente por interleucina-10 (IL-10). Já a radiação UVB causa dano no DNA do queratinócito e, por consequência, clones de células com núcleos aberrantes [27], além de produzir espécies reativas de oxigênio (ROS), resposta inflamatória aguda, peroxidação lipídica e dímeros de pirimidina [30]. Os dois tipos de radiação atuam conjuntamente iniciando e promovendo a carcinogênese [27;30].

O CEC é localmente invasivo, apresenta crescimento mais rápido e agressivo que o CBC com potencial de progressão e desenvolvimento de metástases além de taxa de mortalidade mais alta [30;11]. Há vários estágios de desenvolvimento de CEC, como a ceratose actínica, que são lesões benignas precursoras da neoplasia de fato, o carcinoma *in situ* que é a doença de Bowen e o CEC invasivo e metastático [18;21;30].

O aparecimento de CEC também está relacionado a regiões onde a camada de ozônio está mais comprometida e a locais mais próximos da linha do Equador, além de maior incidência em pessoas de idade mais avançada [24]. Entre 69% a 90% dos casos de CEC invasivo, está relacionado à mutações no gene *p53*, responsável pela indução de apoptose em células epidérmicas danificadas por radiação UV [34] além de outras mutações genéticas como WNT, Ras, c-Myc e NFkB, complexo proteico responsável pela regulação da inflamação, morfogênese, apoptose, diferenciação e proliferação celular [24;34;35]. Alterações nas vias de sinal Notch/CSL podem causar alterações teciduais incluindo atrofia no estroma e inflamação, precedendo e representando um forte indicativo de tumor epitelial [29;32]

Além de acometer a pele, o CEC pode aparecer também no trato digestivo superior, pulmão, região urogenital e na mucosa oral. Esta por sua vez, mais associada ao uso de cigarro e abuso de álcool [24;32]. Em pacientes imunotransplantados, o risco de acometimento pela doença é de 50 a 250 vezes maior, além da probabilidade de desenvolvimento do CEC invasivo e metastático também ser mais aumentado [24;27]. Foram realizados estudos nos quais foram constatados que 40% dos pacientes transplantados desenvolvem no mínimo lesões pré-cancerosas, dentro do período de 5 anos [33].

O CEC apresenta-se como nódulos rosados/avermelhados e com placas hiperqueratóticas com presença de necrose ao centro, muitas das vezes. Quando acomete a região da cabeça e pescoço, é bastante comum metástases nos linfonodos cervicais [21;24] com taxa significativa de 0,3 a 3,7%. O maior risco de aparecimento de metástases está relacionado à pouca diferenciação histológica e infiltração perineural e linfovascular [24]. Os lugares de maior reincidência são lábios, orelhas e careca [21].

As terapêuticas utilizadas para tratamento do CEC mais superficial são os mesmos aplicados para o CBC, e, em sua maioria a taxa de cura é de 90 a 98%. Nos casos de CEC mais agressivos, são aplicados os tratamentos convencionais, como a quimioterapia e radioterapia além de intervenção cirúrgica, porém há efeitos colaterais associados[21].

1.2 TRATAMENTOS CONVENCIONAIS:

Há várias formas de tratamento do câncer, todos apresentando vantagens e desvantagens. Dentre eles podemos citar cirurgia, quimioterapia, radioterapia e para tratamento de câncer mais superficial há a criocirurgia, curetagem e cauterização, entre outros [11]. Na maioria das vezes, para as neoplasias cutâneas mais superficiais e de pequena dimensão, os tratamentos acima citados são eficazes apesar de serem desconfortáveis e dolorosos [11].

Quando há uma neoplasia mais grave, a terapêutica aplicada se resume em cirurgia, quimioterapia ou radioterapia, porém há muitos efeitos colaterais [36;37].

No caso da aplicação da radioterapia, geralmente utilizada para tratamento de tumores malignos sólidos [38], pode-se irradiar os tecidos normais circunvizinhos ao tumor, aumentando-se a chance de acometimento de um segundo tumor além da possibilidade de desenvolver uma leucemia [39]. Há ainda, vários relatos em estudos realizados que, após a irradiação do tumor, ocorre um aumento da agressividade do fenótipo das células cancerosas remanescentes, favorecendo genes de sobrevivência e invasão celular além da angiogênese [40].

Enquanto que a quimioterapia, modalidade terapêutica que é recomendada à pacientes com neoplasias em estágio avançado, metastático ou com risco de recidiva

após tratamento do tumor primário, envolve o organismo por completo, aumentando a biodisponibilidade da droga e prejudicando as defesas do organismo [36]. Além das características citadas acima, os fármacos utilizados podem induzir mielossupressão, produção de citocinas que favorecem a proliferação celular ou a ablação dos mecanismos de imunossupressão [41].

Deste modo, é de extrema relevância a aplicação de uma terapêutica tão ou mais eficaz quanto as já empregadas, porém com os efeitos adversos e indesejados reduzidos. Deste modo, a nanobiotecnologia surge como ferramenta indispensável na precisão de entrega do fármaco ao local de interesse além de potencializar a biodisponibilidade do mesmo na área tumoral e reduzir os efeitos colaterais sistêmicos em associação à fármacos nanoestruturados[25;56;57].

Assim, a terapia fotodinâmica (TFD) associada à fármacos nanoestruturados apresenta a vantagem em potencial de ser mais específica e causar menos efeitos adversos em relação aos tratamentos convencionais, além de ser [38]:

- Não- invasiva
- Precisão no alvo
- Possibilidade de repetidas doses
- Aplicação ambulatorial
- Poucos efeitos colaterais
- Estimulação do sistema imunitário
- Baixo custo para o sistema de saúde

1.3 TERAPIA FOTODINÂMICA

A utilização da luz como modalidade terapêutica já era aplicada há mais de três mil anos pelas civilizações chinesas, egípcias e indianas para tratamento de doenças como psoríase, raquitismo e vitiligo. Há pouco mais de cem anos, o uso da luz como terapêutica voltou a ser discutida por pesquisadores, quando o alemão, Oscar Raab, observou morte de paramecium utilizando luz em comprimento de onda específico e o

corante alaranjado de acridina [42,43,44]. O que Raab reportou, ficou conhecido como terapia fotodinâmica [42].

A terapia fotodinâmica (TFD) consiste na administração de um agente não tóxico – (fotossensibilizante), luz em comprimento de onda específico e oxigênio molecular presente no tecido [42,43,45]. Esta técnica vem sendo aprimorada para tratamento de doenças locais ou sistêmicas como o câncer [45;46]. A luz utilizada para irradiação deve ter o comprimento de onda coincidente com a janela óptica tecidual, entre 600 a 800 nm, a fim de que haja penetração da luz no tecido e para que seja evitado interferência com os cromóforos biológicos naturais [43] (figura 2). Da mesma forma, o fotossensibilizante (Ps) deve acumular-se preferencialmente no tumor [45]. As fenestras aumentadas dos vasos sanguíneos presentes no tumor podem favorecer este acúmulo bem como o tamanho e a configuração da molécula fotossensível [44]. Além dos fatores acima, deve-se observar também o intervalo de tempo entre a administração do fotossensibilizante e a irradiação do tecido [43]. A interação da luz e do Ps com o oxigênio molecular gera espécies reativas de oxigênio (ROS) que são tóxicas às células, ocasionado o dano e a morte celular [43;44].

Em mais detalhes, o fotossensibilizante transfere a energia absorvida para o oxigênio molecular, esta reação ocorre imediatamente no local da energia irradiada. Nesta reação é gerado principalmente oxigênio singleto ($^1\text{O}_2$), que por sua vez, é extremamente reativo [44].

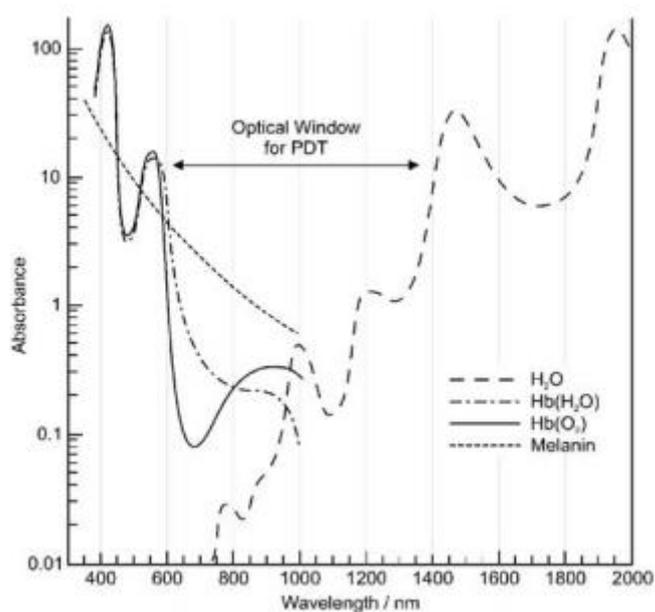


Figura 2: Janela ótica da TFD. Adaptado de Plaetzar, 2009 [47].

1.3.1 FENÔMENOS FOTOFÍSICOS E FOTOQUÍMICOS

O fotossensibilizante é excitado pela luz e, então, torna-se capaz de promover as reações fotoquímicas dos tipos I e II [47]. A reação do tipo I resulta na formação de ânions superóxidos, peróxido de hidrogênio, radicais hidroxil entre outros. Esses, por sua vez, podem se difundir com facilidade por membranas, porém não ficam limitados apenas aos compartimentos celulares [47].

Já na reação do tipo II, ocorre a transferência de energia para o oxigênio molecular, onde a configuração tripleto corresponde ao estado fundamental da molécula e, ao ser atacada pela reação fotoquímica, dá origem ao oxigênio singleto. As fotoreações do tipo I e II ocorrem paralelamente e a proporção de cada uma depende entre outros fatores da concentração presente de oxigênio molecular e do tipo de Ps utilizado [47].

O oxigênio singleto é o principal agente citotóxico na TFD e consiste numa espécie de ROS que possui um par de elétrons pareados com spins opostos em outro orbital, ao contrário do estado tripleto, que possui 2 elétrons desemparelhados com mesmo spin em orbitais degenerados, assim, possuem baixa energia e tempo de vida relativamente longo [42;43;47].

O tempo de vida do oxigênio singleto é extremamente curto e está relacionado diretamente ao solvente em que está inserido, sendo que em tecidos biológicos o período é cerca de $0,04\mu\text{s}$ [42]. Pode haver também o cruzamento intersistemas, onde ocorre a passagem do estado singleto para o mais estável, tripleto [47], conforme figura 3.

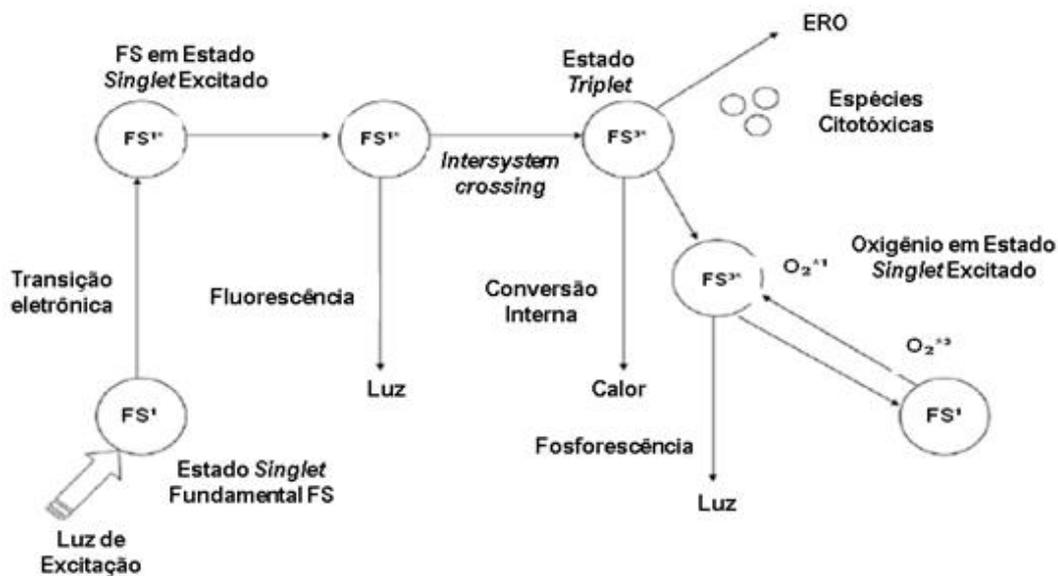


Figura 3: Mecanismos fotoquímicos e fotofísicos da TFD. Adaptado de Robertson et al., 2009. ERO: espécie reativa de oxigênio [98].

A fim de ser alcançado a estabilidade eletrônica, o alvo de ataque do oxigênio singleto são estruturas ricas em elétrons. Assim, os aminoácidos contendo porções aromáticas e enxofre, bem como as guaninas, lipídeos insaturados e ligações duplas de esteróides são alvos de ataque, resultando em danos à parede das mitocôndrias, dos lisossomos e da membrana plasmática [42].

A toxicidade celular pode ocorrer de maneira direta, causada por apoptose ou necrose; e de forma indireta, lesionando a vasculatura tumoral sendo um evento que danifica as células endoteliais, provoca a vasoconstrição, a liberação de fatores de coagulação com conseqüente agregação de plaquetas, gerando-se assim, oclusão do vaso, hipóxia e inanição do tumor [44,45,48] e, ainda, gerando resposta inflamatória com mediadores imunológicos dando início a uma cascata de eventos responsáveis pela posterior citotoxicidade tumoral [45].

A localização subcelular do Fs é uma das formas que determina qual das duas vias será induzida. Geralmente quando o Fs se acumula na mitocôndria ou no retículo endoplasmático rugoso é induzido apoptose e, quando o acúmulo acontece na membrana plasmática, nos lisossomos ou ainda, quando a dose de energia é alta, a necrose é induzida [48].

Ainda há mais uma forma de morte celular denominada de autofagia. Esta, por sua vez, é consequência de uma tentativa de reparo das células sobreviventes ao fotodano que por insuficiência dos elementos necessários à apoptose, como a Bax, entram em autofagia [48].

Considerando-se ainda os efeitos celulares da TFD, induz-se resposta inflamatória envolvendo resposta imune adaptativa e humoral devido a presença de células mortas, sendo estas, fonte de antígenos tumorais – DAMPs (moléculas que podem iniciar e perpetuar a resposta inflamatória por fator não infeccioso, geralmente são proteínas nucleares ou citosólicas). A resposta imune pode ser realizada por duas vias [48;49]. A primeira via é indireta, ocorrendo através da acumulação de células tumorais mortas responsáveis pela oferta de várias moléculas com efeito pró-inflamatório, responsáveis pela ativação de outras células imunitárias, como as interleucinas 1 β e 6 [48;49].

A segunda maneira é direta, sendo desencadeada por estresse oxidativo, ocorrendo infiltração de neutrófilos, macrófagos, monócitos e linfócitos; causando a super ou baixa regulação da expressão gênica de receptores ou de sinais de transdução moleculares [48,49]. A diferença na natureza e na intensidade da resposta inflamatória entre o tecido normal e o neoplásico pode influenciar na seletividade da TFD e no dano tecidual [44].

1.3.2 FOTOSSENSIBILIZANTES

Os fotossensibilizantes (FS) são um dos componentes utilizados na TFD. São atóxicos, sensíveis à irradiação luminosa sendo responsáveis pela absorção de energia luminosa e consequente excitação das moléculas de oxigênio molecular, fazendo a transição dos estados tripleto para singleto, gerando-se assim, as ROS [44; 47].

O fotossensibilizante ideal deve apresentar como propriedades:

- Composição estável;
- Facilidade de síntese
- Tendência mínima a agregação

- Não ser predominantemente hidrofóbico ou ser encapsulado em carreadores apropriados
- Atóxico na ausência de luz
- Fotoestável
- Faixa de absorção na região do vermelho
- Alto coeficiente de extinção molar
- Alvo-especificidade
- Eliminação rápida do organismo

Considerando-se as vantagens da TFD frente aos tratamentos convencionais, o emprego de carreadores adequados com o objetivo de potencializar a eficácia da TFD é de suma importância, pois desta forma, o Fs pode ser liberado no tecido alvo na concentração desejada [42]. Esses carreadores podem ser magnéticos, poliméricos, lipossomais, micelares, quantum dots ou ainda, serem apresentados em nanogotículas dispersas em nanoemulsão [46]. Neste contexto, a nanobiotecnologia ampara e torna possível alcançar estes objetivos a fim de que seja obtido uma terapia mais eficiente e segura para aplicação clínica. A nanotecnologia pode ser definida como a tecnologia que manipula a matéria em escala nanométrica, onde os átomos podem apresentar características peculiares, podendo ser alteração de cores, tolerância à temperatura, reatividade química ou condutividade elétrica, entre outras. Na saúde, a nanobiotecnologia pode ser usada para tratamento de doenças, diagnósticos, entre outros. O grande destaque é para o direcionamento e entrega de fármacos para o local de interesse em comparação com fármacos convencionais, podendo prolongar o tempo de circulação, reduzindo os efeitos colaterais, melhorando a distribuição nos tecidos [104,105].

O fotossensibilizante usado neste trabalho foi o óleo de açaí sob a hipótese de suas propriedades favorecerem o seu uso como agente fotossensível para a TFD, e com o auxílio da nanobiotecnologia, o mesmo foi disperso em nanoemulsão.

1.3.3 ÓLEO DE AÇAÍ

O açaí, fruto de uma palmeira pertencente à espécie *Euterpe oleracea*, é importante para o desenvolvimento agroindustrial da região amazônica [50]. O gênero *Euterpe*, congrega cerca de 28 espécies e é típico das Américas Central e do Sul, sendo

distribuído por toda a bacia Amazônica. As três espécies que ocorrem com maior frequência são *E. precatória*; *E. edulis* e principalmente a *E. oleraceae* [51;52].

Na etnomedicina, a raiz da palmeira e o talo da folha são usados contra dores musculares e picadas de cobra. A folha para aliviar dores no peito. A raiz também é utilizada no tratamento da malária e contra infecções hepáticas e renais [51;52].

A semente fornece um óleo verde escuro, onde estudos realizados constataram que os ácidos graxos mais abundantes no óleo de açaí são o ácido oleico e o ácido palmítico, representando 60 e 20% respectivamente, além de vários outros compostos fenólicos como o ácido vanílico por exemplo, o que lhe confere propriedades antioxidantes [53].

Segundo estudos realizados por Pacheco-Palencia (2008), foi observado que o óleo de açaí apresenta ação antiproliferativa e pró-apoptótica bem como ação tumoricida em várias linhagens celulares testadas, interferindo no ciclo celular e alterando a transdução de sinal intracelular [54;55] além de ser um inibidor de produção de óxido nítrico (NO) afetando a vasodilatação [53]. Há indícios de que as antocianinas presentes possam atuar em sinergismo com os compostos polifenólicos na redução do crescimento celular, sendo que as de maior predominância são cianidina-3-rutinosídeo e cianidina-3-glucosídeo [55].

Associado aos efeitos dos compostos fenólicos e dos flavonóides, foi observado também efeitos preventivos na carcinogênese, como inibição de formação de carcinógenos, aumento no nível de reparo do DNA e imunoregulação, além de ser formador de espécies reativas de oxigênio (ROS) [54]. Diante do exposto acima, o uso do óleo de açaí na clínica médica é de grande potencial terapêutico.

Do ponto de vista deste estudo, chamamos a atenção que estudos realizados pelo laboratório de Nanobiotecnologia em colaboração com pesquisadores da Universidade Federal do Acre mostraram que o óleo de açaí possui a propriedade de ser um bom gerador de ROS, capacitando-o a ser um fotossensibilizante. Assim, o objetivo principal deste trabalho foi a aplicação deste óleo como fotossensibilizante para utilização na Terapia Fotodinâmica (TFD) veiculado à nanoemulsão contra câncer de pele não melanoma.

1.4 NANOEMULSÃO

Emulsões são sistemas heterogêneos, termodinamicamente instáveis consistindo em um líquido imiscível disperso intimamente em outro, formando-se então, a fase dispersa e a contínua, respectivamente. São compostas basicamente por água, óleo e um tensoativo cujas propriedades físico-químicas podem afetar o comportamento do sistema. Assim, podem ser do tipo óleo em água (O/A) ou água em óleo (A/O) [58]. Não se formam espontaneamente e, suas propriedades dependem das condições termodinâmicas, das características de cada componente e do método de preparação.

Por sua vez, nanoemulsões são emulsões especiais com gotículas de tamanho variando entre 20 a 500 nm. Diferentemente das emulsões, são estáveis por longos períodos de tempo devido a estabilização por movimento Browniano [59,60; 61; 62; 63; 64]. São sistemas viáveis para produtos cosméticos e terapêuticos. Podem funcionar como sistemas de liberação de fármacos e até mesmo substituir os lipossomas ou vesículas carreadoras de compostos lipofílicos [59,60; 61; 62; 63; 64]. Apresentam transparência, bom aspecto sensorial, espalhabilidade, boa penetração tecidual devido à baixa tensão interfacial e ao tamanho reduzido [59,60; 61; 62; 63; 64].

A diferença no potencial químico gerado pela variação no raio das nanogotículas é a principal causa responsável por desencadear certa instabilidade das nanoemulsões, resultando na coalescência de uma gotícula menor em outra maior, este mecanismo é conhecido como Ostwald ripening [60,67]. Isto pode ocorrer pelo agrupamento de duas ou mais gotículas ou simplesmente pela transferência de gotículas individuais do óleo pela fase aquosa [60].

Dentre os diferentes métodos de emulsificação existentes, foi utilizado neste trabalho o método de temperatura de inversão de fase (PIT) (Figura 4). Este método consiste na transição de óleo em água (O/A) em baixas temperaturas e de água em óleo (A/O) em altas temperaturas (Figura 5), de acordo com a alteração do raio de curvatura do surfactante, que se forem não-iônicos alcançam essa mudança com a alteração da temperatura do sistema [60].

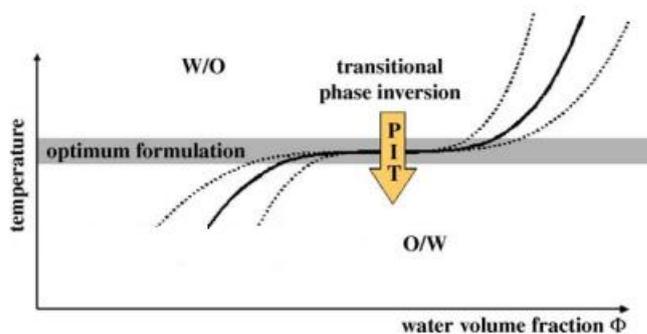


Figura 4: Ilustração esquemática de inversão de fase por temperatura. A linha sólida marca o local de inversão e as linhas pontilhadas a zona de histerese. Adaptado de Fernandez, P. et al, 2004 [62].

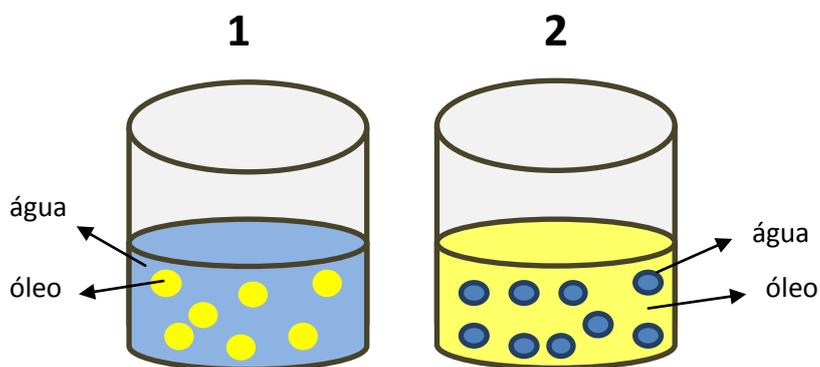


Figura 5: Diagrama esquemático de nanoemulsão do tipo óleo/ água (1) e água/ óleo (2).

Neste trabalho, foi formulado uma nanoemulsão do tipo O/A capaz de entregar os componentes bioativos do óleo de açaí, denominada nano A para aplicação como fotossensibilizante na TFD.

JUSTIFICATIVA

2. JUSTIFICATIVA

O tratamento seguro e eficaz do câncer representa ainda um grande desafio à medicina. Os tratamentos atualmente disponíveis na prática clínica geralmente causam muitos efeitos adversos relevantes e, algumas vezes, são pouco eficazes. As estimativas de incidência de carcinoma basocelular e espinocelular para o Brasil nos próximos anos não são nada promissores, sendo esperados 134 mil novos casos aproximadamente referente ao ano de 2012 e 2013.

Dessa maneira, considerando as propriedades deste óleo como fotossensibilizante para aplicação na TFD, o óleo de açaí apresentado na forma de nanoemulsão pode ser estabelecido no uso de uma terapia mais eficiente e satisfatória para tratamento de neoplasias cutâneas. Desta maneira, para que possa ser utilizado na clínica, caso sejam comprovadas as hipóteses, faz-se necessária a avaliação da toxicidade bem como dos efeitos causados *in vitro* e *in vivo*.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Diante do exposto acima, este trabalho se propõe a avaliação da eficácia da terapia fotodinâmica aplicada contra câncer de pele não melanoma *in vitro* e *in vivo* utilizando como fotossensibilizante o óleo de açaí nanoemulsificado.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.2.1 FORMULAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO

- Formular a nanoemulsão com óleo de açaí para aplicação na terapia fotodinâmica.
- Caracterizar a nanoemulsão de óleo de açaí no que se refere as propriedades morfológicas (microscopia eletrônica de transmissão e varredura); as propriedades coloidais (índice de polidispersão, potencial zeta e diâmetro hidrodinâmico) assim como realizar testes para verificar a estabilidade da mesma sob diferentes condições de armazenamento.
- Avaliar as propriedades fotoquímicas da nanoemulsão (produção de ROS) bem como as fotofísicas (espectros de absorbância e fluorescência).

3.2.2 ETAPA *IN VITRO*

- Avaliar o perfil de incorporação da nanoemulsão por células de carcinoma A431 utilizando como controle uma linhagem não neoplásica, Detroit 551 e a localização subcelular da nano A por análises de absorbância e por microscopia confocal.
- Avaliar a toxicidade da nanoemulsão aplicada à cultura de células A431 e Detroit na ausência de luz e submetidas à TFD, sob diferentes concentrações de nanoA e sob diferentes tempos de irradiação.

3.2.3 ETAPA *IN VIVO*

- Realizar análises a respeito da regressão tumoral e da eficácia do tratamento mediante avaliações clínicas periódicas e histopatológicas dos grupos tratados e controle em camundongos nude portadores de carcinoma espinocelular induzidos mediante injeção ortotópica de células A431.

MATERIAIS E MÉTODOS

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Desenho Experimental:

Caracterização da nanoemulsão	<ul style="list-style-type: none"> • Análises morfológicas • Caracterização das variáveis coloidais/ Propriedades fotoquímicas e fotofísicas
<i>In vitro</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Testes de incorporação da nanoA pelas células. • Testes de citotoxicidade no escuro e mediante aplicação de TFD
<i>In vivo</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Indução tumoral e acompanhamento clínico • Avaliação da eficácia do tratamento mediante regressão do volume tumoral e análises histopatológicas

4.1 Materiais

As linhagens celulares utilizadas (A431 – carcinoma espinocelular humano e Detroit 551 – fibroblasto de derme humana) foram adquiridos da American Type Culture Collection (ATCC). O meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) e Minimum Essential Media (MEM), ambos suplementados com soro fetal bovino 10% e antibiótico penicilina e estreptomicina (1%) foram adquiridos da empresa Gibco, EUA. Brometo de 3(4,5dimetiliazol-2il)-2,5-difenil-tetrazólio (MTT) foi obtido da empresa Invitrogen, EUA e o composto Benzofurano da Sigma-Aldrich, EUA. O óleo de açaí foi produzido e adquirido pela empresa Beraca, SP-Brasil, lote L956320. O kit Anexina-V e iodeto de propídio foram obtidos da Invitrogen – Molecular Probes, EUA.

4.2 Efeito da Variação da Proporção de Tensoativo Polisorbato 80 sobre a Formulação da Nanoemulsão

Durante o processo de formulação da nanoemulsão, foram realizados vários testes onde variou-se a concentração do surfactante Tween-80 e o número de ciclos de inversão de fase por temperatura. Estes testes tiveram como objetivo avaliar a influência destas variáveis no tamanho das nanogotículas bem como a diferença na viscosidade da formulação, a fim de se obter uma formulação com melhores características para

aplicação biológica *in vitro* e *in vivo*. Assim, foram utilizadas as seguintes proporções de óleo:tween 80 - 1:3; 1:3,5; 1:4; 1:4,5 e 1:5.

4.2.3 Formulação da Nanoemulsão (nanoA)

O óleo de açaí, de origem nacional foi obtido através da empresa Beraca, cujo certificado de análise foi realizado pela empresa Opção Fenix. Lote: L956320, índice de acidez máximo de 3%. O óleo foi armazenado segundo as recomendações do fabricante em temperatura constante e em local arejado. Durante o período de armazenamento não foi observado nenhuma alteração na cor do óleo, indicando que permaneceu estável. Este óleo foi incorporado à nano A.

Analisando-se os resultados obtidos com as várias proporções de tensoativo descrito no tópico anterior, foi adotado a proporção de 1:4,5 (óleo:tween-80) por atender melhor as características apropriadas para uso como diâmetro hidrodinâmico e viscosidade adequada.

A nanoemulsão foi formulada pesando-se 9 g de tween-80 e 2 g de óleo de açaí em béquer. Após a pesagem, os líquidos foram transferidos para um agitador magnético por cinco minutos com leve aquecimento.

Logo após os cinco minutos, adicionou-se 40 ml de água nanopura sob agitação até que a temperatura de 85° C fosse atingida. Neste ponto ocorre a inversão de fase, onde a fase dispersa passa a ser a água e a fase contínua o óleo (A/O). Em seguida, a solução foi resfriada rapidamente pela adição de água a 7° até aproximadamente 40° C para que fosse completado um ciclo de inversão de fase, sendo utilizado apenas um ciclo para esta formulação. Neste ponto, a fase dispersa passa a ser o óleo e a fase contínua a água (O/A). A concentração final de óleo obtida na nanoemulsão foi de 50 mg/ml.

4.3 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DA NANOEMULSÃO

4.3.1 Caracterização Morfológica por Análise de Microscopia Eletrônica de Transmissão

A morfologia e o tamanho da população de nanogotículas presentes na nanoemulsão foram determinadas mediante análises de microscopia eletrônica de transmissão em microscópio Jeol 1011C com voltagem de 80 kV. Para isso, foram

utilizados vários contrastantes, como o acetato de uranila (0,5% e 1%), ósmio líquido (filtrado e não filtrado) e vapor de ósmio por 5, 10, 15 e 20 minutos de exposição. Ao final da experimentação, foi obtido boas imagens apenas com a utilização do ácido fosfotungstico (PTA) a 2%.

Assim, colocou-se 2 μ l de amostra na concentração de 0,5mg/ml sob tela de cobre de 300 mesh recoberta com formivar e, em seguida, foi adicionado 2 μ l de PTA a 2% sobre a gota para fixação e contrastação da mesma. O material foi mantido em placa de petri semi-aberta por 24h para que ocorresse a secagem da solução sob proteção da luz. Em seguida, foram realizadas as análises de microscopia eletrônica, as imagens foram obtidas por meio de câmera e do software Gatan Digital Micrograph TM 3.11.

4.3.2 Determinação dos valores coloidais da NanoA

Com a finalidade de avaliar as variáveis coloidais tais como, o diâmetro hidrodinâmico, o potencial zeta e o índice de polidispersão, a nanoemulsão foi diluída em tampão fosfato salino (PBS) à concentração final de 0,5 mg/ml e foi utilizado o aparelho de dispersão dinâmica da luz, Zetasizer (Nano ZS90, Malvern EUA). As medidas de distribuição de tamanho das nanoemulsões e a carga de superfície existente entre a superfície das partículas e o dispersante - potencial zeta – são obtidas pela medida do movimento Browniano das partículas suspensas em água por espalhamento dinâmico de luz (DLS) e pela movimentação das partículas quando aplicado um campo elétrico, respectivamente.

4.4 AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES FOTOFÍSICAS

4.4.1 Espectros de Absorbância e Fluorescência

Para que fosse obtido os espectros de absorbância e fluorescência, fez-se diluição seriada de 200 μ l da nanoemulsão em água nanopura a partir da concentração inicial de 50mg/ml até 0.78mg/ml. Assim, seguiu-se com as leituras em espectrofotômetro SpectraMax M2, utilizando-se placas de 96 poços. Para leitura da absorbância foi adotada a faixa de comprimento de onda de 350 a 750 nm com

resolução de 2nm. Para a fluorescência, foi utilizado excitação em 350 nm e para emissão a faixa equivalente de 360 a 750 nm com semelhante resolução.

Os resultados obtidos foram expressos como fluorescência normalizada, que consiste na divisão matemática das unidades arbitrárias de fluorescência (U.A.) obtidas pelo maior valor de fluorescência alcançado dentre eles.

4.5 AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES FOTOQUÍMICAS

4.5.1 Capacidade de geração de Oxigênio Singlete pelo Método de Decaimento do Benzofurano

Com a finalidade de avaliar a capacidade de geração de oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) por parte do óleo de açaí quando irradiado com LED, utilizou-se o método de quantificação indireta por decaimento de benzofurano. À medida que o oxigênio singlete é produzido ocorre reação com o benzofurano, consumindo-o e, assim, a absorbância do benzofurano, que é característica em 410 nm, decai até extinguir-se por completo. Dessa forma, a produção de oxigênio singlete pode ser mensurada indiretamente através do decaimento da absorbância do benzofurano. Sendo detectado e quantificado em espectrofotômetro.

Para essa finalidade, seguiu-se o seguinte protocolo:

5 μl da solução de benzofurano cuja concentração de uso foi de 1,5 mg/ml diluído em etanol foi adicionado à 700 μl da nanoemulsão. Em seguida, transferiu-se a mistura para cubeta de quartzo e foi realizada a leitura da absorbância em espectrofotômetro no comprimento de onda de 410 nm.

Logo após, a solução foi irradiada na própria cubeta com LED em comprimento de onda de 670 nm a 1 cm de distância da cubeta. A capacidade de geração de $^1\text{O}_2$ por parte do fotossensibilizante foi avaliada mediante decaimento da absorbância medida em 410 nm antes e após a irradiação com LED.

O fotossensibilizante foi irradiado com diferentes doses de energia, variando-se apenas o tempo de irradiação, pois a distância entre o LED e a cubeta de quartzo foi mantida constante e igual a 1cm. A amostra foi irradiada por 30 segundos e a absorbância lida. Foi repetido este ciclo de irradiação e leitura até a extinção da absorbância da solução, que ocorreu em 15 minutos de incidência da luz.

A geração de $^1\text{O}_2$ foi normalizada a partir das unidades arbitrárias de absorvância, onde detectou-se o decaimento da absorvância do benzofurano em relação ao valor de absorvância da solução antes da exposição à irradiação com LED.

4.5.2 Avaliação da Estabilidade Coloidal e Fotodinâmica da Nanoemulsão

Para a avaliação da estabilidade coloidal da nanoemulsão, a mesma foi submetida a diferentes condições de armazenamento por um período de até 180 dias contados a partir do primeiro dia após a formulação.

As alíquotas foram mantidas à temperatura ambiente, à 7 °C (geladeira), à 50°C (estufa) e submetidas a 1 ciclo e a vários ciclos de congelamento e descongelamento (- 20°C).

Nos tempos 0 (nanoA recém formulada), 3, 7, 15, 22, 30, 45, 60, 75, 90 e posteriormente 180 dias foram realizadas análises no aparelho Zetasizer, onde avaliou-se as seguintes características: diâmetro hidrodinâmico; índice de polidispersão (PDI); potencial zeta e presença de uma ou mais populações de nanogotículas.

4.6 AVALIAÇÃO *IN VITRO*

4.6.1 Análise do perfil de incorporação da nanoA pelas células A431

Para traçar o perfil de incorporação das nanogotículas pelas células tumorais sob diferentes tempos de incubação com a nano A, foram plaqueadas 10^4 células da linhagem A431 em placa de 96 poços. Após 24h, foram incubadas em meio completo sob diferentes concentrações de nano A, a partir de uma diluição seriada, de 10 mg/ml a 0,156 mg/ml de nano A.

As células foram expostas por 15, 30, 60 e 120 minutos de incubação com a nanoemulsão sob as mesmas concentrações. Após esses tempos, foram lavadas duas vezes com PBS e foi acrescentado 200 µl de DMSO a cada poço para lise das células e liberação da nano A associada. Em seguida, foi realizada a leitura da fluorescência no comprimento de onda de 670nm, comprimento de onda típico da nanoemulsão.

4.6.2 Análise Do Tempo De Incorporação Da Nano A por Microscopia Confocal

Para visualização da localização subcelular da nano A e confirmação do melhor tempo de incorporação da mesma pelas linhagens celulares A431 e Detroit, foi realizado por microscopia confocal (Leica, TCS SP5, Alemanha).

Para tal finalidade, foram plaqueadas 1×10^5 células por poço em placa de 12 poços adicionando-se previamente lamínula autoclavada em cada poço. Decorrido o período de 24h após o plaqueamento das duas linhagens, A431 e Detroit, ambas foram incubadas com a concentração de 2,5 mg/ml de nanoA diluída em meio de cultura por 15,30, 60 e 120 minutos.

Transcorrido esses tempos, os poços foram lavados por 2 vezes com PBS a 37°C e em seguida, incubados com Hoechst 33442 (Molecular Probes, Invitrogen EUA) na concentração de 0,1 µg/ml a 37°C por quinze minutos no volume final de 200 µl/poço.

Após a incubação, as células foram lavadas com 1ml de PBS por 2 vezes e, em seguida foram fixadas em 500 µl de paraformaldeído a 4% por 15 minutos a 37°C. Logo após a fixação, as células foram lavadas por duas vezes em PBS e em sequência, as lâminas foram montadas colocando-se a lamínula sobre a lâmina diretamente e vedando-se as extremidades.

Foi realizado o controle das células incubadas somente com a nano A bem como o controle só com o marcador de núcleo, Hoechst. O experimento foi realizado em duplicata. As análises foram realizadas utilizando-se os comprimentos de onda de excitação e emissão para o Hoechst em 405 – 458 nm e para a nanoemulsão em 350 nm e 670 nm, respectivamente.

4.6.3 Análise da toxicidade no escuro

O ensaio de MTT (brometo de 3 (4,5 dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil-tetrazólio), é uma avaliação da citotoxicidade por um método colorimétrico que quantifica a redução do reagente MTT em um composto conhecido como formazan, resultado da ação de desidrogenases mitocondriais. A presença destas desidrogenases ativas é um indicativo de viabilidade celular [106].

Para a realização desse ensaio, 10^4 células da linhagem A431 e Detroit foram semeadas em quadruplicata em placas de 96 poços e incubadas em meio de

cultura DMEM e MEM, respectivamente, por 24 horas. Após esse período, foi adicionado o fotossensibilizante diluído em meio de cultura em concentrações que variaram de 10 mg/ml a 0,156 mg/ml. Em sequência, as placas foram incubadas por 24h a fim de avaliar os efeitos causados mediante a exposição prolongada a nano A. Além deste tempo, as placas também foram incubadas por 15 min, 30 min, 60 min e 120 min para que fosse obtido o valor da concentração efetiva (EC) para matar 50 e 30 % das células (EC 50 e EC 30) para aplicação posterior da TFD. Os testes foram repetidos três vezes em dias distintos.

Após esses períodos de incubação, o fármaco foi removido, os poços lavados com PBS e adicionado meio de cultura por mais 24h. Após esta última etapa, foi adicionado solução de MTT (5 mg/mL, Invitrogen, EUA) e meio de cultura na proporção de 1:10. As células foram incubadas à 37°C por três horas. Em seguida, a solução contendo MTT foi removida e então, foram adicionados 200 µL de DMSO (Dimetilsulfóxido, Sigma-Aldrich, EUA) para a solubilização dos cristais de formazan. A análise de viabilidade em cada poço foi realizada por meio da leitura de absorbância em comprimento de onda de 595 nm em espectrofotômetro. Os dados foram analisados e plotados em gráfico XY e o valor da CL50 e da CL30 foram determinadas mediante cálculo no programa estatístico GraphPad Prism 5.0.

4.6.4 Viabilidade celular após aplicação de TFD mediante ensaio de MTT

As células foram plaqueadas na mesma concentração utilizada para os testes no escuro, descritos acima. Transcorridos 24h após o plaqueamento, as células foram incubadas com a nanoemulsão na concentração equivalente a CL50 e CL30 por quinze minutos. Decorrido esse período, o sobrenadante foi removido e os poços lavados com PBS. A placa foi irradiada em PBS por 10 e 20 minutos a uma distância de 5 cm da fonte luminosa, o equivalente a 150 mW de potência e a 4,2 J/cm². O LED utilizado possui comprimento de onda de 670 nm. Após a exposição, as células foram mantidas sob condições de cultivo por mais 24h protegidas da luz e, então, a viabilidade das mesmas foi mensurada por ensaio de MTT em espectrofotômetro, como descrito no item 4.6.3.

4.7 EXPERIMENTAÇÃO *IN VIVO*

4.7.1 Animais

As análises referentes aos efeitos anticâncer da TFD utilizando a nano A como fotossensibilizante foi avaliada também por estudos *in vivo*. Foram utilizados camundongos Nude machos entre 12 a 14 semanas, adquiridos do biotério da Universidade de São Paulo (USP). Estes, por sua vez, foram mantidos em alojamento com temperatura controlada de 23 °C e ciclo claro/escuro automatizado de 12h com filtragem de ar nas caixas. Foi fornecido água e ração *ad libitum*. Todo o material (gaiolas, garrafas, água) foram autoclavados previamente antes do uso e a utilização destes camundongos aprovado pelo Comitê de Ética.

4.7.2 Indução Tumoral

A indução tumoral foi antecedida por anestesia com ketamina e xilasina na concentração de 15mg/Kg e 5mg/Kg respectivamente, no volume final de 80 µl/animal. Após aplicação do anestésico, foi realizada a indução ortotópica por injeção intradérmica na região da cabeça do animal de $0,5 \times 10^6$ células da linhagem A431 em meio de cultura. O modelo representa grande destaque e pioneirismo pois trata-se de um modelo ortotópico heterólogo, não tendo sido descrito ainda na literatura para este tipo de câncer. Os animais e os tumores foram monitorados por análise clínica, com pesagem e medição por paquímetro de alta precisão periodicamente. Decorrido quatro dias após a indução, os animais foram tratados com três sessões de TFD.

Os animais foram subdivididos em 4 grupos experimentais com n=6 segundo a tabela 1. O primeiro grupo foi o controle positivo, representado pelos animais com tumor sem tratamento. Não foi realizado controle negativo (animais sem tumor e sem tratamento) devido à dificuldade de obtenção desta linhagem de camundongos, não sendo possível a aquisição de um número tão alto de camundongos.

Tabela 1 – Grupos experimentais utilizados para avaliar a eficácia da Terapia Fotodinâmica em camundongos nude no tratamento de câncer de pele não melanoma.

Grupos Experimentais	Indução Tumoral	Tratamentos	
		Nano A	LED
G1	+	-	-
G2	+	+	-
G3	+	+	+
G4	+	-	+

Protocolo para Aplicação da Terapia Fotodinâmica

Após o quarto dia, foi realizado o tratamento por Terapia Fotodinâmica. Para isto, após a anestesia dos camundongos com 140 µl de anestésico, 60 µl de fármaco fotossensibilizante na concentração de 50 mg/ml com pH corrigido para 7,2 foi injetado por via intratumoral. Em sequência, o tumor foi irradiado por 20 minutos utilizando-se LED como fonte de luz, com incidência perpendicular à superfície tecidual a uma distância de 5 cm equivalente a potência de 150 mW com comprimento de onda de 660 nm (figura 6). Foi aplicado três sessões de TFD com intervalos de 24 horas entre cada uma.

Os animais foram acompanhados e avaliados clinicamente todos os dias, com mensuração do peso corporal e medição das dimensões tumorais para posterior cálculo do volume tumoral. Decorridos 21 dias após o tratamento, os animais foram eutanasiados e os órgãos juntamente com o sangue foram coletados para realização de análise histopatológica e mensuração das enzimas hepáticas e renais.



Figura 6: Montagem para aplicação da TFD em camundongos nude com LED como fonte luminosa. Irradiação tumoral de maneira perpendicular em carcinoma espinocelular tratado com óleo de açaí nanoemulsionado. Os olhos do animal foram protegidos da luz. Seta indicando o LED com irradiação perpendicular

O volume tumoral foi avaliado com o objetivo de comparar a eficiência da terapia fotodinâmica em relação aos demais grupos experimentais. Após medições periódicas com paquímetro digital de alta precisão, o volume foi determinado segundo a fórmula: $(\text{Comprimento}) \times (\text{Largura})^2 \times 0,5$; previamente descrita na literatura [66].

4.7.3 Análise Histopatológica e Bioquímica

Transcorridos 21 dias, os animais foram eutanasiados e o sangue coletado para quantificação de enzimas que predizem a respeito das funções hepáticas e renais: Transaminase Pirúrvica (TGP), Transaminase Oxalacética (TGO), Fosfatase alcalina (FA), Creatinina e Uréia, estas análises foram realizadas no laboratório de análises clínicas Sabin, Brasília.

O fígado, o baço, os rins, o pulmão, os linfonodos cervicais e o tumor foram coletados para análise histopatológica. Os órgãos foram dissecados e fixados em formaldeído 10% tamponado por 24h a temperatura ambiente. Após o tempo de fixação, os órgãos foram submetidos ao processamento histológico em equipamento Histo-Tec DM-20, com banhos em álcool 70%, 80%, 90%, 100%, 100%, 100%, xilol 1, xilol 2 e xilol 3, parafina 1, parafina 2 e parafina 3 com 1h de duração por banho. Em sequencia, os tecidos foram colocados em blocos com parafina e os cortes histológicos realizados em micrótomo. As lâminas montadas utilizando-se verniz.

A coloração das lâminas foi realizada com Hematoxilina e Eosina (H&E) e as análises realizadas em microscópio óptico (Zeiss Axioskop). As fotomicrografias

foram capturadas com programa computacional Motic Image Plus 2.0. Foram avaliadas as seguintes características morfológicas: presença de células neoplásicas, presença de necrose tumoral e de infiltrado inflamatório, presença de edema, dano vascular e hemorragia.

4.8 ANALISE ESTATÍSTICA

Após a coleta e tratamento dos dados, a análise estatística foi realizada em software GraphPad Prism versão 5.0, onde optou-se pela realização de teste paramétrico de variância ANOVA, seguido do pós-teste estatístico de Tukey para os experimentos *in vitro*. O índice de significância dos experimentos considerado foi $p < 0,05$. Para as análises da regressão tumoral *in vivo*, optou-se pelo teste do Qui² com o valor considerado de $p < 0,05$.

RESULTADOS

5.1 CARACTERIZAÇÃO

5.1.2 Efeito da Variação da Proporção de Tensoativo Tween-80 sobre as Propriedades da Formulação da Nanoemulsão

Utilizou-se as proporções (m/m) de 1:3; 1:3 $\frac{1}{2}$, 1:4, 1:4 $\frac{1}{2}$ e 1:5 (óleo:Tween 80) com até quatro ciclos de inversão de fase (Figuras 7,8 e 9). De acordo com o aumento na concentração de tensoativo, houve alterações no diâmetro hidrodinâmico e no índice de polidispersão (PDI). Desta maneira, os gráficos abaixo representam essas alterações. As figuras 7, 8, 9 e 11 referente a várias proporções de tween-80 e a vários ciclos de inversão de fase bem como a distribuição Gaussiana de tamanho constam também no exame de qualificação da doutoranda Victoria Monge Fuentes.

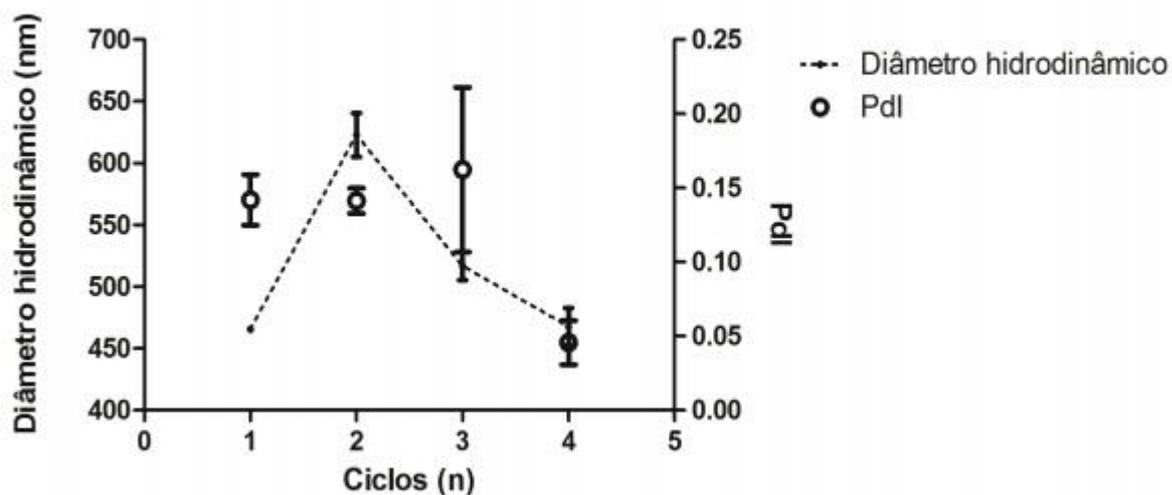


Figura 7: Diâmetro hidrodinâmico e índice de polidispersão (PDI) da nanoemulsão com proporção de 1:3 (óleo de açaf: tensoativo) após quatro ciclos de inversões de fase.

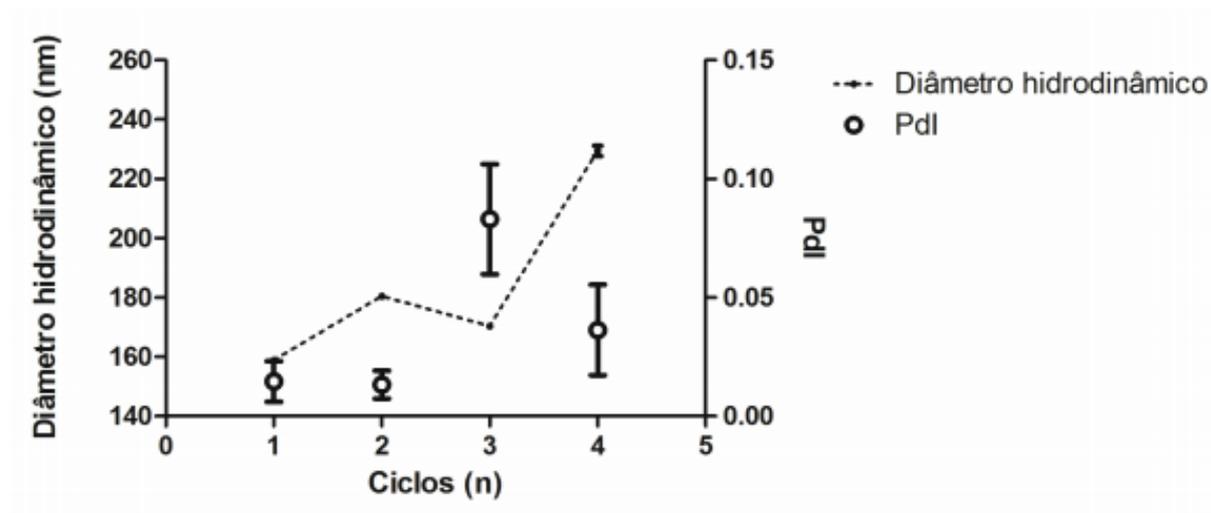


Figura 8: Diâmetro hidrodinâmico e índice de polidispersão (PDI) da nanoemulsão com proporção de 1:4 (óleo de açaí: tensoativo) após quatro ciclos de inversões de fase.

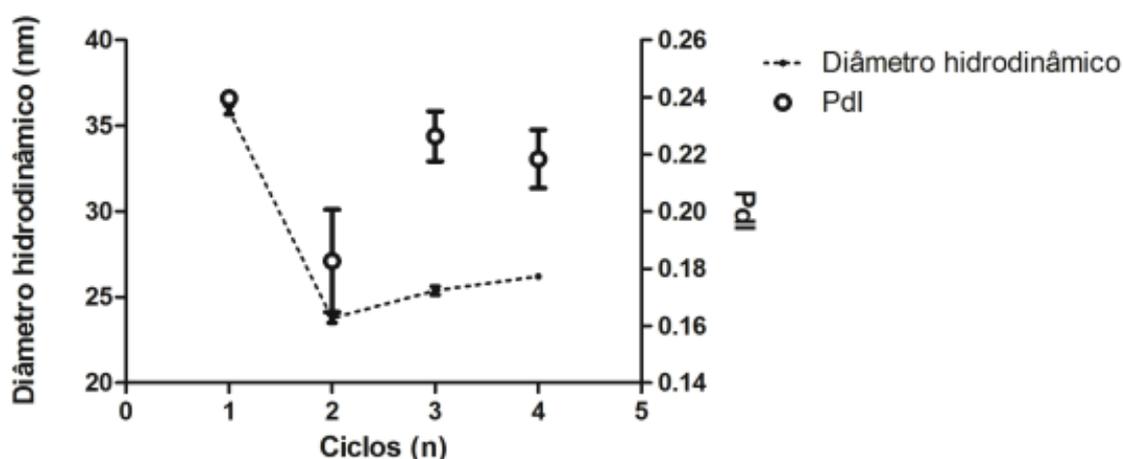


Figura 9: Diâmetro hidrodinâmico e índice de polidispersão (PDI) da nanoemulsão com proporção de 1:5 (óleo de açaí: tensoativo) após quatro ciclos de inversões de fase.

De acordo com os resultados obtidos, concluiu-se que o aumento na quantidade de surfactante provoca diminuição no diâmetro hidrodinâmico das nanogótulas e aumento no valor do PDI, exceto na proporção de 1:3 para 1:4. Porém a quantidade de ciclos de inversão de fase causa pouca alteração para essa formulação. Desta maneira, para alcançar o melhor valor de diâmetro hidrodinâmico e PDI para assim, obter-se os melhores efeitos biológicos, optou-se por usar a proporção de 1:4,5 (óleo:surfactante) com apenas um ciclo de inversão de fase.

5.1.3 Caracterização Morfológica por Análise de Microscopia Eletrônica de Transmissão

Para análise da morfologia das nanogotículas e determinação do tamanho médio da população bem como da dispersividade da mesma, foi realizado microscopia eletrônica de transmissão, segundo o protocolo descrito anteriormente. Frente a estas eletronicografias, a nanoformulação mostrou tratar-se de uma população monodispersa e de morfologia esférica.

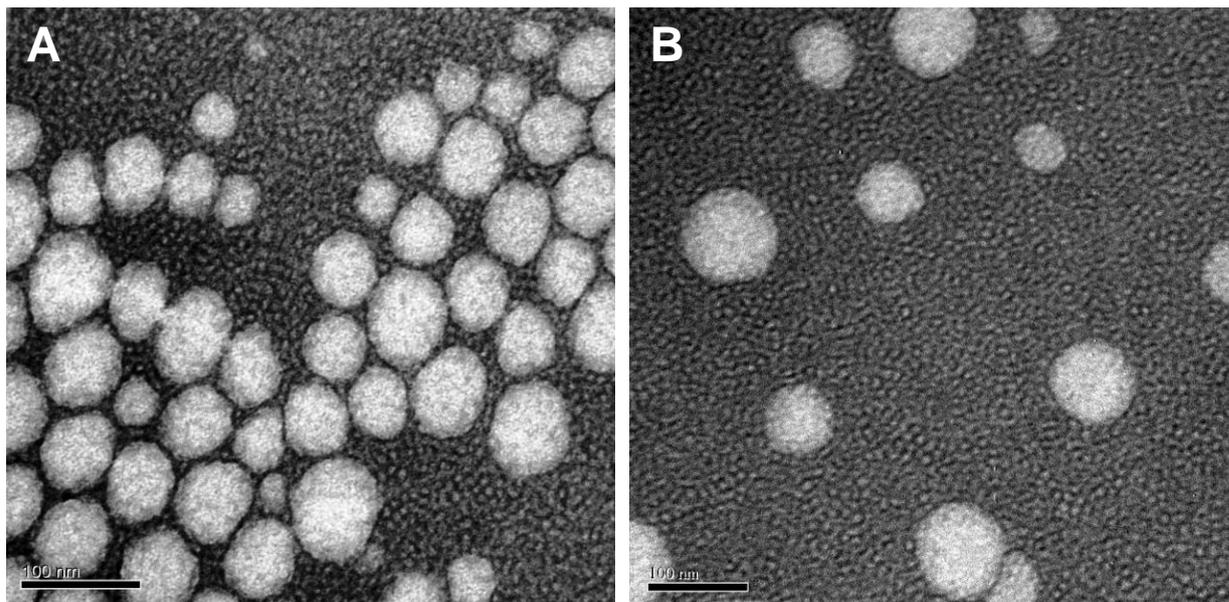


Figura10: Eletronmicrografia de transmissão da nanoemulsão de óleo de açaí fixada e contrastada com ácido fosfotungstico (PTA 2%). População monodispersa de nanogotículas com morfologia esférica. Aumento de 250 mil vezes.

As nanogotículas foram contadas e medidas através da utilização do programa de morfometria (Image Pro-Plus 5.1, Media Cybernetics, Bethesda, MD, USA). Após contagem e medição das nanogotículas, os valores obtidos foram distribuídos de acordo com sua frequência em um histograma cujo diâmetro médio foi de 74 nm.

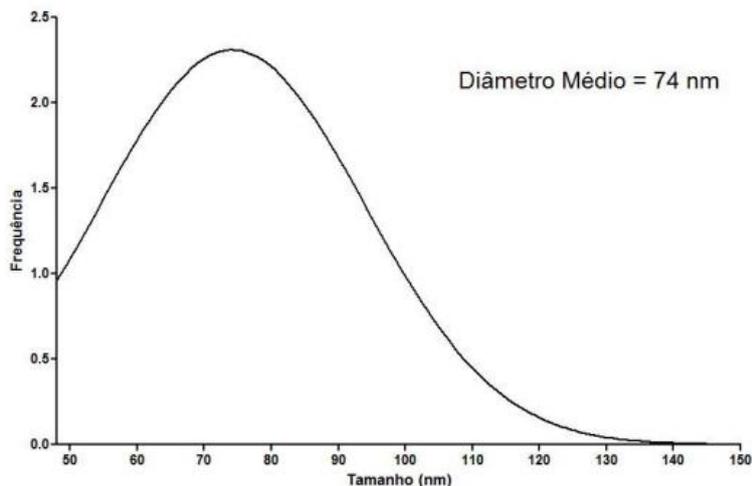


Figura 11: Distribuição gaussiana da frequência de diâmetros das nanotículas da nanoA.

5.1.4 Determinação dos valores coloidais da NanoA

As variáveis coloidais foram obtidas através de leituras em aparelho de dispersão de luz dinâmica. Desta forma, obteve-se diâmetro hidrodinâmico de 117 nm, potencial zeta de -0.536 mV em pH de 7,2 diluído em PBS índice de polidispersividade (PDI) de 0,144 e apenas uma população presente nas amostras analisadas, sendo comprovado por meio de mais de uma técnica tratar-se de uma população monodispersa (Figura 12).

Na figura 12 observa-se a distribuição do diâmetro hidrodinâmico das nanotículas em estudo. O diâmetro hidrodinâmico aproxima-se do valor obtido por microscopia eletrônica, porém o fato de ser um pouco mais elevado deve-se provavelmente à camada de água de solvatação ao redor das nanotículas.

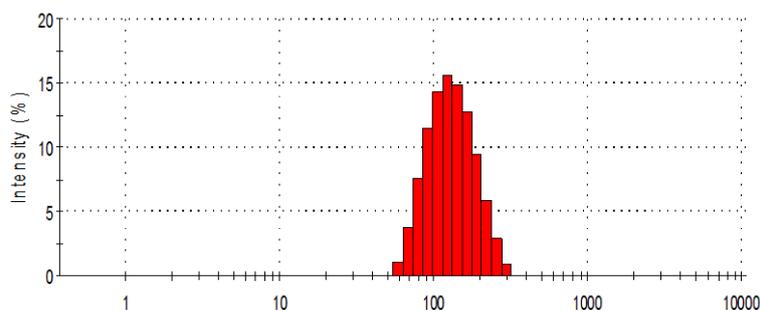


Figura 12: Distribuição dos valores de diâmetro hidrodinâmico da nanoemulsão de açaí. As colunas representam a média para três leituras realizadas em uma mesma amostra. Valores apresentados em nanômetros.

5.1.5 Avaliação da Estabilidade da Nanoemulsão

Analisou-se os valores coloidais da nanoemulsão submetidas à diferentes situações de armazenamento, como temperatura ambiente, a 7 °C, congelamento (-20°C), vários ciclos de congelamento/descongelamento e a 50°C ao longo de 180 dias; concluiu-se que, apenas as amostras mantidas a 7 °C e em temperatura ambiente apresentaram estabilidade e PDI abaixo de 0,25 (figura 13).

Assim, apenas os dados referentes a essas duas condições de armazenamento foram representadas nos gráficos abaixo. As alíquotas mantidas à -20°C e a 50°C não foram estáveis, muito provavelmente devido à perda da interação da água e do óleo com o surfactante, apresentando PDI entre 0,53 e 0,98 com até 3 populações presentes com diâmetros de até 1000 nm.

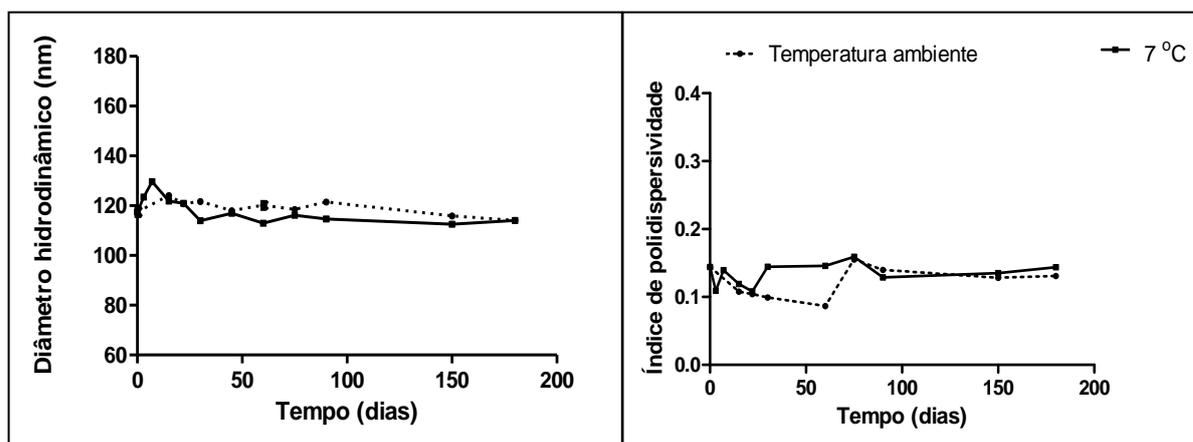


Figura 13: Avaliação da estabilidade coloidal da NanoA no tempo 0 equivalente à nano recém-formulada até 180 dias de armazenamento. Dados referentes as alíquotas mantidas à temperatura ambiente e em geladeira (7°C) onde foram mensurados os valores em relação ao índice de polidispersividade e diâmetro hidrodinâmico.

5.1.6 Avaliação das Propriedades Fotofísicas: Espectros de Absorbância e Fluorescência

Após leituras do espectro de absorbância e fluorescência com comprimento de onda de excitação em 350 nm e emissão de 360 nm a 750 nm, concluiu-se que a nanoemulsão absorve em 660 nm e fluoresce em 660, coincidindo com a região do vermelho, sendo completamente favorável para a aplicação tecidual.

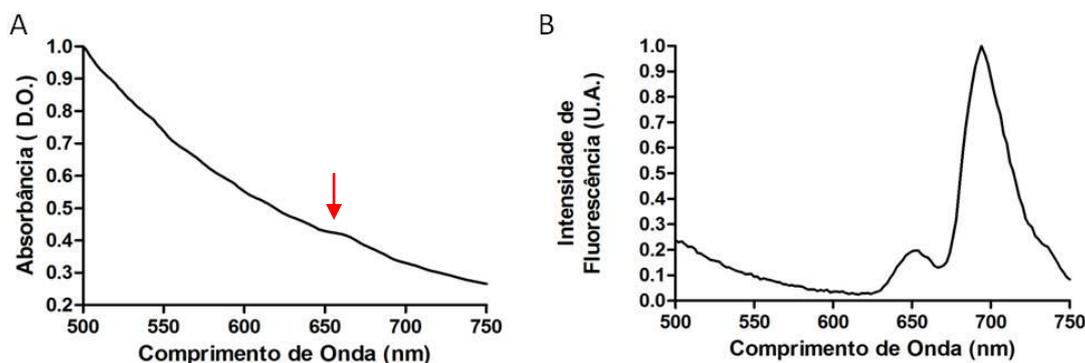


Figura 14: Espectro de absorbância da nanoemulsão em **A**, com pico sutil em torno de 660 nm, representado pela seta. Em **B**, espectro de fluorescência da nanoemulsão, com pico de emissão em torno de 660 nm. O maior pico refere-se a um artefato gerado pelo próprio equipamento. Diluição seriada da amostra de 50 mg/ml até 0,78 mg/ml. Comprimento de onda de excitação igual a 350 nm e espectro de emissão de 360 a 750 nm, com resolução de 2 nm. Nos gráficos A e B, os dados foram normalizados e apresentados na forma de densidade óptica (D.O.) e unidade arbitrária de fluorescência (U.A.).

5.1.7 Avaliação das propriedades Fotoquímicas: Geração Espécies Reativas de Oxigênio

A fim de avaliar o potencial da nanoemulsão em gerar ROS, foi realizado o teste de decaimento por benzofurano, onde é detectado o declínio da absorbância do composto à medida que o mesmo é consumido ao reagir com as espécies reativas de oxigênio que são produzidas. Como controle, foi avaliado uma solução apenas com surfactante na mesma concentração encontrada na nanoemulsão, porém o resultado não foi representativo, não sendo então, apresentado no gráfico.

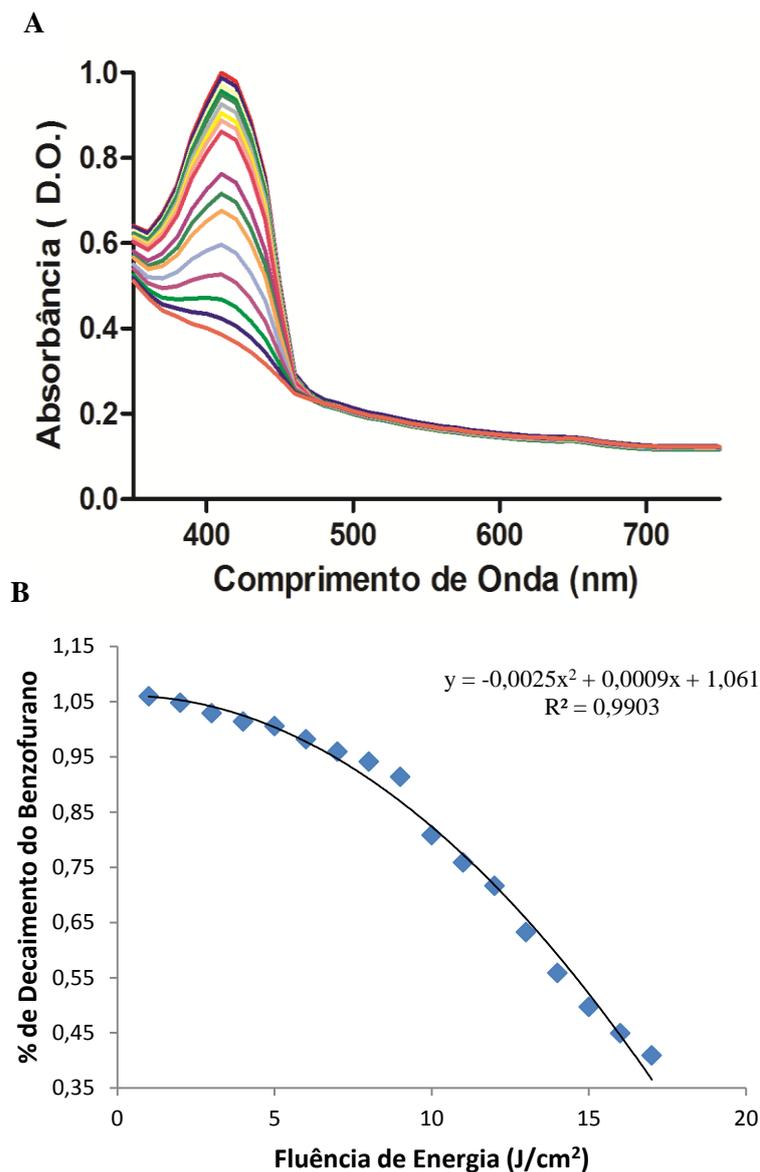


Figura 15: No gráfico **A**, decaimento do benzofurano na presença da nanoemulsão em várias concentrações sob diferentes densidades de energia aplicadas. Solução irradiada com LED por até 15 minutos com potência de 150 mW. Dados normalizados e apresentados sob densidade óptica (D.O.). Em **B** representa a taxa percentual de decaimento da absorbância da solução de benzofurano por fluência energética. Solução irradiada com LED em 660 nm por até 15 minutos com potência de 150 mW. Valor de $R^2 = 0,99$

Segundo os gráficos, houve considerável produção de oxigênio singlete devido à presença do óleo contido na nanoemulsão. Confirmado pelo declínio da absorbância do composto benzofurano sob diferentes densidades de energia aplicadas, representados tanto no gráfico A quanto no B, inferindo-se assim, a produção de oxigênio singlete. Os dados foram calculados em fórmula matemática cujo valor de R^2 obtido foi de 0.9903 e representados no gráfico acima.

5.1.8 Espectro de Emissão do LED

O gráfico abaixo refere-se ao espectro de emissão do comprimento de onda emitido pelo Diodo Emissor de Luz (LED) utilizado neste trabalho. A maior intensidade ocorre em torno de 660 nm, correspondendo à faixa de absorção dos tecidos biológicos, favorecendo o uso do LED.

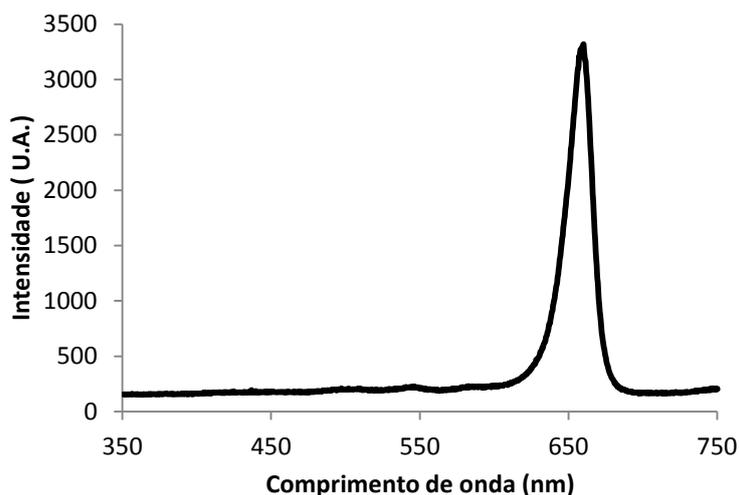


Figura 16: Espectro do comprimento de onda emitido pelo Diodo Emissor de Luz –LED (nm). O eixo Y corresponde à intensidade emitida, valores expressos em unidades arbitrárias (U.A.). Pico máximo em 660 nm.

5.2 EXPERIMENTOS *IN VITRO*

5.2.1 Análise do perfil de incorporação da nano A pelas células A431

Com o objetivo de delinear qual o tempo necessário para as células A431 incorporarem a nanoemulsão, as mesmas foram incubadas por 15, 30, 60 minutos sob diferentes concentrações de nano A variando-se de 10 mg/ml a 0,156 mg/ml diluídas em meio de cultura (Figura 17).

Após detecção de fluorescência em espectrofotômetro, conclui-se que em concentrações mais altas, apenas 15 minutos de incubação com a nano A são suficientes para que a mesma seja incorporada às células. À medida que decorre o tempo, a incorporação decresce. No caso de concentrações menores, é necessário um tempo maior para que a nanoemulsão seja incorporada inicialmente, ocorrendo maior pico em 30 minutos. Em sequência, a intensidade de fluorescência permanece quase que similar ao longo do tempo analisado, independentemente da concentração.

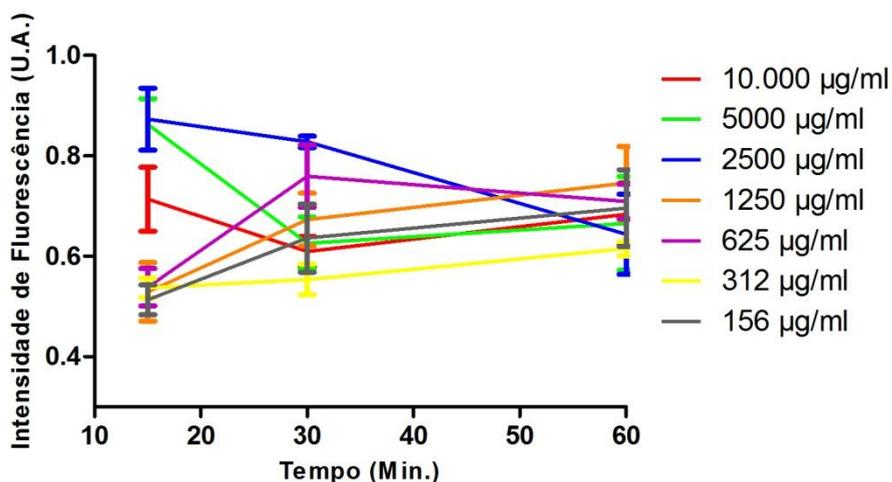


Figura 17: Perfil de incorporação da nano A em células A431. Variação na intensidade de fluorescência sob diferentes tempos de incubação e diferentes concentrações de nanoemulsão utilizada em cultura células A431. Os tempos estudados foram 15 minutos, 30 minutos e 1 hora de incubação. Variou-se a concentração da nano A de 10.000 a 156 µg/ml. Os dados referentes à intensidade de fluorescência foram normalizados e expressos em unidades arbitrárias de fluorescência (U.A.). Houve diferença estatística significativa entre a concentração de 10 000 µg/ml e 2500 µg/ml no tempo equivalente à 30 minutos.

5.2.2 Análise Do Tempo De Incorporação Da Nano A por Microscopia Confocal

Para análise morfológica da incorporação da nanoemulsão e da localização subcelular da mesma, bem como para corroborar com as medições realizadas em espectrofotômetro, foi realizado microscopia confocal.

Após realização e análise das micrografias realizadas com as linhagens Detroit e A431, confirmou-se mais uma vez que 15 minutos de incubação são suficientes para que a nano A seja incorporada pelas células na concentração de 2,5 mg/ml, representando o melhor tempo de incorporação. As células A431 incorporam mais nano A no mesmo tempo em relação à linhagem não neoplásica. Também é possível inferir que a maior quantidade de nanoemulsão visualizada nas células encontra-se sublocalizada no citoplasma.

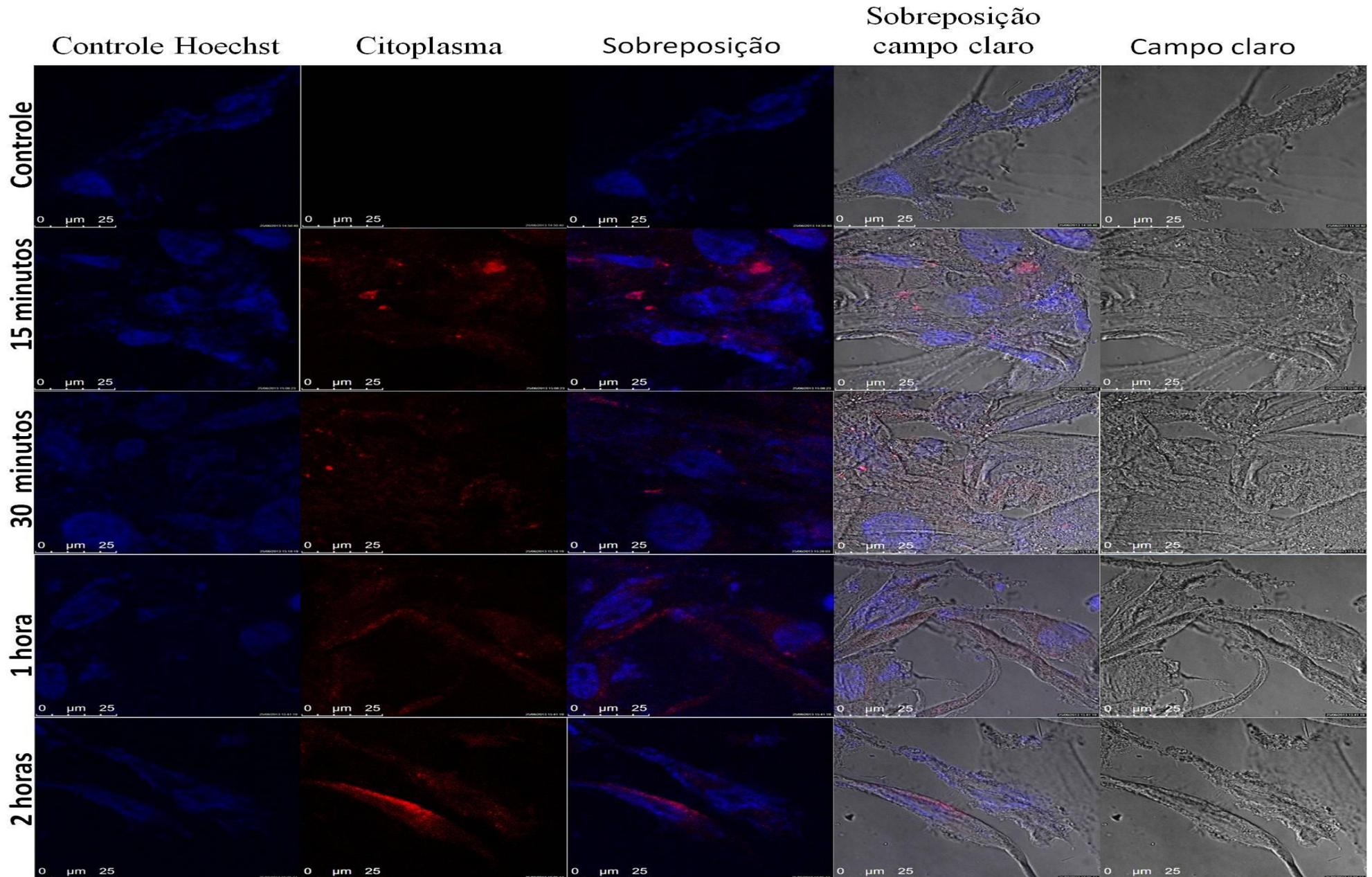


Figura 18: Fotos obtidas por microscopia confocal da linhagem Detroit com 15, 30, 60 e 120 minutos de incubação com a nanoemulsão na concentração de 2,5mg/ml. Núcleo marcado com Hoechst na concentração de 0,1µg/ml.

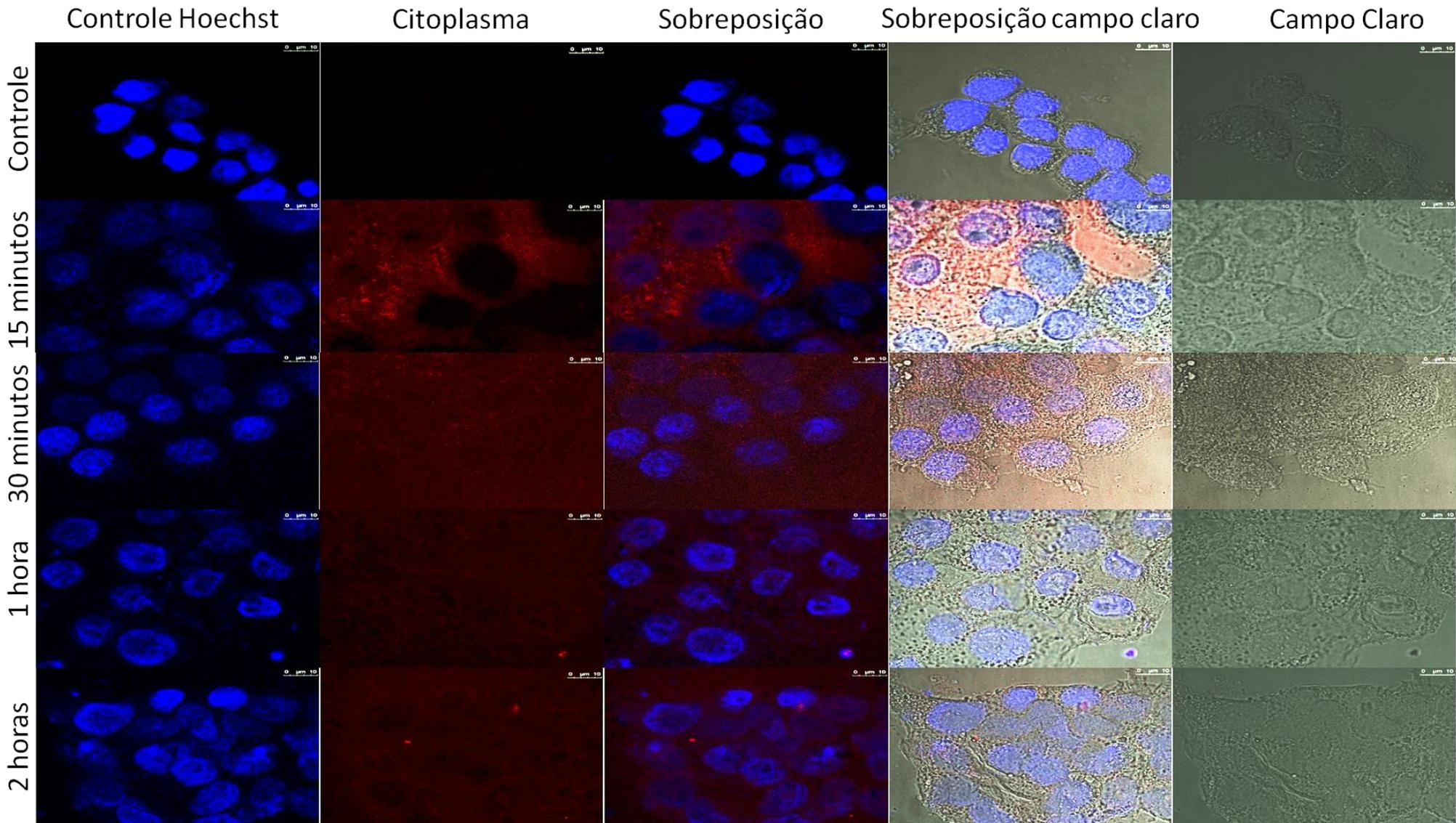
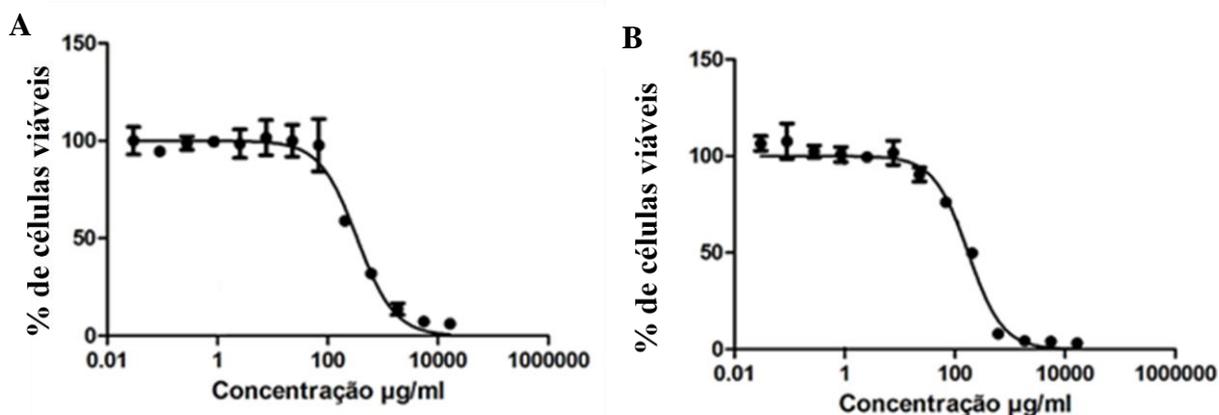


Figura 19: Fotos obtidas por microscopia confocal da linhagem neoplásica A431 com 15, 30, 60 e 120 minutos de incubação com a nanoemulsão na concentração de 2,5mg/ml. Núcleo marcado com Hoechst na concentração de 0,1µg/ml.

5.2.3 Análise da citotoxicidade no escuro sob tempo prolongado de exposição ao fármaco fotossensibilizante pelo ensaio de MTT

Com o objetivo de verificar qual o efeito sobre a viabilidade celular da cultura quando incubada por um período prolongado de tempo com a nanoemulsão, as linhagens A431 e Detroit permaneceram em contato por 24h de exposição à nano A. Em seguida, avaliou-se a viabilidade celular por leitura de MTT.

Com este tempo de incubação, houve redução na viabilidade celular de maneira considerável na maior concentração utilizada (10 mg/ml) com praticamente 100% de morte. Observando-se os gráficos A e B, para haver redução da viabilidade em 50%, a concentração requerida é próxima para as duas linhagens estudadas. Neste tempo não foi realizado controle apenas com T80.



Com a realização destes testes, calculou-se os valores de EC50 e EC30 referentes ao tempo de 15 minutos de incubação para em sequência ser realizado o protocolo de TFD, já que na concentração referente à EC10 após aplicar a TFD não houve citotoxicidade, permanecendo-se igual ao controle. Assim, escolheu-se então, uma concentração mais alta. Para a linhagem Detroit os valores da EC 50 é igual a 4,25 mg/ml e da EC30 é 2,7 mg/ml. Para a linhagem A431, o valor da EC50 foi igual a 6,61 mg/ml e da EC30 foi igual a 4,79 mg/ml em 15 minutos.

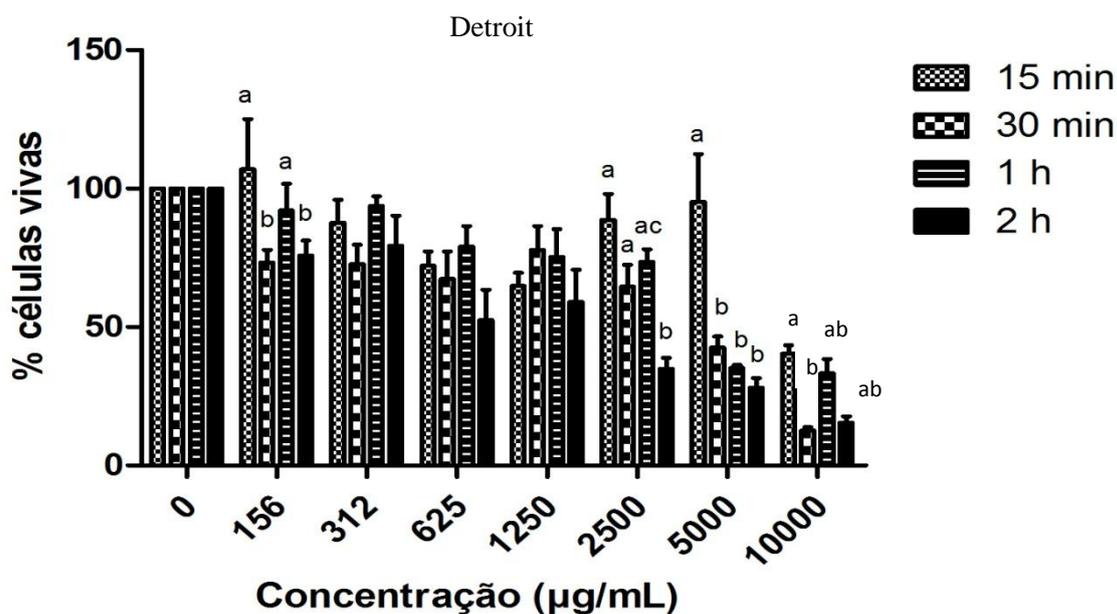


Figura 21: Gráfico representando o percentual de viabilidade celular da linhagem Detroit após incubação com a nano A por diferentes tempos (15 min a 2h) com concentrações variadas. Fez-se diluição seriada de 10.000 µg/ml até 156 µg/ml e utilizou-se o método colorimétrico de detecção MTT. Letras diferentes (a,b,c) indicam diferença significativa entre os tempos para uma mesma concentração ($P < 0,05$). Teste por ANOVA com pós-teste de Tukey. Não houve diferença estatística entre o grupo controle.

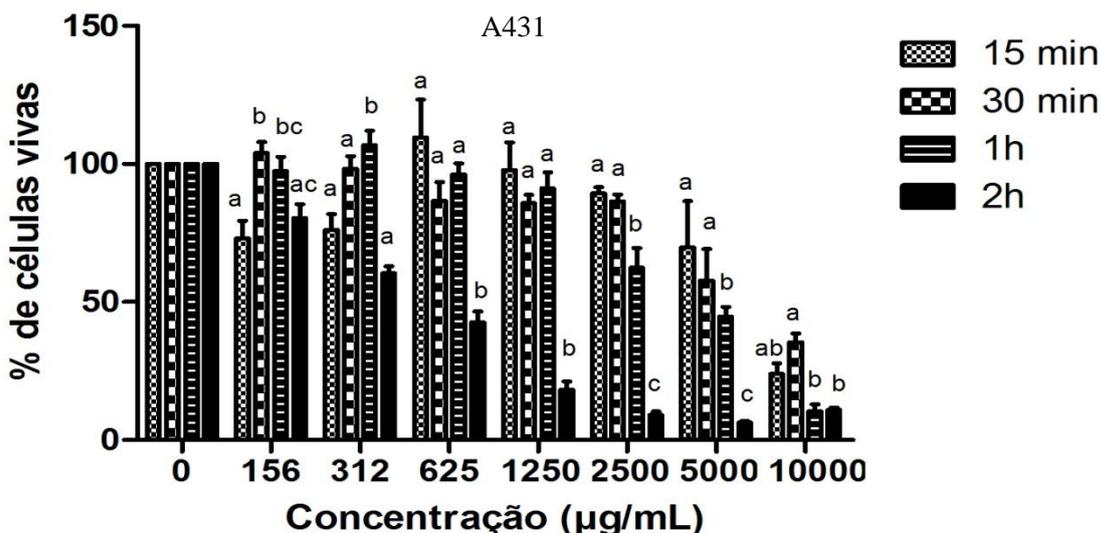


Figura 22: Gráfico representando o percentual de viabilidade celular da linhagem A431 após incubação com a nano A por diferentes tempos (15 min a 2h) com concentrações variadas. Fez-se diluição seriada de 10.000 µg/ml até 156 µg/ml e utilizou-se o método colorimétrico de detecção MTT. Letras diferentes (a,b,c) indicam diferença significativa entre os tempos para uma mesma concentração ($P < 0,05$). Teste por ANOVA com pós-teste de Tukey. Não houve diferença estatística entre o grupo controle.

Infere-se dos gráficos que a linhagem neoplásica é mais sensível no escuro quando incubada por maior tempo em relação à linhagem normal. E que no tempo de quinze minutos de incubação a linhagem normal é menos suscetível à nano A, exceto em concentrações maiores (10000 µg/ml) até 156 µg/ml e utilizou-se o método colorimétrico de detecção MTT. Letras diferentes (a,b,c) indicam diferença significativa entre os tempos para uma mesma concentração ($P < 0,05$). Teste. As duas concentrações menores reduziram mais acentuadamente a viabilidade celular em relação à concentrações de 625, 1250 e 2500 µg/ml no tempo de quinze minutos muito provavelmente devido à menor saturação da membrana com conseqüente acúmulo maior nas células.

5.2.5 Viabilidade celular após aplicação de TFD mediante ensaio de MTT

Após a realização dos testes no escuro, calculou-se os valores de EC50 e EC30 e repetiu-se os experimentos incubando-se por 15 e 30 minutos para em seqüência realizar-se a TFD. Como a linhagem celular não-neoplásica apresentou menos sensibilidade à nanoemulsão em menor tempo de incubação, equivalente a 15 minutos em comparação com 30 minutos (Fig. 23-A) e, considerando o melhor tempo de

internalização celular da nano A pela linhagem A431 por microscopia confocal, este tempo foi adotado para realização do protocolo de TFD.

Desta maneira, ambas as linhagens foram incubadas com as respectivas EC50 e EC30 por 15 minutos. Em sequência, irradiou-se por 10 e 20 minutos cada linhagem em cada concentração. Porém a concentração utilizada para a linhagem Detroit não foi efetiva à sua EC50 e EC30 no escuro, e, considerando que a linhagem normal foi não responsiva à TFD, inclusive houve estimulação da proliferação e, a A431 foi mais sensível à TFD com 10 minutos de irradiação em comparação a 20 minutos causando maior redução na viabilidade equivalendo a 50% de morte celular na maior concentração, foi escolhido o melhor tempo de irradiação equivalente a 10 minutos para aplicação *in vitro*.

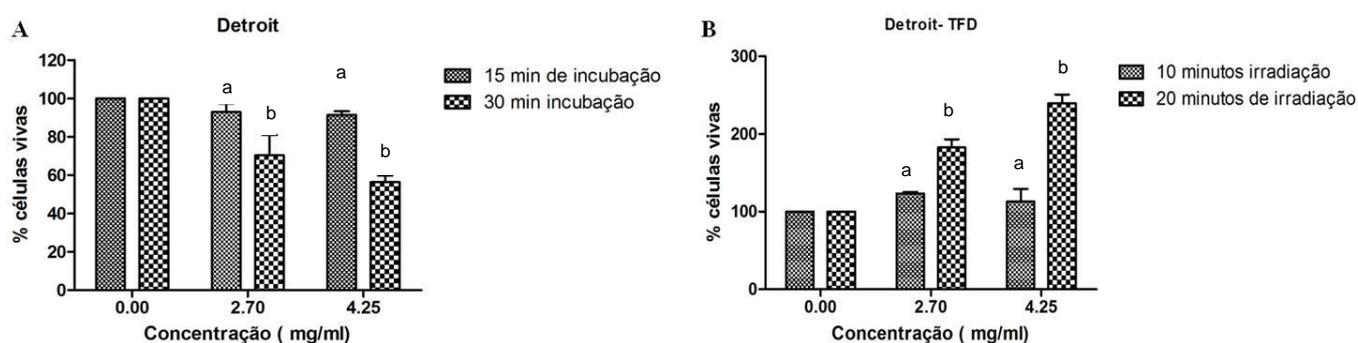


Figura 23: Gráficos representando o percentual de viabilidade celular da linhagem Detroit. (A) Experimento realizado na ausência de irradiação após incubação com a nano A por 15 e 30 minutos de incubação com concentrações equivalentes à EC50 e EC30. No gráfico B representa aplicação da TFD com 10 e 20 minutos de irradiação com 15 minutos de incubação. Em ambos, utilizou-se o método colorimétrico de detecção por MTT. Resultados estatisticamente significativos, com $P < 0,05$, letras diferentes indicam diferença estatística na mesma concentração entre tempos diferentes de incubação ou

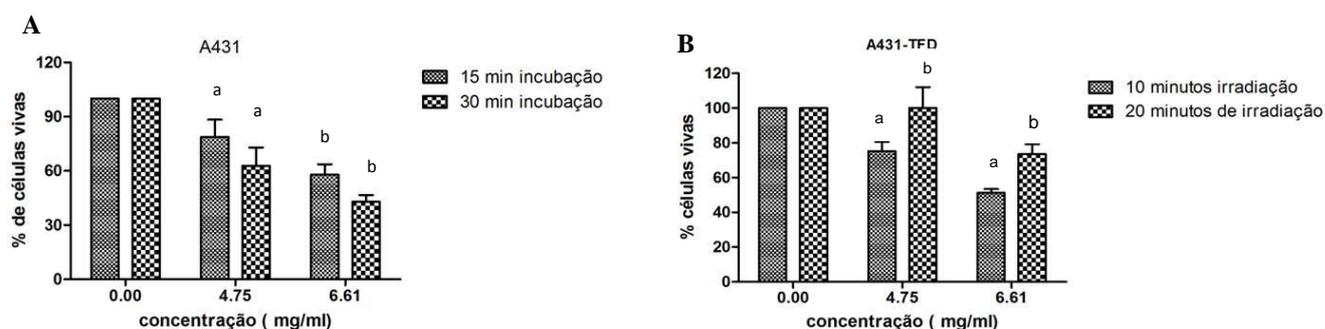


Figura 24: Gráficos representando o percentual de viabilidade celular da linhagem A431. (A) Experimento realizado na ausência de irradiação após incubação com a nano A por 15 e 30 minutos de incubação com concentrações equivalentes à EC50 e EC30. No gráfico B representa aplicação da TFD com 10 e 20 minutos de irradiação com 15 minutos de incubação. Em ambos, utilizou-se o método colorimétrico de detecção por MTT. Resultados estatisticamente significativos, com $P < 0,05$ para gráfico B. No gráfico A, não houve diferença estatisticamente significativa. Letras diferentes indicam diferença estatística na mesma concentração entre tempos diferentes de incubação ou de irradiação.

Com a finalidade de aumentar a eficiência da terapia fotodinâmica contra as células tumorais, realizou-se o mesmo protocolo de TFD porém fracionou-se o tempo com dois minutos de intervalo a cada cinco de irradiação, para que fosse possível consumir o oxigênio de maneira mais lenta aumentando-se o tempo de ação do mesmo sob as células.

Desta maneira, foi possível aumentar a citotoxicidade às células neoplásicas sem afetar a linhagem normal, aumentando a morte celular em 20% e 10% na concentração equivalente à EC30 e EC50, respectivamente. Comparando-se as duas concentrações mais próximas testadas em cada linhagem (4,75 e 4,25 mg/ml) é possível observar que não afetou a linhagem normal Detroit enquanto que sob a linhagem neoplásica houve considerável redução da viabilidade celular.

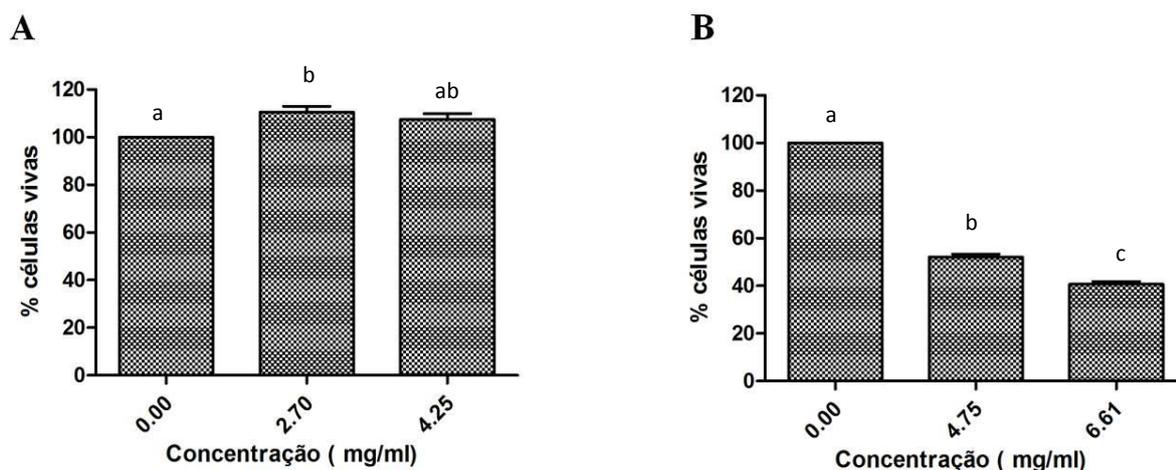


Figura 25: Gráficos representando o percentual de viabilidade celular após incubação por 15 minutos e aplicação da TFD com tempo de irradiação fracionado. Dez minutos de exposição ao LED com dois minutos de intervalo na metade do tempo. (A) Linhagem Detroit e em B linhagem A431. Concentrações utilizadas equivalentes à CL50 e CL30. Em ambos, utilizou-se o método colorimétrico de detecção por MTT. Letras diferentes indicam diferença estatística entre as concentrações analisadas, $p < 0,05$.

5.3 EXPERIMENTOS *IN VIVO*

5.3.1 Análise Clínica

No início do tratamento, a massa corporal dos animais estava em torno de 25 a 26 g. O peso do grupo G1 (tumor) e G2 (droga) permaneceram constantes, no 15º dia houve aumento de 2 g e 1 g respectivamente.

No caso do grupo G3 (TFD) após discretos acréscimos e decréscimos, a partir do 15º dia houve ganho de 2g. Já o grupo G4 (LED), a partir do 15º dia houve ganho de aproximadamente 1g. Houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos no 15º dia.

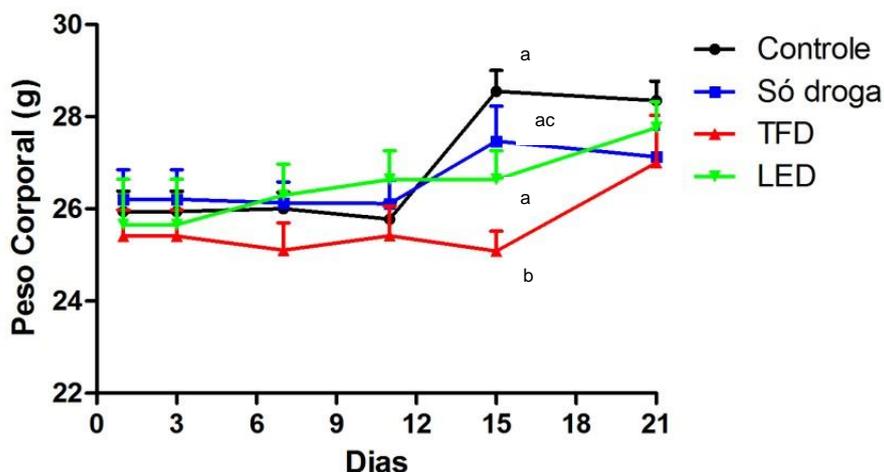


Figura 26: Peso corporal monitorado por 21 dias durante o período de tratamento por TFD em camundongos nude portando tumores da linhagem A431. Os grupos apenas tratado com o fármaco fotossensibilizante e apenas com o LED ou sem tratamento foram usados como controle. Dados foram estatisticamente significativos apenas no 15º dia, $P < 0,05$. Letras diferentes indicam diferença estatística entre cada grupo ao longo do tempo.

Após o 15º dia começou haver nítida diferença do volume tumoral entre os grupos estudados. Já no 21º dia, a média do volume tumoral do grupo TFD foi de 400 mm³ aproximadamente, sendo 3,5 vezes menor em relação à média do grupo sem tratamento enquanto que no grupo tratado só com droga o volume tumoral foi de 600 mm³. Houve diferença estatística significativa com $P < 0,001$

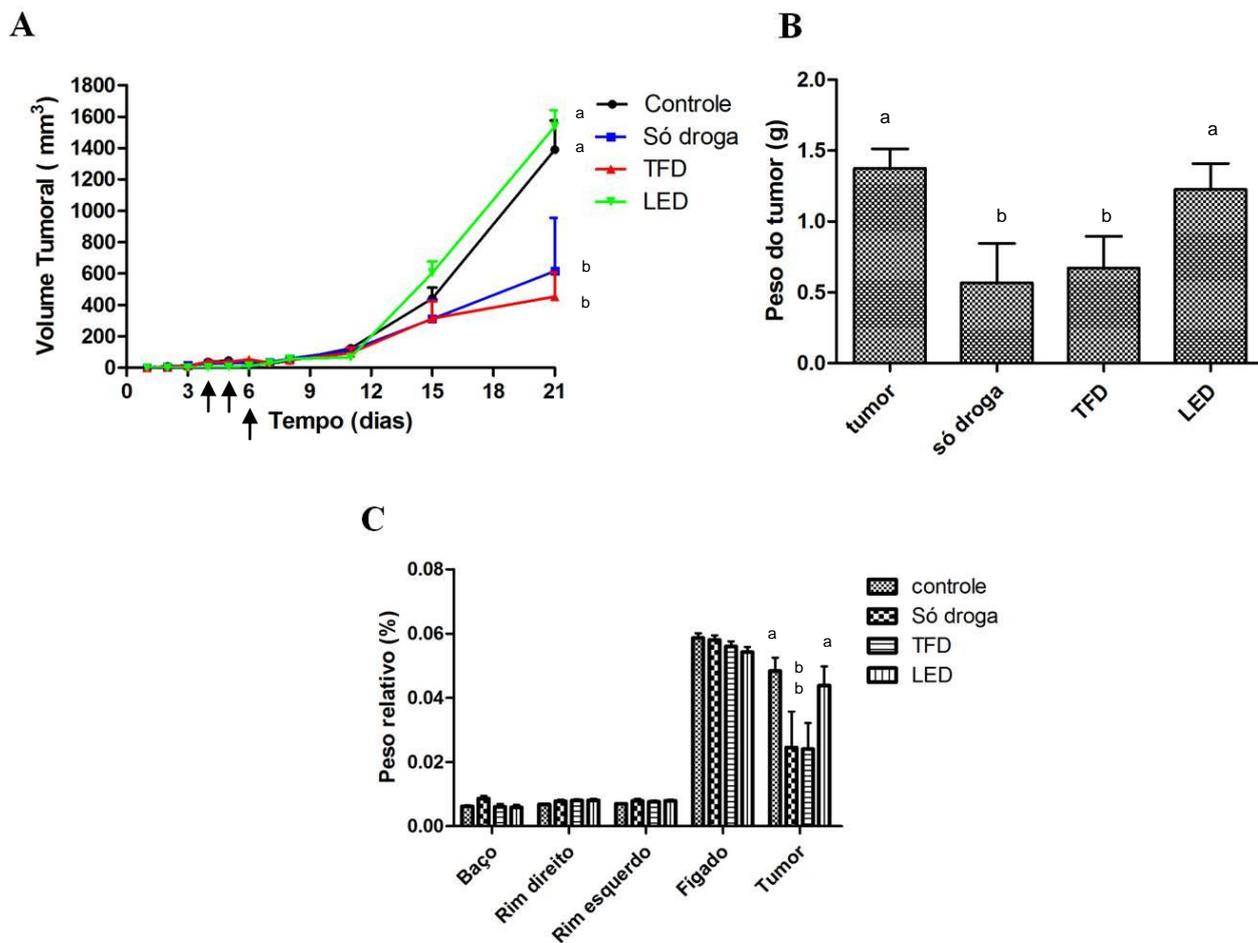


Figura 27: Em A, variação do volume tumoral com o decorrer dos dias. Volume calculado segundo a fórmula: $(\text{Comprimento}) \times (\text{largura})^2 \times 0,5$. Setas indicam os dias de tratamento. Em B, gráfico representando a média do peso do tumor por cada grupo estudado. Em C, peso relativo do baço, rins, fígado e tumor em relação ao peso corpóreo de cada animal. Dados apresentados em forma de média por cada grupo. Dados estatisticamente significativo apenas para o tumor e só a droga, com $P < 0,01$. Concentração de droga utilizada igual a 50 mg/ml.

O gráfico B, representa a média do peso do tumor de cada grupo, onde é possível observar que os animais tratados com a TFD e com a droga equivalem à aproximadamente metade da média do peso dos tumores dos grupos sem tratamento e LED. Já no gráfico C é apresentado a média do peso relativo dos órgãos e dos tumores em relação a massa corporal dos animais. É notório a grande proporção do peso do tumor em relação a massa corpórea dos grupos controle e LED em comparação com os grupos TFD e droga, equivalendo ao dobro destes. Assim, é possível concluir que tanto a TFD quanto a nanoemulsão pura foram eficientes na redução da neoplasia, já que tanto o volume quanto o peso representam a aproximadamente metade do valor obtido pelos grupos tumor e só LED. A concentração de óleo utilizado na nanoemulsão foi escolhido a fim de que a concentração de uso fosse a maior possível, não foi realizado

um escalonamento com várias concentrações de droga devido ao pequeno N de animais. Dados estatisticamente significativos com valor de $P < 0,001$; para os demais órgãos não houve diferença estatística significativa.

Cada grupo experimental foi estudado com um N de 6 animais. No grupo tratado com TFD foi conseguido 2 regressões totais, o que equivale a 33% de cura em tumor de pele nodular tratado com TFD. Já no grupo tratado apenas com a nanoemulsão, foi alcançado uma regressão total e 2 regressões parciais, o que representa 16,6 % e 33 % respectivamente, atuando assim, como um antitumoral. A regressão total é uma resposta completa e indica o desaparecimento total do tumor, enquanto que na regressão parcial indica redução maior que 50 % [102]. Os dados foram estatisticamente significativos, com $P < 0,0001$.

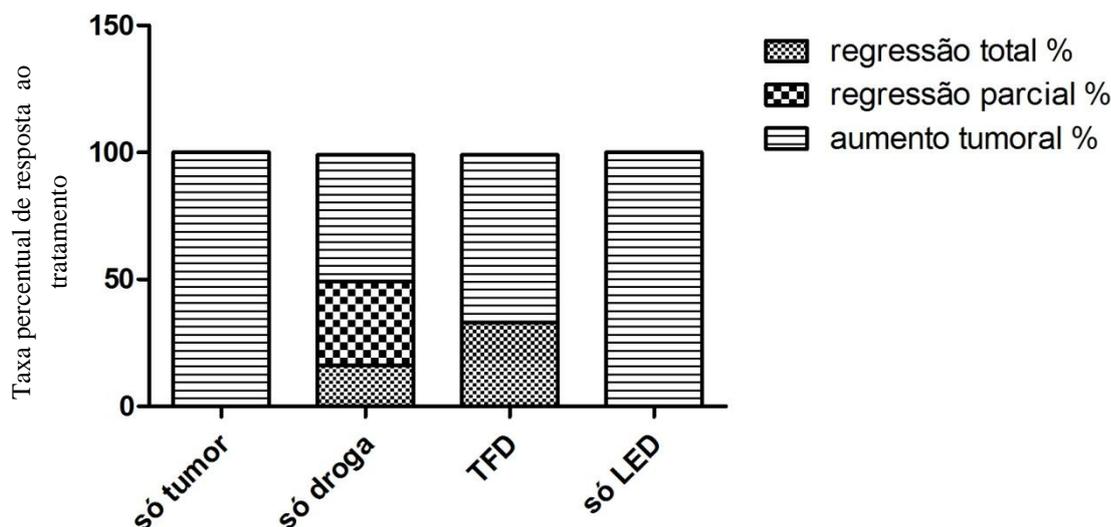


Figura 28: Gráfico representando o percentual de regressão total, regressão parcial e o crescimento tumoral por cada grupo estudado em carcinoma espinocelular. Dados estatisticamente significativos com valor de $P < 0,0001$, teste do Qui².

Abaixo, comparação macroscópica do efeito pós-tratamento com 21 dias. Em A, animal submetido apenas à indução tumoral sem sofrer tratamento algum com 14 dias de crescimento, sendo possível observar rica vascularização na superfície e aspecto bem eritoplásico, típico de CEC. Em B, animal submetido a 3 aplicações de fármaco fotossensibilizante, apenas. Foto retratando o 21º dia, seta indicando o local onde o tumor estava instalado anteriormente. Já em C, animal submetido à TFD após 21 dias.

Na ponta da seta pequena cicatriz, muito provavelmente devido à fibrose no local, figura 29.

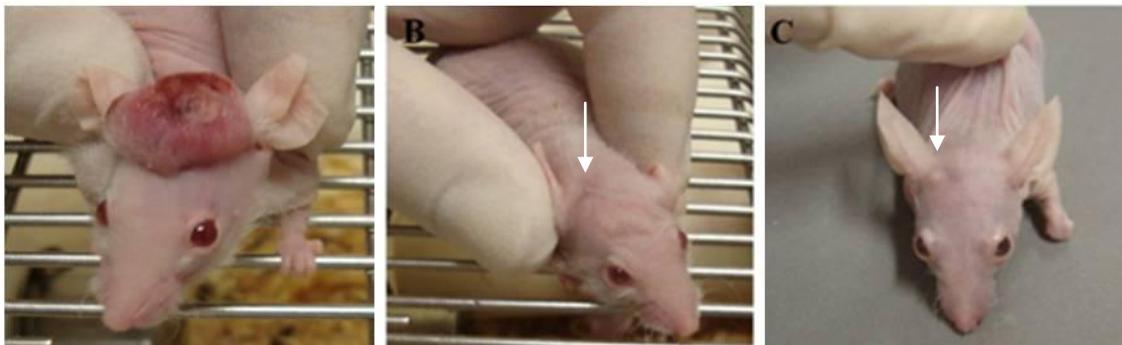


Figura 29: Fotos comparando o efeito macroscópico pós -tratamento. Em A, animal do grupo sem tratamento no 14º dia após indução. Tumor nodular com abundância de vasos e de aspecto eritroplásico. Em B, animal pertencente ao grupo que recebeu apenas fármaco. Foto retratando o 21º dia, seta indica pequena cicatriz no local onde havia o tumor. Em C, animal do grupo tratado com TFD retratando o 21º dia. Seta indica região com provável fibrose onde estava localizado o tumor.

Já na figura 30, é possível observar que apesar do tamanho considerável do tumor, o mesmo não invadiu os tecidos adjacentes crescendo apenas localmente e de maneira superficial em paralelo à pele, características favorecidas por ser ortotópico.



Figura 30: Característica do tumor ortotópico com crescimento local sem invasão dos tecidos adjacentes. Grupo sem tratamento.

Após eutanásia e coleta do sangue, as enzimas sanguíneas que predizem sobre alteração hepática ou renal foram analisadas não havendo alterações bioquímicas entre elas e nem diferença estatística significativa entre os grupos analisados, figura 31.

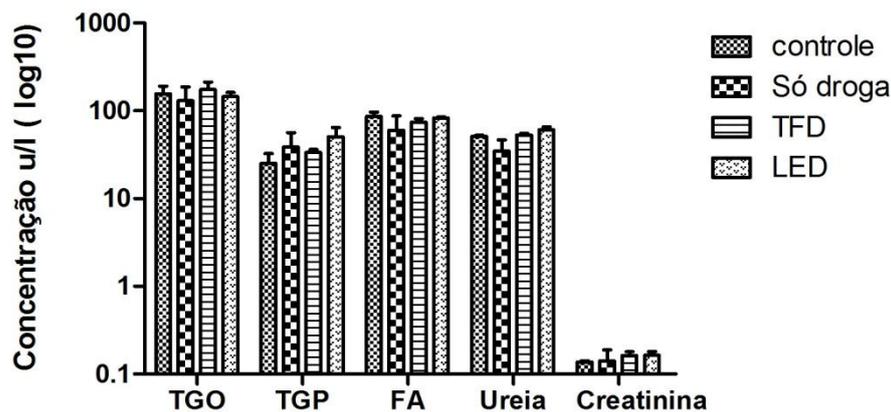


Figura 31: Enzimas sanguíneas analisadas bioquimicamente no 21º dia dos grupos sem tratamento, tratados apenas com droga, submetidos à TFD ou apenas ao LED. TGO: Transaminase oxalacética. TGP: Transaminase pirúrvica. FA: Fosfatase alcalina, ureia e creatinina. Dados não significativos estatisticamente entre cada enzima.

Nas análises histológicas, foram observados vários órgãos de todos os animais, porém não foi observado nenhuma alteração histopatológica em nenhum grupo do estudo. Todos apresentando morfologia normal sem presença de inflamação, hemorragia ou necrose. Nos rins não foi observado presença de tumefação turva ou degeneração hidrotópica, resultado do acúmulo de água no interior das células por lesão química ou tóxica, traduzindo-se com células aumentadas em volume e núcleos deslocados para a periferia além de vacuolização. No fígado também não foi encontrado necrose hepática e nem esteatose, que é uma alteração degenerativa reversível causada pelo acúmulo de gorduras neutras. Sendo o fígado o principal órgão envolvido na metabolização de lipídios, poderia ter sido encontrado este quadro de degeneração ou até mesmo nos rins. Como não foi encontrado, comprova-se que a nano A não foi tóxica. Da mesma maneira nos pulmões, não foi detectado edema e nem infiltração de células inflamatórias. Não foi encontrado metástase nos linfonodos, figura 32. Esta seria vista como um grupo de células características de CEC nos linfonodos.

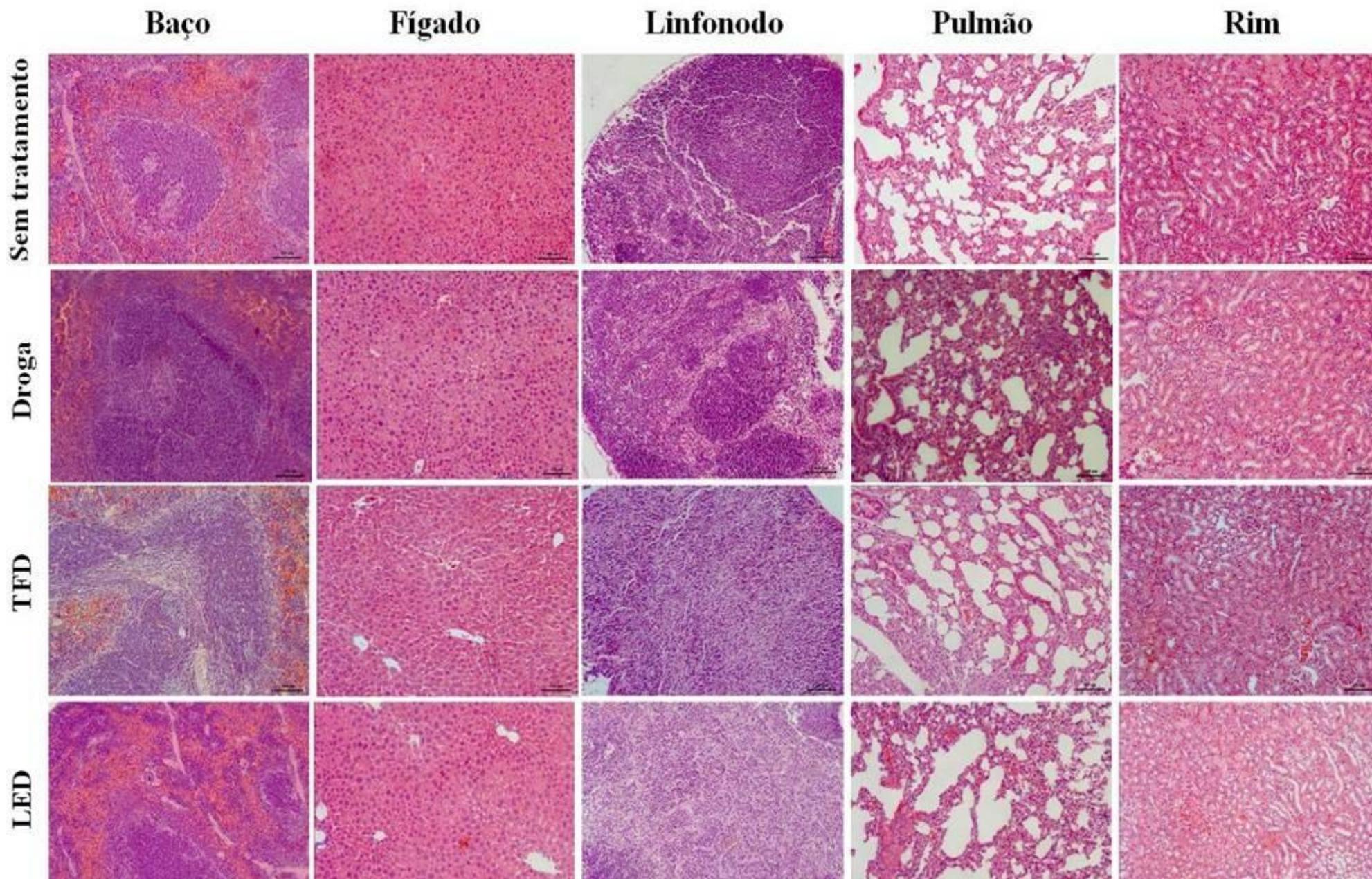


Figura 32: Prancha histológica retratando o baço, o fígado, o linfonodo cervical, o pulmão e o rim. Não foi observado nenhuma alteração histopatológica em nenhum grupo estudado, apresentando todos morfologia normal sem presença de tumefação turva, degeneração hidrotópica, esteatose hepática ou mesmo inflamação, necrose ou hemorragia. Todas fotomicrografias foram registradas em objetiva de 20x. Coloração por H&E.

Já na figura 33, é apresentado as fotomicrografias do tumor em cada grupo estudado, todo registrados em objetiva de 20x exceto a linha de fotos de numeração 2 que foram registradas em objetiva de 40x. Em A, grande massa tumoral com presença de cordões celulares infiltrativos de células escamosas neoplásicas entremeando a derme, indicado pela seta preta. Seta larga indicando vascularização. Ponta de seta retrata células espinhosas com atipias nucleares e estroma circundante desorganizado, perda do arranjo em camadas. Em B, presença intensa de pleomorfismo celular com presença de pérolas córneas que são células queratinizadas em áreas focais redondas, típico de carcinoma espinocelular bem diferenciado, indicado pelas setas pretas. Ponta de seta indicando disceratose. Em C, estrutura tecidual bem organizada com restituição da arquitetura da epiderme indicada pela seta preta, a epiderme ainda está um pouco espessa devido à resposta do tecido ao tratamento. Ponta de seta indicando área com acantólise. Disceratose e acantólise são típicos de CEC onde o primeiro se caracteriza por células isoladas arredondadas com citoplasma densamente corado destacado do resto do epitélio por halo circunvizinho claro enquanto que no segundo é representado por áreas onde as células perdem as aderências intercelulares (desmossomos) e se apresentam soltas, assumindo forma arredondada e tonalidade eosinófila. Seta larga retratando infiltrado de células inflamatórias. Em D, intensa diferenciação celular com desorganização da arquitetura da derme, presença de cordões invasivos indicados pelas setas pretas. Seta larga retratando vascularização e ponta de seta apresentando multinucleação com cromatina granular devido à exposição a radiação, ponta de seta branca indicando disceratose, típico também de CEC.

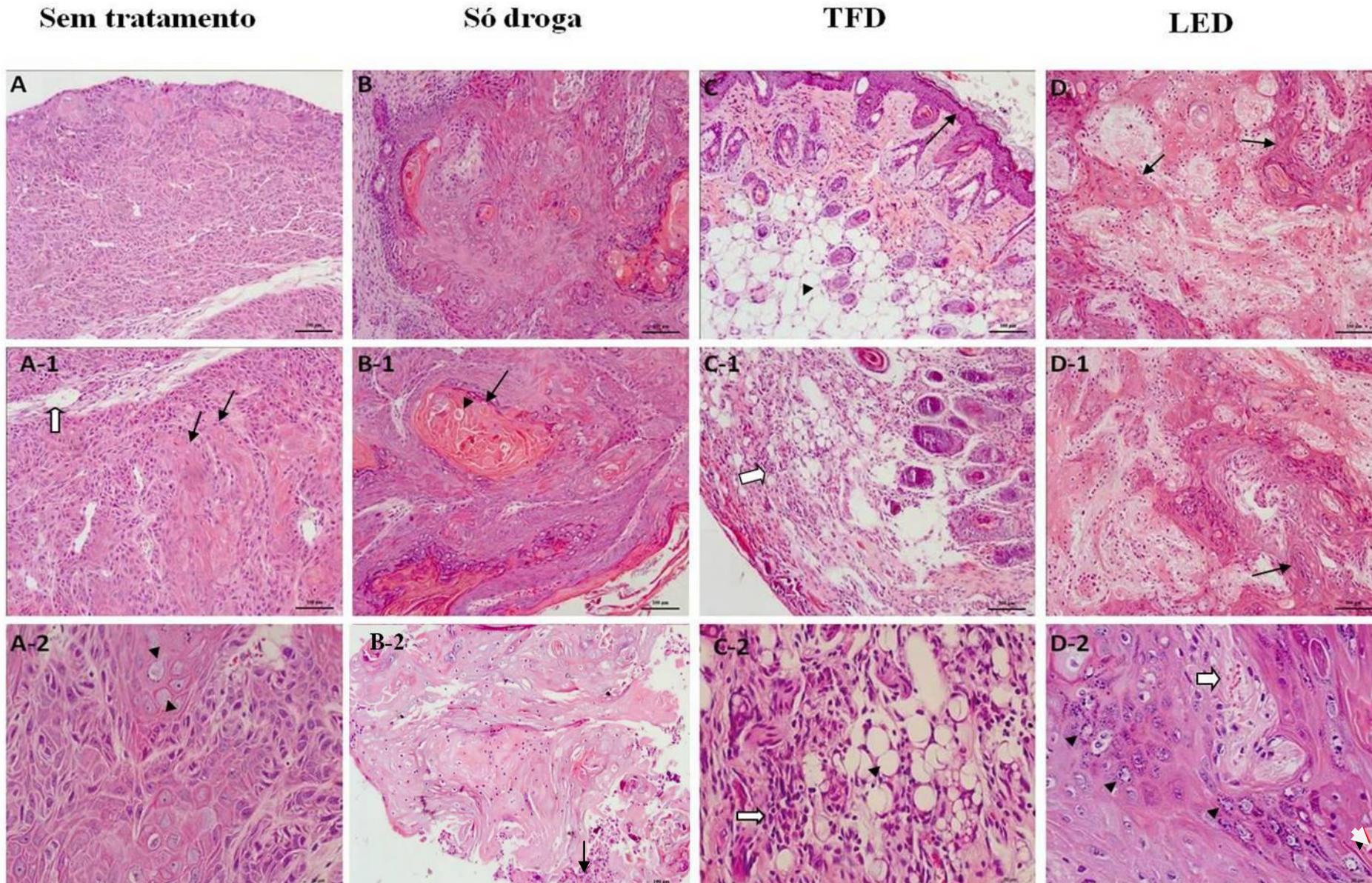


Figura 33: Em **A**, é retratado o grupo apenas com tumor, sem tratamento. Seta preta indicando cordões infiltrativos de células escamosas neoplásicas entremeando a derme. Seta larga indicando vascularização. Ponta de seta retrata células espinhosas com atipias nucleares e estroma circundante desorganizado, perda do arranjo em camadas. Em **B**, grupo tratado apenas com a nanoemulsão; setas pretas indicando pérolas córneas, típico de CEC bem diferenciado e ponta de seta mostrando presença de disqueratose; em B-2 animal com resposta parcial ao tratamento, seta inçando presença de infiltrado inflamatório. Em **C**, animais tratados com TFD, onde é possível observar restabelecimento da organização tecidual (seta preta) com presença de células inflamatórias indicado pelas setas largas. Em **D**, intenso pleomorfismo celular com vários cordões invasivos indicado pelas setas pretas. Vascularização indicado pela seta larga e presença de muitas células multinucleadas indicado pelas pontas de seta. Coloração por H&E.

DISCUSSÃO

Foi utilizado neste trabalho um fotossensibilizante à base de óleo de açaí disponibilizado na forma de nanoemulsão. Esta utilização traz como vantagem a maior internalização do fotossensibilizante de interesse pelas células tumorais, devido ao fato de as células neoplásicas incorporarem com mais facilidade fármacos com maior hidrofobicidade [68,69,70].

Em posse desta vantagem, foi testado o potencial de geração de espécies reativas de oxigênio do óleo em questão, o óleo de açaí e, após confirmação desta característica imprescindível à aplicação na TFD, foi desenvolvido em conjunto com o farmacêutico Dr. Muehlmann, a plataforma de formulação da nanoemulsão. Antes de ser estabelecido o protocolo final, foram testadas várias concentrações do tensoativo Tween-80 e vários ciclos de inversão de fase por temperatura a fim de verificar qual a interferência destas duas variáveis no diâmetro das nanogotículas.

Desta forma, observou-se que quanto maior a proporção de Tween-80 (T - 80), obtinha-se nanogotículas com diâmetros menores devido à maior interposição do surfactante na interface de água e de óleo. Assim, à medida que eleva-se a concentração de T-80, há uma diminuição no raio de curvatura das nanogotículas, obtendo-se então, tamanhos menores [71]. O número de ciclos de inversão de fase não interferiram no tamanho das gotículas, concluindo-se então que a alternância da fase dispersa e da fase contínua ocasionada pela mudança da temperatura não é responsável pela “quebra” das gotículas em outras menores, fato relatado por Gutiérrez et al [71].

Em posse destas informações, para obtenção de uma nanoemulsão com características que propiciasse o uso em aplicação biológica para testes pré-clínicos, determinou-se então, um ciclo de inversão de fase e a proporção de de 1: 4,5 (óleo: tween) pois com esta proporção, foi obtido características coloidais favoráveis.

A partir da determinação da plataforma de formulação, seguiu-se os testes de caracterização da nanoemulsão. Para isto, foi avaliado as variáveis coloidais e a caracterização morfológica por microscopia eletrônica de transmissão e varredura. Assim obteve-se por diâmetro hidrodinâmico o valor médio de 117 nm, potencial zeta de -0,536 mV e índice de polidispersão (PDI) de 0,144.

Esses resultados são completamente favoráveis para a finalidade da nanoemulsão, pois a absorção de fármacos através da pele ocorre passivamente

ocorrendo principalmente por difusão através do estrato córneo e das camadas de células da epiderme, através da rota intercelular (corneócitos) por meio da matriz lipídica. Com esse pequeno diâmetro hidrodinâmico e a alta concentração de surfactante, o depósito uniforme no substrato é favorecido devido à baixa tensão superficial do sistema e da baixa tensão interfacial entre as gotículas [61,72] principalmente em administração endovenosa além de favorecer o acúmulo passivo do fotossensibilizante no tumor devido ao efeito de retenção e permeação aumentadas (EPR), pois as fenestras dos vasos sanguíneos tumorais são bem maiores que as do tecido normal, impondo uma barreira de até 400 nm para o efeito EPR [46,57]. Da mesma forma, a cobertura altamente hidrofílica das nanogotículas é a principal responsável pela estabilização da mesma. O baixo valor de PDI corrobora com os resultados obtidos na microscopia eletrônica de transmissão, onde concluímos se tratar de uma população monodispersa com diâmetro médio de 74 nm e de morfologia esférica. Estas informações reforçam os pré-requisitos necessários para aplicação biológica de forma segura, pois além de favorecer o efeito EPR, certificamos que não haverá gotículas de tamanhos muito distantes da média pois há uniformidade; não havendo tendência a obstrução do fluxo sanguíneo, caso seja escolhida administração endovenosa, e, caso seja aplicação tópica, a passagem das nanogotículas pelo estrato córneo da pele é favorecido pelo fato de ser lipídico e esférico [71,72]

Foram realizados testes para estudo da estabilidade da nanoemulsão sob diferentes condições de armazenamento e por diferentes tempos de estocagem, a partir do primeiro dia após a formulação por até um ano. Pelos seis meses analisados, as amostras mantidas à temperatura ambiente e a 7°C apresentaram estabilidade. Levando em consideração a possível aplicação em humanos no futuro, foi analisado posteriormente a estabilidade da nanoemulsão armazenada em torno de 37°C, sendo esta a temperatura corporal aproximadamente, e, sob esta condição, a nanoemulsão permaneceu estável mantendo-se os valores do diâmetro hidrodinâmico e do índice de polidispersão.

Concluídas todas as análises acima descritas, foram realizadas avaliações mais centradas na terapia fotodinâmica de forma a possibilitar o uso da nanoemulsão como fotossensibilizante. Desta forma, foi avaliado o espectro de absorbância da nanoemulsão, onde detectou-se um pico em 660 nm. Frente a essa banda de absorção, conclui-se que, o fato do óleo estar disperso em nanoemulsão, não houve interferência

nesta propriedade fotofísica do mesmo, pois o óleo sozinho também absorve nesta faixa. Adicionalmente, mostra-se favorável para a aplicação na TFD pois essa faixa de 660 nm corresponde satisfatoriamente à janela de absorção e penetração tecidual pela luz [43,73].

Em sequência, foi realizado os testes para leitura da fluorescência, coincidindo também em 660 nm a faixa de emissão. Da mesma maneira, este resultado corrobora com a faixa de absorção obtida e ainda favorece uma outra possibilidade, que é a aplicação para diagnóstico terapêutico, teranóstica, seja atuando como um agente que aumente o contraste de imagens ou mesmo como um componente fluorescente. [44,73,74]. A outra banda encontrada no gráfico que correspondente à 700nm é devido a artefato do próprio equipamento.

A não interferência nas propriedades fotofísicas do óleo disperso em nanoemulsão, foi confirmado também pela manutenção da propriedade fotoquímica, a geração de oxigênio singleto. Assim, foi mensurado a produção de oxigênio singleto por detecção indireta de decaimento por benzofurano. Com este teste, à medida que a fluência energética era aumentada, produzia-se mais ROS e por consequência, diminuía-se a absorbância do benzofurano, pois o mesmo era consumido ao reagir com o oxigênio singletoproduzido, obtendo-se uma curva com valor de $R^2 = 0,99$. Assim, confirmou-se ser a nanoemulsão um bom gerador de oxigênio singleto, permitindo sua utilização como fotossensibilizante.

De acordo com os estudos realizados e as informações obtidas, confirma-se o fato de esta nanoemulsão ser em potencial um bom fotossensibilizante para aplicação na TFD. Deste modo, foi realizado a experimentação *in vitro* com células neoplásicas de carcinoma epidermóide A431 e *in vivo* com camundongos nude, de maneira a enriquecer este estudo e elucidar melhor os efeitos da aplicação biológica deste subproduto oriundo da nossa biodiversidade com interferência e melhoramento da nanobiotecnologia. É de suma importância o estudo e a utilização de produtos tipicamente brasileiros, como no caso do açaí que somente no Pará é responsável pela produção de 700 mil toneladas/ano e que envolve o trabalho de aproximadamente 300 mil pessoas, correspondendo a 70 % da fonte de renda da população ribeirinha. No período de safra, são comercializados diariamente em torno de 471 mil litros de açaí

comercializados em mais de 3000 pontos de venda pela cidade de Belém, segundo dados divulgados pelo governo do estado do Pará [103].

Dando continuidade aos experimentos, foi realizado a experimentação *in vitro*, iniciando-se com os testes para confirmar qual o tempo ideal para internalização da nano A. Com base nesses testes realizados por detecção de absorbância em espectrofotômetro após diferentes tempos de internalização a partir de uma diluição seriada, confirmou-se que a nano A sob altas concentrações é internalizada em menor tempo equivalente à quinze minutos. À medida que decorre o tempo, essa incorporação diminui, possivelmente devido à metabolização da nano A ou pela degradação da mesma, porém mais estudos são necessários para mensuração da velocidade desta metabolização. Em contrapartida, as células não-neoplásicas apresentaram incorporação menor em relação às tumorais, fato confirmado também por microscopia confocal. Esta menor incorporação pode ser devido ao fato de se tratar de transporte lipídico por vias normais, difusão passiva, e, ao longo do tempo analisado, ter saturado a membrana, diminuindo-se por consequência a internalização [78].

Conhecendo-se o melhor tempo de internalização, 15 minutos, foram realizados os testes no escuro mediante diluição seriada onde foram analisadas várias concentrações. Baseado nesses experimentos, observou-se que a linhagem normal foi pouco responsiva às várias concentrações de nano A. Já em tempos maiores em contato com a nanoemulsão, equivalente a 30 minutos, houve queda na viabilidade celular enquanto que, na maior concentração analisada, 10 mg/ml, foi bastante citotóxica em todos os tempos analisados. Essa vulnerabilidade da linhagem normal em maior tempo de incubação pode ser devido muito provavelmente ao grande número de partículas em contato direto com as células ou até mesmo devido à concentração de tween 80 pode ter permeabilizado muito a membrana celular, reduzindo a viabilidade.

Já no caso da linhagem neoplásica, a mesma se mostrou ainda mais sensível à nano A em maior tempo de exposição (2h). Isto se deve muito provavelmente ao fato de as células neoplásicas serem mais sensíveis à fármacos devido à presença de inúmeras mutações que lhes confere maior susceptibilidade a diversos tratamentos [77].

A partir dos dados experimentais obtidos mediante os testes realizados no escuro, calculou-se os valores referentes à EC50 e EC30 no tempo de 2h para ambas as linhagens para em sequência realizar-se o protocolo de TFD. Neste experimento, a

linhagem Detroit mais uma vez apresentou-se mais resistente do que a linhagem A431 pois comparando a resposta de ambas as linhagens às respectivas EC50 (4,25 mg/ml para Detroit e 4,75 mg/ml para A431) fica bastante nítido que não há redução da viabilidade celular sob a linhagem normal enquanto que na linhagem neoplásica há uma redução de aproximadamente 50% . Este fato é excelente pois na busca por novos fármacos e por terapêuticas mais seguras e eficazes, quanto menos efeitos houver nos tecidos e células normais, menores serão os efeitos colaterais. Os testes realizados com as EC50 e EC30 da linhagem neoplásica apresentaram maior efeito na redução da viabilidade celular no tempo de 30 minutos, devido ao fato de estar em contato direto com a monocamada celular por mais tempo. O fato de ter havido toxicidade no escuro não foi de encontro aos preceitos de um fotossensibilizante ideal pois se tratando de uma linhagem tumoral, é esperado que no final de todo o tratamento as células neoplásicas sejam destruídas. Fato que não é bom em linhagens normais e que não foi observado neste estudo no tempo de 15 minutos.

Ao realizar-se a TFD *in vitro*, irradiou-se as linhagens por dez e por vinte minutos para que fosse observado qual teria melhor resultado. Na linhagem normal não houve efeito citotóxico em nenhum dos tempos de irradiação testados. Pelo contrário, em maior tempo de irradiação equivalente à vinte minutos, houve nítido crescimento celular, muito provavelmente devido à extinção do oxigênio presente na cultura restando-se apenas a bioestimulação pelo LED, efeito já conhecido e inclusive aplicado na clínica médica até para estimulação da produção de colágeno e do rejuvenescimento facial [79].

Já no caso da linhagem tumoral, houve maior redução na viabilidade celular no tempo de irradiação equivalente à dez minutos em comparação à 20 minutos porque ainda estavam presentes tanto o oxigênio molecular quanto o Fs, favorecendo a permanência destes no meio por maior tempo, enquanto que no outro tempo os requisitos para dano celular já haviam sido extinguidos, cessando os efeitos diretos da TFD restando-se apenas a bioestimulação descrita acima [80,81]. Desta maneira, elegeu-se o melhor tempo de irradiação *in vitro* equivalente à dez minutos.

Com o intuito de aumentar o efeito citotóxico da TFD sob as células tumorais, utilizou-se do artifício de fracionar-se o tempo de irradiação durante a realização da TFD, pois desta maneira é possível consumir o oxigênio molecular de lentamente, aumentando-se o tempo de permanência do mesmo sobre a cultura,

potencializando o efeito da TFD [82]. Desta forma conseguiu-se potencializar o efeito em cultura em 20 e 10% referente à menor e à maior concentração analisadas respectivamente. Já a linhagem normal, não houve redução da viabilidade.

Com o intuito de verificar qual o efeito biológico da nanoemulsão quando aplicada *in vivo*, foi realizado os experimentos em camundongos nude já que se trata de indução tumoral com células humanas, configurando-se um modelo ortotópico heterólogo. Foi de suma importância a aplicação deste modelo já que não há descrição na literatura para carcinoma epidermóide de pele, sendo descrito apenas em mucosa. Porém, como já é sabido que os carcinomas de mucosa são bem menos resistentes que os de pele, daí a importância de analisar os efeitos farmacológicos da nano A de maneira mais próxima do natural possível, mimetizando mais fielmente o sítio natural de acometimento por este tipo de neoplasia.

O tumor foi induzido na cabeça apenas por facilitar a injeção intradérmica, favorecendo o sítio natural de desenvolvimento. Por estar na cabeça, o crânio funciona como um anteparo facilitando a inserção da agulha entre a derme e a hipoderme. Para ser possível inserir as células exatamente na epiderme, seria necessário uma agulha cujo tamanho fosse a metade da menor existente hoje no mercado. Não existindo ainda, ao inserir a agulha, o bisel já é inserido entre as duas camadas supracitadas, no ângulo de 45°. Além disso, o fato de estar inserido no microambiente natural, favorece o estudo pois o tumor cresce num ambiente mais delimitado e superficial, sem infiltração para as camadas mais profundas e é possível a detecção clínica precoce do tumor, sendo possível iniciar o tratamento em tumores pequenos e superficiais. Ao contrário de um tumor subcutâneo, que tem crescimento mais lento e aparecimento clínico tardio. Quando é possível detectar o tumor, por volta do 14º dia, este apresenta grandes dimensões e já está infiltrado, comprometendo a eficácia do tratamento [83;84;85;86].

Considerando as vantagens citadas de um modelo ortotópico, este foi escolhido para o estudo, sendo possível detectar o tumor em todos os animais até o 4º dia. Respeitando a premissa de tratamento de tumores pequenos com terapia fotodinâmica, de modo a facilitar que a luz possa incidir em toda a abrangência do tumor, os mesmos foram tratados assim que detectados em todos os animais.

Transcorridos os 21 dias após o tratamento, o resultado apresentado foi ótimo, pois obtivemos um percentual de 33% de remissão total no grupo onde foi

aplicado a TFD. E a média do volume tumoral de todo o grupo foi aproximadamente 3,75 vezes menor em relação aos grupos controle só com tumor e irradiado apenas com o LED. Apesar de não ter ocorrido a remissão em 100% dos animais, essa porcentagem é importante já que até o presente momento, havia uma ressalva em relação à aplicação de terapia fotodinâmica em tumores nodulares, devido ao fato de a luz poder não incidir sobre a totalidade do nódulo, não tratando então a totalidade do nódulo. Com este trabalho, foi possível mostrar que a TFD foi bastante eficiente, contrariando o que até então era propagado a respeito. Esses 33% de remissão total é muito promissor pois em vários tipos de carcinomas de mama, ovário e pulmão de células pequenas, o sucesso que é atingido a partir do uso de um conjunto de quimioterápicos é em torno de até 40% dos pacientes, utilizando derivados do taxol, da cisplatina e do 5-fluoracil [87,88] e em casos de mieloma e linfoma fica em torno de 15 e 42% respectivamente [89]. Com a aplicação da TFD usando-se apenas a nano A alcançou-se um percentual muito próximo do que existe hoje na realidade da oncologia. Seria importante estudar o efeito desta terapêutica em outros tipos de neoplasias, sendo o CEC de pele muito resistente foi alcançado este ótimo resultado, talvez em outros tipos de tumores o sucesso seja ainda maior.

O fato de não ter tratado a totalidade do grupo de TFD, pode dever-se ao fato de ser necessário uma concentração mais alta de fotossensibilizante na solução de nanoemulsão. Esta concentração pode ser aumentada talvez realizando-se uma filtração tangencial, onde é gerado um fluxo que passa tangencialmente aos poros selecionando as gotículas de tamanho ideal, sendo possível diminuir a concentração de surfactante e aumentar a de óleo sem alterar o diâmetro das nanogotículas [90]. Também é possível que o tempo necessário à internalização do fármaco pelas células tumorais tenha interferido no tratamento, pois de acordo com os experimentos *in vitro*, é necessário quinze minutos para haver internalização. Mesmo o fármaco sendo injetado de modo intratumoral, não foi possível esperar exatamente os quinze minutos para internalização celular e ainda o tempo necessário para irradiação com LED, pois o efeito da anestesia terminaria antes do término da irradiação e, se fosse ministrado mais anestésico seria possível perder algum animal por overdose. Ou ainda, pode ter acontecido de a luz não ter alcançado a totalidade do nódulo tumoral, restando-se ainda algumas células tumorais resistentes que em determinado momento voltaram a proliferar.

Não foram realizados os grupos controle apenas com solução salina e apenas com o surfactante Tween-80. O fato de ter injetado o fármaco por via intratumoral poderia ter gerado isquemia mecânica com aumento da pressão, e por consequência, redução do tumor, por isso se justifica a realização do controle apenas com solução salina. Porém, já foi realizado este controle em outros experimentos laboratoriais pesquisando-se outras drogas sendo inserido volumes inclusive maiores de solução salina ao de droga utilizada neste estudo. E, foi observado que não houve redução do tumor por isquemia, pelo contrário, houve crescimento tumoral (dados não publicados). Considerando estes resultados, não foi realizado um grupo apenas com solução salina pois já era conhecido a inércia de sua aplicação intratumoral.

Também não foi realizado um grupo apenas com o Tween-80 pois este já é bastante utilizado até em concentrações maiores na clínica médica para diminuir a hidrofobicidade do Docetaxel, um quimioterápico muito aplicado por via endovenosa para tratamento de carcinomas em diferentes sítios. Todos os efeitos relatados são principalmente reações de hipersensibilidade, e em associação com o fármaco há também neutropenia e nefrotoxicidade, porém, não há sinergismo com o quimioterápico [75,91,92]. Em alguns casos, já foi observado alteração da captação do fármaco pelas células [92]. Da mesma maneira, o Cremophor, um outro surfactante não-iônico parecido com o Tween-80, é utilizado na clínica médica para solubilização de outro quimioterápico semelhante, o Paclitaxel que é administrado pela mesma via e os efeitos colaterais são semelhantes aos causados pelo Tween-80 [93]. Assim, considerando os efeitos já conhecidos a respeito da administração do surfactante em humanos, não foi realizado um grupo apenas com Tween-80.

Além dos efeitos biológicos observados e dos resultados obtidos por TFD, foi percebido que apenas o fotossensibilizante foi efetivo no tratamento tumoral, atuando também como um antitumoral. A média do volume tumoral deste grupo ficou pouco maior que a média do grupo TFD. Além disto foi alcançado 16,6% de remissão total e 33% de regressão parcial.

Comparando com os resultados obtidos pelos quimioterápicos existentes hoje para tratamento de outros carcinomas, é excelente. Por se tratar de carcinoma epidermóide de pele é ainda mais surpreendente pois o CEC de pele é muito resistente à quimioterapia, não existindo nenhum quimioterápico eficiente para tratá-lo, restando-se apenas a radioterapia ou cirurgia. Todavia, o resultado muitas vezes é desagradável já

que a maior ocorrência é no rosto e após a cirurgia é comum restarem deformidade. O que é recorrente na clínica é a aplicação de quimioterapia de indução, onde é usado a cisplatina para tornar o tumor mais sensível à radioterapia (radiossensibilizar). A cisplatina atua inibindo a síntese de DNA e é bastante usada para tratamento de cânceres de ovário e testículo além de carcinomas de bexiga, de pulmão, de tireoide, de cabeça e pescoço além de útero, estômago e pâncreas. Porém, ainda assim, a resposta ao tratamento de CEC de pele é baixo [94,101].

Desta maneira, a nano A é bastante promissora para tratamento do CEC, pois comparado ao controle, a redução do volume tumoral foi drástica, e o percentual de regressão total e parcial foi ótimo, equivalendo a 16% e 33% respectivamente. Estatisticamente o valor de $P < 0,0001$. Além destes percentuais, não houve nenhuma alteração histológica como tumefação turva, hemorragia, inflamação, necrose ou até mesmo esteatose no fígado, no baço, no rim, no pulmão e nos linfonodos cervicais, comprovando-se que o tratamento com a nanoemulsão não foi tóxica. Em corroboração a estes resultados, a análise das enzimas sanguíneas que predizem sobre as funções renais e hepáticas (transaminase pirúrvica e oxalacética, ureia, creatinina e fosfatase alcalina) mostrou que não houve alteração bioquímica significativa estatisticamente entre os grupos analisados, ou seja, não houve alteração da função destes órgãos pelo tratamento com a nano A. Além disto, o uso desta nanoemulsão e da TFD não implicou em perda de peso dos animais.

Este efeito biológico da nanoemulsão sozinha atuar como um antitumoral pode ser devido a vários fatores, mas principalmente devido à presença de várias substâncias bioativas que precisam ser estudadas. Já é sabido que o ácido oleico representa 60% da composição lipídica do óleo de açaí. Há relatos de que este ácido graxo de cadeia longa monoinsaturado apresenta-se bastante tóxico em vários modelos de células tumorais [95], podendo assim, estar relacionado ao efeito observado na regressão tumoral. O ácido palmítico é o ácido graxo saturado mais abundante encontrado no óleo de açaí, correspondendo a 22% [96]. Este ácido está diretamente relacionado à síntese de ceramidas, mediadores lipídicos bastante tóxicos [95]. A ceramida pode funcionar como um lipídio supressor de tumor limitando a proliferação da células cancerosas devido ao bloqueio do ciclo celular, além de provocar a autofagia das mesmas [97]. A ceramida também provê vários sinais efetores secundários que regulam diversos processos celulares, incluindo senescência celular alteração do ciclo e

diferenciação celular bem como induzindo apoptose, ativando enzimas envolvidas na cascata de sinalização de stress celular incluindo a regulação de proteínas quinase ativada por ceramida, fosfatase 1 e fosfatase ativada por ceramida. Proteínas tais que participam das vias de transdução de sinal e da citotoxicidade deste lipídio. Entretanto a indução de apoptose mediada por este esfingolipídio está mais associado à mitocôndrias, pela transição da permeabilidade mitocondrial ou pelo aumento da produção intracelular de ROS [95,97,98].

Além disto, há outros fatores que podem ter agido em sinergismo, melhorando o efeito do nano A. Como se trata de óleo natural vegetal, a concentração de flavonoides e ácidos graxos é alta. E, atualmente vem-se estudando muito dos efeitos destes sobre o comportamento de células tumorais. Assim, há vários estudos mostrando que a combinação de ácidos graxos pode aumentar os efeitos tóxicos sobre as células neoplásicas provocando apoptose das mesmas sem afetar as células normais. Em corroboração, os ácidos graxos insaturados diminuem a resistência das células aos agentes antitumorais além de serem seletivos na modificação do comportamento e na morte das células tumorais [95,99,100]. Por exemplo, já foi observado em estudos *in vivo* que o ácido linolênico e o ácido linoleico são responsáveis pela redução em tumores de mama e pulmão, respectivamente e o ácido eicosapentóico à inibição de crescimento tumoral em câncer de mama [99]. Assim, são necessários mais estudos a fim de que seja descoberto qual ácido graxo está diretamente relacionado ao efeito de regressão observado ou quais as moléculas estão associadas a este resultado.

Em associação a tudo que foi explicado até então, há também os efeitos oxidativos provocados a partir da peroxidação lipídica. Esta, inicia-se após a perda de um átomo de hidrogênio dos ácidos graxos insaturados, formando os radicais lipídicos que por sua vez, podem reagir com outros insaturados novamente formando uma reação em cadeia. Estes radicais peróxidos e superóxidos danificam o DNA e várias funções celulares [99]. Porém, o fato de não ter tratado 100% dos animais apenas com a droga, talvez seja devido ao número de aplicações ou à concentração do fármaco. Pode ser também devido fato de as células tumorais provenientes de carcinoma superexpressarem glicoproteína P, que está relacionada ao efluxo celular de fármacos quimioterápicos provocando resistência às drogas quimioterápicas [75,76,77].

Este trabalho utilizou como fármaco fotossensibilizante o óleo de açaí disperso em nanoemulsão. Estudos que utilizem produtos nacionais oriundos da nossa

biodiversidade são de suma importância pois valoriza a flora brasileira, movimentando a economia além de beneficiar a própria sociedade. No caso do açaí, segundo dados divulgados pelo governo do Pará, somente neste estado são produzidos 700 mil toneladas/ ano empregando mais de 300 mil pessoas equivalendo a 70 % da fonte de renda desta população. Além desta finalidade de consumo da polpa que emprega muitas pessoas para a obtenção do produto e que já é de conhecimento de todos, neste trabalho foi empregado outra finalidade para o subproduto do óleo da semente do açaí. Com as ferramentas da nanobiotecnologia, a veiculação deste óleo foi melhorada e ótimos resultados foram alcançados, otimizando o tratamento aplicado para CEC cuja aplicação é ambulatorial e o custo é baixo, favorecendo assim, a sociedade. Para elucidar melhor qual o efeito principal responsável pelos resultados obtidos, são necessários mais estudos.

CONCLUSÃO

- **Formulação e Caracterização**

Neste estudo, foi formulado e caracterizado uma nanoemulsão à base de óleo de açaí. A plataforma para esta formulação foi adequada, alcançando-se diâmetro de 74 nm e morfologia esférica, sendo favoráveis para a aplicação *in vitro* e *in vivo* tanto para via endovenosa quanto para aplicação tópica. A formulação também apresentou estabilidade por longo período quando armazenada à temperatura ambiente e à 7°, mantendo-se os valores de PDI, de potencial zeta além do diâmetro hidrodinâmico. Quanto às propriedades fotoquímicas, a nanoemulsão à base de óleo de açaí apresentou considerável geração de ROS quando irradiada com LED. Os espectros de absorbância e fluorescência coincidiram com a janela óptica tecidual.

funcionou como um bom fotossensibilizante para aplicação na terapia fotodinâmica contra carcinoma epidermóide humano, sendo responsável por 33% de regressão total. Este percentual é bastante relevante tendo em vista a resistência deste carcinoma à outros tratamentos aplicados hoje na clínica. Foi observado também durante o estudo que a nanoemulsão na ausência de irradiação apresentou efeito antitumoral 33% de regressão parcial.

- ***In vitro***

Dentre os tempos de incorporação da nano A analisados, conclui-se que são necessários quinze minutos para que haja maior incorporação pelas linhagens Detroit e A431.

A linhagem celular Detroit foi menos sensível em comparação com a neoplásica A431 quando irradiada com LED em concentrações de nano A aproximadamente iguais (4,25 mg/ml e 4,75 mg/ml).

- ***In vivo***

A nanoemulsão à base de óleo de açaí funcionou como um bom fotossensibilizante para aplicação na terapia fotodinâmica contra carcinoma epidermóide humano, sendo responsável por 33 % de remissão total. Este percentual é bastante relevante tendo em vista a resistência deste carcinoma à outros tratamentos aplicados hoje na clínica. Foi observado também durante o estudo que a nanoemulsão na ausência de irradiação apresentou efeito antitumoral sendo responsável por 33 % de remissão parcial e 16 % de remissão total. O tratamento utilizando a nanoemulsão não

foi tóxico aos animais não havendo alteração bioquímica das enzimas sanguíneas e nem histopatológica. Também não afetou o ganho de peso.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Instituto Nacional de Câncer José de Alencar Gomes da Silva (INCA). Estimativa 2012: Incidência de Câncer no Brasil, Rio de Janeiro, 2011.
2. Mallidi, S., G. P. Luke, et al. (2011). "Photoacoustic imaging in cancer detection, diagnosis, and treatment guidance." Trends Biotechnol 29(5): 213-221.
3. Hanahan,D; Weinberg, A.R. Hallmarks of cancer: Cell Press, EUA, v.144 (5), p.646-74, 2011.
4. Klaunig, Wang et al. 2011. Oxidative stress and oxidative damage in chemical carcinogenesis. Toxicology and Applied Pharmacology, v. 254, p.86 – 99, 2011.
5. Loggini,B.; Boldrini, L.;Gisfredi,S.; Ursino, S.; Camacci,T.; De Jeso,K.; Cervadoro, G.; Pingitore,R.; Barachini,P.; Leocata, P.; Fontanini,G. CD34 Microvessel Density and VEGF Expression in Basal and Squamous Cell Carcinoma. Pathology Research and Praticce, Itália, v.199, p. 705-712, 2003.
6. Ridky, T.W. Nonmelanoma skin cancer. J. Am. Scherer,D.; Kumar ,R. Genetics of pigmentation in skin cancer. Mutation Research,v. 705, p.141-153, 2010.
7. Payette,M.J.; Qhalen, J.; Grant-Kels,M. Nutrition and nonmelanoma skin cancers. Clinics in Dermatology, EUA,v.28, p 650-662, 2010.
8. Junqueira, L.C.; Carneiro,J. Histologia Básica.Guanabara Koogan, p.364, 2008.
9. Monzon, J. G. and J. Dancey (2012). "Targeted agents for the treatment of metastatic melanoma." Onco Targets Ther 5: 31-46.
10. Acad. Dermatol., EUA, v.57, n.3, p484-501, 2007.
11. Liang, C.H. et al. 5-epi- Sinuleptolide induces cell cycle arrest and apoptosis through tumor necrosis factor/mitochondria-mediated caspase signaling pathqay in humanskin cancer cells. Biochimica et Biophysica Acta, Taiwan, v.1820, p.1149-1157, 2012.
12. Athar, M. et al. Pathogenesis of nonmelanoma skin cancers in organ transplant recipients. Archives of Biochemistry and Biophysics, EUA, v.508, p.159- 163, 2011.
13. Gilmour, S.K. Polyamines and nonmelanoma skin cancer. Toxicology and Applied Pharmacology, EUA, v. 224, p.249-256, 2007.
14. Wolfle, U. et al. UVB-induced DNA damage, generation of reactive oxygen species, and inflammation are effectively attenuates by the flavonoid luteolin *in vitro* and *in vivo*. Fre Radical Biology & Medicine, Alemanha, v.50, p.1081 – 1093,2011.
15. Backvall, H., A. Asplund, et al. "Genetic tumor archeology: microdissection and genetic heterogeneity in squamous and basal cell carcinoma." Mutat Res 571(1-2): 65-79
16. Chinem,V.P.; Miot, H.A. Epidemiology of basal cell carcinoma.An Bras Dermatol,v.86, n.2, p.292-305, 2011.
17. Byekova, Y. A., J. L. Herrmann, et al. Liver kinase B1 (LKB1) in the pathogenesis of UVB-induced murine basal cell carcinoma. Arch Biochem Biophys, v. 508, n.2, p. 204-211, 2011.
18. Arora,A.; Attwood, J. Common skin cancers and their precursors. Surgical Clinics North America, EUA, v.89, p. 703 -712, 2009.
19. Scherer, D.; R. Kumar (2010). Genetics of pigmentation in skin cancer:a review. Mutat Res 705(2): 141-153.
20. Athar, M., S. B. Walsh, et al. (2011). "Pathogenesis of nonmelanoma skin cancers in organ transplant recipients." Arch Biochem Biophys 508(2): 159-16
21. McGuire, J. F., N. N. Ge, et al. (2009). "Nonmelanoma skin cancer of the head and neck I: histopathology and clinical behavior." Am J Otolaryngol 30(2): 121-133.

22. Payette, M. J., J. Whalen, et al. (2010). "Nutrition and nonmelanoma skin cancers." Clin Dermatol 28(6): 650-662.
23. Arora, A. and J. Attwood (2009). "Common skin cancers and their precursors." Surg Clin North Am 89(3): 703-712.
24. Tsatsou, F., M. Trakatelli, et al. (2012). "Extrinsic aging: UV-mediated skin carcinogenesis." Dermatoendocrinol 4(3): 285-297.
25. Shapira, A. et al. Nanomedicine for targeted cancer therapy: Towards the overcoming of drug resistance. Drug Resistance Updates, 14 (2011) 150– 163.
26. Steding-Jessen, M., F. Birch-Johansen, et al. (2010). "Socioeconomic status and non-melanoma skin cancer: A nationwide cohort study of incidence and survival in Denmark." Cancer Epidemiology 34(6): 689-695.
27. Garcia-Zuazaga, J. and S. M. Olbricht (2008). "Cutaneous Squamous Cell Carcinoma." Advances in Dermatology 24: 33-57.
28. Gilmour, S. K. (2007). "Polyamines and nonmelanoma skin cancer." Toxicol Appl Pharmacol 224(3): 249-256.
29. Vanharanta, S. and J. Massague (2012). "Field cancerization: something new under the sun." Cell 149(6): 1179-1181.
30. Backvall, A. et al. Genetic tumor archeology: microdissection and genetic heterogeneity in squamous and basal cell carcinoma. Mutation Research, v. 571 p. 65–79, 2005.
31. Wolfle, U., P. R. Esser, et al. (2011). "UVB-induced DNA damage, generation of reactive oxygen species, and inflammation are effectively attenuated by the flavonoid luteolin in vitro and in vivo." Free Radic Biol Med 50(9): 1081-1093.
32. Hu, B., E. Castillo, et al. (2012). "Multifocal epithelial tumors and field cancerization from loss of mesenchymal CSL signaling." Cell 149(6): 1207-1220.
33. Gerlini, G., P. Romagnoli, et al. (2005). "Skin cancer and immunosuppression." Crit Rev Oncol Hematol 56(1): 127-136.
34. Green, C.L.; Khavari, P.A. Targets for molecular therapy of skin cancer. Seminars in Cancer Biology, EUA, v.14, p.63-69, 2004.
35. Gilmore, T. NF-kB Transcription Factors. Departamento de Biologia, Boston University, EUA. Disponível em < <http://www.bu.edu/nf-kb/> >
36. Loggini, B.; Boldrini, L.; Gisfredi, S.; Ursino, S.; Camacci, T.; De Jeso, K.; Cervadoro, G.; Pingitore, R.; Barachini, P.; Leocata, P.; Fontanini, G. CD34 Microvessel Density and VEGF Expression in Basal and Squamous Cell Carcinoma. Pathology Research and Practice, Itália, v.199, p. 705-712, 2003.
37. Kargiotis, O.; Geka, A.; Kyritsis, A.P. Effects of irradiation on tumor cell survival, invasion and angiogenesis. Journal of Neuro-oncology, Grécia, v.100, n.3, p.323 - 338, 2010.
38. Brown, S.B.; Brown, E.A.; Walker, I. The present and future role of photodynamic therapy in cancer treatment. The Lancet Oncology, v.5, p. 497 – 508, 2004.
39. Massams, J.; Parkin, D.M.; Darby, S.C. The cancer burden in the United Kingdom in 2007 due to radiotherapy. International Journal of Cancer, v.129, p.2885- 2893, 2011.
40. Kargiotis, O.; Geka, A.; Kyritsis, A.P. Effects of irradiation on tumor cell survival, invasion and angiogenesis. Journal of Neuro-oncology, Grécia, v.100, n.3, p.323 - 338, 2010.

41. Papamichail, M. Combinatorial treatments including vaccines, chemotherapy and monoclonal antibodies for cancer therapy. *Cancer Immunology Immunotherapy*, Grécia, v.58, p.317 – 324, 2009.
42. Machado, A.E.H. Terapia fotodinâmica: Princípios, potencial de aplicação e perspectivas. *Química Nova*, Brasil, v.23, n.2, 2000.
43. Celli, J.P. et al. Imaging and photodynamic therapy: mechanisms, monitoring and optimization. *Chemical Reviews*, EUA, v. 110, p. 2795 -2838, 2010.
44. Dolmans, D.E.G.J.; Fukumura, D.; Jain, R.K. Photodynamic therapy for cancer. *Nature Reviews*, EUA, v. 3, 2003.
45. Nyst, H.J. et al. Is photodynamic therapy a good alternative to surgery and radiotherapy in the treatment of head and neck cancer? *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, Holanda, v. 6, p.3-11, 2009.
46. Paszko, E. et al. Nanodrug applications in photodynamic therapy. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, Irlanda, v. 8, p.14-29, 2011.
47. Plaetzer, K., et al. Photophysics and photochemistry of photodynamic therapy: fundamental aspects. *Journal of Lasers in Medical Sciences*, v.24, p. 259 – 268, 2009.
48. Firczuk, M.; Nowis, D.; Golab, J. PDT-induced inflammatory and host responses. *Photochemical & Photobiological Sciences*, v. 10, p.653-663, 2011.
49. Brackett, C.M.; Gollnick, S.O. Photodynamic therapy enhancement of anti-tumor immunity. *Photochemical & Photobiological Sciences*, v.10, p. 649 -652, 2011.
50. Nascimento, R.J.S. et al. Composição em ácidos graxos do óleo da polpa de açaí extraído com enzimas e com hexano. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 30, n. 2, p.498 -502, 2008.
51. Galotta, A.L.Q.A.; Boaventura, M.A.D. Constituintes químicos da raiz e da folha do açaí. *Química Nova*, v.28, n.4, p.610-613, 2005.
52. Favacho, H.A.S. et al. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Euterpe oleracea* oil. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.21, n.1, p.105-114, 2011.
53. Favacho, H. A. S., B. R. Oliveira, et al. (2011). "Anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Euterpe oleracea* Mart., Arecaceae, oil." *Revista Brasileira de Farmacognosia* 21(1): 105-114.
54. Pacheco-Palencia, L.A. et al. Absorption and Biological Activity of Phytochemical-Rich Extracts from Acai (*Euterpe oleracea* Mart.) Pulp and Oil in Vitro. *Agric. Food Chem.* V. 56, p.3593–3600, 2008.
55. Mertens -Talcott, S.U. et al. Induction of Cell Death in Caco-2 Human Colon Carcinoma Cells by Ellagic Acid Rich Fractions from Muscadine Grapes (*Vitis rotundifolia*). *J. Agric. Food Chem.* 2006, 54, 5336–5343.
56. Bechet, D. et al. Nanoparticles as vehicles for delivery of photodynamic therapy agents. *Cell Press*, v.26, n.11, 2008.
57. Vargas, A. et al. In vivo photodynamic activity of photosensitizer-loaded nanoparticles: Formulation properties, administration parameters and biological issues involved in PDT outcome. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 69 (2008) 43–53.
58. Muller, R.H.; Mader, K.; Gohla, S. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery – a review of the state of the art. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v.50, p.161 -177, 2000.

59. Barry, B.W. Novel mechanisms and devices to enable successful transdermal drug delivery. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.14, p.101 -114, 2001.
60. Maruno, M. Desenvolvimento da nanoemulsões à base de óleo de gergelim aditivadas de óleo de framboesa para queimaduras da pele. 2009.158p. Tese (Doutorado em ciências Farmacêuticas). Universidade de São Paulo, Riberão Preto. 2009.
61. Tadros, T. et al. Formation and stability of nano-emulsions. *Advances in Colloid and Interface Science*, n.108-109, p.303 -318, 2003.
62. Fernandez, P. et al. Nanoemulsion formation by emulsion phase inversion. *Colloids and Surfaces A: Physicchemi. Eng. Aspects*, Alemanha, v.251, p.53 -58, 2004.
63. Aubrun, O.S.; Simonnet, J.T.; Alloret, F.L. Nanoemulsions: a new vehicle for skincare products. *Advances in Colloid and Interface Science*, França, n. 108-109, p. 145 -149 , 2004.
64. Solans, C. et al. Nanoemulsions. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, Espanha, v. 10, p. 102-110, 2005.
65. Sharman, W.M. et al. Photodynamic therapeutics: Basic principles and clinical applications. *Drug Discovery Today*, v.4, n. 11, p.607 -617, 1999.
66. Schuh JCL. Trials, Tribulations, and Trends in Tumor Modeling in Mice. *Toxicologic Pathology*. 2004;32(53-66).
67. Anton, N.; Vandamm, T.F. Nano-emulsions and Micro -emulsions: Clarifications of the Critical Differences. *Pharm Res.*, v.28, p.978-985, 2011.
68. Bicalho, L.S. Remissão completa de tumores de língua induzidos com células do tumor de Ehrlich por meio da Terapia Fotodinâmica mediada pela Alumínio-clorofitalocianina em formulação lipossomal. 2010. 106p. Dissertação (mestrado em Ciências da Saúde). Universidade de Brasília, Brasília. 2010.
69. Chan, W.S. et al. Effect of Sulfonation on the Cell and Tissue Distribution of the Photosensitizer Aluminum Phthalocyanine. *Cancer Research*, v.50, p.4533 -4538, 1990.
70. Nunes, S.M.T. Photophysical studies of zinc phthalocyanine and chloroaluminum phthalocyanine incorporated into liposomes in the presence of additives. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 37, p. 273 – 284, 2004.
71. Gutiérrez, J.M. et al. Nano-emulsions: New applications and optimization of their preparation. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, v. 13, p. 245 – 251, 2008.
72. Rossetti, F.C. Nanodispersões de cristais líquidos como sistemas de liberação de fotossensibilizadores na terapia fotodinâmica do câncer de pele: avaliação in vitro e in vivo da permeação e retenção cutâneas. 2010. 116p. Tese (doutorado em Ciências Farmacêuticas) Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.
73. Gupta, S.; et al. Research Non-monotonic changes in clonogenic cell survival induced by disulphonated aluminum phthalocyanine photodynamic treatment in a human glioma cell line. *Journal of Translational Medicine*, v.8, n.43, p.1-14, 2010.
74. Glidden, M. D. et al. Image-Based Quantification of Benzoporphyrin Derivative Uptake, Localization, and Photobleaching in 3D Tumor Models, for Optimization of PDT Parameters. *Theranostics* 2012; 2(9):827-839.

75. Yan, Y.D. et al. Enhanced oral bioavailability of docetaxel in rats by four consecutive days of pre-treatment with curcumin. *International Journal of Pharmaceutics* 399 (2010) 116–120.
76. Cabral, F. et al. Future directions with taxane therapy. *Hematology/oncology clinics of north america*, v.13, n.1, 1999 .
77. Johnstone, R.W. et al. Apoptosis: A Link between Cancer Genetics and Chemotherapy. *Cell*, v.108, 153–164, 2002.
78. Curi, R. et al. Entendendo a Gordura os ácidos graxos. *Manole*, capítulo 8, 2002.
79. Lins, R.D.A.U. et al. Efeitos bioestimulantes do laser de baixa potência no processo de reparo. *Na Bras Dermatol.* 85(6): 849-55, 2010.
80. Henderson, B.W. et al. Fluence rate as a modulator of PDT mechanisms. *Lasers in Surgery and Medicine* 38:489–493, 2006.
81. Busch, T.M. Increasing Damage to Tumor Blood Vessels during Motexafin Lutetium-PDT through Use of Low Fluence Rate. *Radiat Res.* 174(3): 331–340, 2010.
82. Babilas, p. et al. Effects of light fractionation and different fluence rates on photodynamic therapy with 5-aminolaevulinic acid in vivo. *British Journal of Cancer* v. 88, 1462 – 1469, 2003.
83. Hunter KW Hollingshead M G Anti tumor efficacy testing in rodents. *JNaTI Cancer Inst* 2008; 100: 1500-10. Mouse models of cancer: does the strain matter? *Nature Reviews*, 2012; 12: 144-9
84. Myers, F. Christopher Holsinger, Samar A. Jasser, et al. An Orthotopic Nude Mouse Model of Oral Tongue Squamous Cell Carcinoma. *Clin Cancer Res* 8:293-298, 2002.
85. Sano D; Myers, Xenograft models of head and neck cancers. *Head & Neck Oncology*, 1:32, 2009.
86. Schuh, JCL Trials, Tribulations, and Trends in Tumor Modeling in Mice. *Toxicol Pathol*, 32: 53- 66, 2004.
87. Niho, S. et al. Phase II study of docetaxel and cisplatin administered as three consecutive weekly infusions for advanced non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 35,209 – 214, 2002.
88. Gelmon, K. The taxoids: paclitaxel and docetaxel. *The Lancet*, v. 344, 1994.
89. Otová, B. et al. Effects of paclitaxel, docetaxel and their combinations on subcutaneous lymphomas in inbred Sprague–Dawley/Cub rats. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* v.29, 442–450, 2006.
90. Hallouard, F. et al. Iodinated nano-emulsions as contrast agents for preclinical X-ray imaging: Impact of the free surfactants on the pharmacokinetics. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* v.83,54–62,2013.
91. Wang, L. et al. Docetaxel-loaded-lipid-based-nanosuspensions (DTX-LNS): Preparation, pharmacokinetics, tissue distribution and antitumor activity. *International Journal of Pharmaceutics* 413,194– 201, 2011.
92. Bae, W.K. et al. Docetaxel-load ed thermoresponsive conjugated linoleic acid-incorporated poloxamer hydrogel for the suppression of peritoneal metastasis of gastric cancer. *Biomaterials* 34, 1433-1441, 2013.
93. Yang, X.Y. et al. Hyaluronic acid-coated nanostructured lipid carriers for targeting paclitaxel to cancer. *Cancer Letters* 334, 338–345, 2013.
94. Galbiatti, A.L.S. et al. Câncer de cabeça e pescoço: causas, prevenção e tratamento. *Brazilian Journal of Otorhinolaryngology*, v.79, n.2, 2013.
95. Curi, R. et al. Entendendo a Gordura os ácidos graxos. *Manole*, capítulo 24, 2002.

96. Pereira, N.S. Estudo comparativo entre PS/ β -Caroteno e PS/ ácido oleico com PS/óleo de buriti (*Mauritia flexuosa*) e preparação e caracterização dos materiais PS/ óleo de açaí (*Euterpe oleracear* Mart), 2008.91p. Dissertação (mestrado em química). Universidade de Brasília, Brasília, 2008.
97. Morad, S.A.F.; Cabot, M.C. Ceramide-orchestrated signalling in cancer cells. *Nature reviews cancer*, V.13, p 51 – 65, 2013.
98. Robertson, C.A. et al. Photodynamic therapy (PDT): A short review on cellular mechanisms and cancer research applications for PDT. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 96 (2009) 1–8.
99. Jiang, W. G. et al. Essential fatty acids: molecular and cellular basis of their anti-cancer action and clinical implications. *Critical Reviews in Oncology: Hematology* 27 (1998) 179 – 209.
100. Pardini, R.S. Nutritional intervention with omega-3 fatty acids enhances tumor response to anti-neoplastic agents. *Chemico-Biological Interactions* 162 (2006) 89–105.
101. Engels, F.K.; Verweij, J.V. Docetaxel administration schedule: From fever to tears? A review of randomised studies. *European Journal of Cancer* 41 (2005) 1117–1126.
102. Marcus, C.D. et al. Imaging techniques to evaluate the response to treatment in oncology: Current standards and perspectives. *Critical Reviews in Oncology/ Hematology* v.72, p. 217–238, 2009.
103. A importância do açaí no context economic, social e ambiental do estado do Pará. 6ª Reunião Ordinária da Comissão Nacional de Fruticultura . Secretaria de Estado de Agricultura, Governo do Estado do Pará, 2011.
104. Wang, Y.; Chen, L. Quantum dots, lighting up the research and development of nanomedicine. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, v.7 p. 385– 402, 2011.
105. Shapira, A. et al. Nanomedicine for targeted cancer therapy: Towards the overcoming of drug resistance. *Drug Resistance Updates*, v.14, p.150– 163, 2011.
106. Matsuzaki, W.S. et al. Use of the chemosensitivity test to choose appropriate adjuvant chemotherapy for advanced gastric cancer. *V. 33, n. 4*, 2006.