



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

Victoria Monge-Fuentes

Terapia Fotodinâmica mediada por nanoemulsão à base de óleo
de açaí (*Euterpe oleracea* Martius) para o tratamento de
melanoma *in vitro* e *in vivo*.

Brasília, DF

Maio, 2014



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

Victoria Monge-Fuentes

Terapia Fotodinâmica mediada por nanoemulsão à base de óleo de açaí (*Euterpe oleracea* Martius) para o tratamento de melanoma *in vitro* e *in vivo*.

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal da Universidade de Brasília, como requisito para obtenção do título de Doutor em Biologia Animal.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Bentes de Azevedo

Brasília, 2014

*Dedico este trabalho ao meu amado marido
e aos meus queridos pais, exemplos de
superação, persistência e dedicação.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, Nossa Senhora dos Anjos e ao Espírito Santo pelo presente da vida, a saúde, a força e inspiração para correr atrás dos meus sonhos. Obrigada meu Deus, por colocar tantas pessoas boas no meu caminho!

Ao meu amado esposo, Bento.... você foi parte fundamental de cada etapa vivida deste doutorado. Obrigada pela constante motivação para continuar adiante, tanto nos momentos bons como nos ruins. Obrigada pelo carinho, conselhos, apoio e por me ajudar a superar os obstáculos encontrados durante esta pesquisa. Em fim, obrigada por cuidar de mim, sempre. E na reta final, obrigada pela paciência, compreensão e pelos *insights* quando eu já não conseguia pensar em mais nada!

Aos meus pais, Victor e Lucía, por ser essa fonte inesgotável de apoio, motivação, e amor. Obrigada por todas as oportunidades proporcionadas durante toda a minha vida...todos esses caminhos convergiram até esta nova meta. Na etapa final, obrigada pela compreensão, paciência, torcida e por acreditar em mim.

Aos meus irmãos, Monica e Victor, minha sobrinha, Emily e ao Angel pela motivação, apoio, carinho e amizade de sempre!

Ao Kolbie, meu fiel companheiro! Obrigada pela companhia, em especial nessa reta final de dias, noites e madrugadas em vela de interminável trabalho! Que bom que você faz parte da nossa vida!

Aos membros das famílias Fuentes, Monge, Fernandes, Bueno, Machado, Stoop e Javelle pelo interesse no meu trabalho, orações e pela torcida.

Ao meu Abuelo Victor e minhas Abuelas Cecilia e María que faleceram durante o período do meu doutorado, obrigada por terem nos incentivado a dar o nosso melhor, procurar a superação pessoal e profissional, e pelo exemplo de luta, integridade e responsabilidade que vocês deram para os meus pais, para mim e para o resto da família.



A construção desta tese de doutorado somente foi possível mediante a contribuição de muita gente especial. Foram tantos grãos de areia colocados por tantas pessoas.... realmente me sinto extremamente grata por ter tido a oportunidade de conviver com pessoas que não mediram os esforços para me ajudar e pelo conhecimento que cada um generosamente compartilhou comigo.

Agradeço ao Professor Dr. Ricardo Bentes de Azevedo, pela importante oportunidade dada e pelo conhecimento compartilhado neste tempo todo.

À querida amiga e Professora Dra. Jaqueline Rodrigues da Silva, não tenho palavras para agradecer por tudo que você fez por mim desde que te conheço. Obrigada por me socorrer sempre, em especial nos momentos de desespero, em que mais precisei de uma luz, e pela amizade incondicional. Realmente me sinto privilegiada por ter aprendido tanto contigo. Agradeço a Deus por ter te colocado no meu caminho. Você é um exemplo de garra e superação. Te admiro muito!

Ao Professor Dr. João Paulo Longo, pelo essencial auxílio nas etapas referentes aos experimentos com Terapia Fotodinâmica. Obrigada por todas as ideias compartilhadas, *insights* e disponibilidade em esclarecer meus constantes questionamentos.

Ao Professor Dr. Luis Alexandre Muelhmann, por todo o conhecimento compartilhado na área de síntese de nanoemulsões e terapia fotodinâmica. Obrigada pelos conselhos, apoio e amizade.

À querida Dra. Maria Luiza Fascineli pela alegria, amizade, disponibilidade e por todo o apoio dado no planejamento e execução dos experimentos *in vivo* e pelo auxílio com a análise estatística.

Jaque, JP, Luis e MariLu, vocês foram os quatro pilares desta tese. Certamente, sem vocês esta pesquisa não teria se concretizado. Terei gratidão eterna por isso!

À querida e gentil Dona Zélia, agradeço por cada sorriso, profissionalismo e competência, e pela enorme vontade de ajudar todo mundo e querer que as coisas funcionem melhor para o bem comum. Obrigada por ter facilitado tantas coisas!

À Professora Graziella Joanitti pela longa amizade, palavras de ânimo e excelentes ideias. Você é um dos meus maiores exemplo de persistência, superação e dedicação.

A mi amiga Paolín Cáceres, gracias por tu linda amistad y todo el apoyo. Agradeço enormemente pelo auxílio dado na micrografia eletrônica da nanoemulsão.

A la Professora Dra. Patrícia Escobar, muchas gracias por viajar desde Colombia para participar de mi defensa, pero más aún te agradezco por tu valiosa amistad, por las “jaladitas” de oreja que con tanto cariño me distes, porque sé que me aprecias y me deseas el bien. Gracias por todos tus consejos y enseñanzas.

Aos colegas do Laboratório de Nanobiotecnologia, em especial à Ana Lygia Câmara pela amizade, confiança, palavras de ânimo e por ter me ajudado nos experimentos de citometria de fluxo.

À Ludmilla Souza pela motivação, amizade, simpatia, carinho e pelos valiosos *insights*.

À Mayara Simonelly pela amizade, carinho e companhia na sala de cultivo.

Ao Djalma por suas engenhosas e criativas ideias e pela ajuda na área de procedimentos histológicos. Você é o cara da histologia! Continue adiante com as suas metas!

À Dra. Renata Carvalho, minha colega de nanoemulsões e de experimentos realizados em altas horas...obrigada por todo o conhecimento e experiência compartilhados. Obrigada pela amizade e momentos de descontração.

À Karen Rappa Py-Daniel, por suas ideias geniais que mais de uma vez salvaram meus experimentos. Obrigada pela amizade e interessantes discussões.

Ao Senhor Consul Honorário da Costa Rica em São Paulo, Victor Abbud, pelo gentil e constante interesse nas minhas pesquisas desde meu início como pesquisadora, pela generosidade e apoio dados.

Aos colegas do laboratório: Diego Iocca, Raphael, Ana Paula, Fred, Júlio, Matheus, Sebastian, Mosar, obrigada pelo apoio, companhia e momentos de descontração. Aprendi muito pela convivência com vocês.

À Professora Zulmira Lacava por ter colocado o seu laboratório e equipamentos a disposição. E aos alunos deste laboratório em especial à Laise Andrade e ao César Romero pela amizade, almoços, discussões e auxílio nos meus experimentos.

À Dra. Livia Carneiro pela amizade e pelos valiosos conhecimentos compartilhados em relação aos modelos de melanoma. Obrigada por compartilhar teu conhecimento e experiência comigo. Teus ensinamentos foram fundamentais para o andamento dos meus experimentos *in vivo*.

Aos amigos e colegas Wania Guimarães, Mariana Roll, José Souza, William Junior, Jivago, pelo apoio, amizade e simpatia. Ao Professor César Grisólia por ter colocado o seu laboratório e equipamentos a disposição.

Ao Professor Dr. Luciano Paulino da Silva pela amizade, conselhos e pelas dúvidas esclarecidas.

Ao Professor Dr. Paulo Souza do Instituto de Física, primeiramente por ter montado o LED, indispensável nos estudos aqui conduzidos e pela disponibilidade em esclarecer conceitos e termos que para nós, biólogos, as vezes resultam tão enigmáticos.

Ao Professor Dr. Rivadávio Amorim e à Profª. Dra. Fabiana Pirani Carneiro, patologistas, ambos da Faculdade de Medicina da UnB, pela cordialidade, profissionalismo, disponibilidade e pela completa análise histopatológica realizada.

À Professora Dra. Carol Lucci e à aluna Ellen Cristina Rivas Leonel pelo auxílio com as análises estatísticas dos experimentos *in vitro*.

Ao Professor Dr. Wilson Peternele pela amizade, confiança e ensinamentos na área de síntese e caracterização de nanomateriais.

À Professora Dra. Daniela Mara de Oliveira e às suas alunas Daniela e Luisa, pelo apoio e amizade.

Ao Professor Dr. Sacha Braun pelas interessantes discussões na área de processamento histológico.

À Janaína Gomes, por toda a atenção e cuidado dispensados aos camundongos que participaram deste estudo.

À Dra. Zuleide do Laboratório de Micologia do Departamento de Fitopatologia pela cordialidade e toda a assistência dada na criomicrotomia do tecido tumoral.

À Daniela da Secretaria do Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal pela competência e eficiência que tanto facilitou a minha vida e pela cordialidade.

Ao Laboratório Clínico, SABIN, pela análise de amostras para obtenção de dados hematológicos, e em especial à Paula Maestri, do Núcleo de Apoio à Pesquisa, por ter facilitado tão gentilmente todo esse processo.

À Universidade de Brasília, minha segunda casa, por todas as oportunidades e contribuição na minha superação profissional.

Ào CNPq pelo essencial auxílio financeiro.

E às demais pessoas que de uma ou outra forma fizeram parte desta empreitada.

RESUMO

O melanoma é um tipo de câncer de pele que tem origem nos melanócitos. Embora o melanoma seja responsável por apenas 4% de todos os tipos de câncer de pele, ele é o mais agressivo, uma vez que possui um alto potencial metastático, causando a morte de 80% dos pacientes portadores dessa doença. Perante a necessidade de desenvolver terapias mais eficazes, estudos propõem a Terapia Fotodinâmica (TFD) como uma promissora modalidade terapêutica que utiliza três elementos essenciais: um fotossensibilizante (FS), luz em um comprimento de onda específico e oxigênio, reagindo conjuntamente para produzir espécies reativas de oxigênio que em última instância causam a morte celular das células e tecidos-alvo. Considerando as propriedades terapêuticas e o potencial fotoquímico do óleo de açaí, este foi usado como fotossensibilizante. Porém, a sua natureza hidrofóbica dificulta sua aplicação biológica, portanto foi usada uma abordagem nanotecnológica para permitir seu uso no tratamento contra o câncer. No presente trabalho objetivou-se desenvolver uma nanoemulsão contendo gotículas de óleo de açaí (NanoA) como fotossensibilizante para investigar os efeitos da TFD *in vitro* e *in vivo* no tratamento do melanoma. Uma vez preparada a NanoA, foi feita a sua caracterização físico-química, fotofísica e fotoquímica. A irradiação ($\lambda=660$) do óleo de açaí livre e em nanoemulsão mostrou que ambos possuem capacidade de geração de espécies reativas de oxigênio, comprovando a sua atividade fotoquímica. A caracterização físico-química da NanoA mostrou um diâmetro hidrodinâmico médio de 117,5 nm para cada nanogotícula, índice de polidispersão de 0,144 e potencial zeta de -0,536 mV, evidenciando características desejáveis para seu uso biológico. Os espectros de absorvância e de fluorescência apontaram que a NanoA apresenta pico de absorção em 666 nm (região do vermelho) e de emissão em 670 nm. Microscopia eletrônica de transmissão mostrou gotículas com diâmetro médio de 74 nm, morfologia esférica e baixa polidispersão. Para os testes *in vitro* foram utilizadas duas linhagens celulares imortalizadas: NIH/3T3 (fibroblasto murino não tumoral) e B16F10 (melanoma murino). Em ensaios de citotoxicidade sem irradiação, utilizaram-se diversas concentrações da NanoA, com vários tempos de exposição, com o objetivo de identificar as condições que inibem 10% da viabilidade (CC10) de células não tumorais, mostrando uma CC10 equivalente a 617,00 $\mu\text{g/mL}$ pelo tempo de exposição de 15 minutos. Citotoxicidade sem irradiação, avaliada por ensaio colorimétrico de MTT, foi tempo e dose dependente. Para testar os efeitos da TFD, as células foram expostas à NanoA na concentração de 617,00 $\mu\text{g/mL}$ por 15 minutos e irradiadas com as fluências de 12,9 J/cm^2 , 25,9 J/cm^2 e 51,8 J/cm^2 . Resultados mostraram que as células tumorais tratadas com NanoA na concentração de 617,00 $\mu\text{g/mL}$ e irradiadas com fluência de 25,9 J/cm^2 apresentaram as menores porcentagens de viabilidade (15%), enquanto que as células não tumorais sob as mesmas condições mantiveram uma viabilidade de 70%. Análises de citometria de fluxo determinaram que a maioria das células que perderam a sua viabilidade devido ao tratamento com TFD mostraram dupla marcação, com anexina V e iodeto de propídeo, indicando possível morte por apoptose tardia/necrose, dado corroborado pela externalização da fosfatidilserina e pelas mudanças de tamanho e granulosidade observadas. Experimentos *in vivo* em camundongos C57BL/6 mostraram que a TFD aplicada cinco vezes com concentração de NanoA de 50 mg/mL e fluência de 25,9 J/cm^2 teve redução do volume tumoral dos animais equivalente a 82%, mostrando grandes áreas de necrose no tecido tumoral, quando comparado com o volume tumoral e histopatologia dos animais do grupo controle com tumor. Diante do exposto, o óleo de açaí contido na NanoA apresentou características fotofísicas, fotoquímicas e físico-químicas favoráveis para o seu uso como FS para a TFD com aplicação em sistemas biológicos. O tratamento com TFD *in vitro* mostrou uma redução de 85% na viabilidade celular das células de melanoma, enquanto manteve uma alta viabilidade (70%) das células normais, e no caso de camundongos com tumor tratados com TFD foi observada uma redução de 82% no volumen tumoral, mostrando a eficácia *in vivo* do tratamento investigado.

Palavras chave: terapia fotodinâmica, óleo de açaí, melanoma, nanoemulsão, fotossensibilizante, nanobiotecnologia, cancer de pele.

ABSTRACT

Melanoma is a type of skin cancer that originates in the melanocytes. Even though melanoma accounts for only 4% of all dermatologic cancers, it remains responsible for 80% of deaths from skin cancer due to its high metastatic potential. Regarding this, there is the need to develop new and more efficient types of therapies. Photodynamic Therapy (PDT) is a promising new cancer treatment that makes use of three essential elements: photosensitizer (PS), light of a particular wavelength, and oxygen, which react ultimately causing cell death. Considering the therapeutic properties and photochemical potential already described in other studies, açai oil was explored as a PS for PDT. However, high hydrophobicity characteristic of açai oil difficult its efficient biological application. For this reason, nanotechnological solutions were explored, incorporating açai oil in nanoemulsions (NanoA) to be used along with PDT for *in vitro* and *in vivo* melanoma treatment. Once the NanoA was formulated, we proceeded to its physicochemical, photophysical and photochemical characterization. Free and nano-incorporated açai oil were irradiated ($\lambda=660$) showing their capacity to generate singlet oxygen, proving their photochemical activity. NanoA physicochemical characterization showed an average hydrodynamic diameter of 117.5 nm, polydispersity index of 0.144 and zeta potential of -0.536 mV, exhibiting desirable characteristics for its biological application. Absorbance and fluorescence spectra showed absorbance peak at 666 nm (red region of spectrum) and emission at 670 nm. Transmission electron microscopy showed spherical and similar sized nanodroplets (average diameter of 74 nm), confirming low polydispersity. *In vitro* tests were performed using two immortalized cell lines: NIH/3T3 (normal murine fibroblast) and B16F10 (murine melanoma). Dark cytotoxicity studies used several NanoA concentrations with different exposition times in order to determine the concentration that kills only 10% (CC10) of normal cells. Results revealed CC10 equivalent to 617 $\mu\text{g/mL}$ when exposed for 15 minutes. Cytotoxicity in the dark evaluated by colorimetric MTT assay was a time and concentration dependent event. In order to test PDT *in vitro*, cells were exposed to NanoA in the concentration of 617 $\mu\text{g/mL}$ for 15 minutes and then irradiated with fluence values of 12.9 J/cm^2 , 25.9 J/cm^2 and 51.8 J/cm^2 . MTT results revealed that melanoma cells treated with 617 $\mu\text{g/mL}$ and irradiated with 25.9 J/cm^2 presented viability results of 15%, while normal cells treated under the same conditions maintained a 70% viability. Flow cytometry results showed that most cells that lost their viability due to PDT treatment were double marked by annexin V and propidium iodide, event that occurs when cells die by late apoptosis/necrosis. This was evidenced by externalization of phosphatidylserine and morphological changes in cell size and granularity as seen by light scatter flow cytometry. *In vivo* experiments with C57BL/6 mice showed that tumor bearing animals treated five times by PDT with NanoA concentration of 50 mg/mL and fluence of 25.9 J/cm^2 showed a tumor volume reduction of 82% with considerable number of necrotic areas in tumor tissue, in comparison to animals in control group. Overall, açai oil in NanoA presented favorable photophysical, photochemical, and physico-chemical, characteristics for its use as PS for PDT with application in biological systems. PDT treatment with NanoA in melanoma cells showed an 85% cell viability reduction, while maintaining normal cell viability high (70%), and an 82% tumor volume reduction in tumor bearing mice treated with PDT, proving the *in vivo* efficacy of the investigated treatment.

Keywords: photodynamic therapy, açai oil, melanoma, nanoemulsion, photosensitizer, nanobiotechnology, skin cancer.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2014, por sexo, exceto câncer de pele não melanoma. Fonte: Instituto Nacional do Câncer (INCA), Estimativa Câncer, 2014.

Figura 2. Processo de transformação dos melanócitos em casos de melanoma.

Figura 3. Etapas da Terapia Fotodinâmica (TFD).

Figura 4. Diagrama ilustrando os principais eventos que conduzem às fotoreações do tipo I e II que em última instância levam ao dano oxidativo celular.

Figura 5. Contribuição dos diferentes compostos para a densidade óptica dos tecidos biológicos.

Figura 6. (A) Palmeira de açazeiro *Euterpe oleracea* Martius (Arecaceae). **(B)** Detalhe do fruto de açai.

Figura 7. Nanomateriais frequentemente usados no campo da nanomedicina aplica à oncologia.

Figura 8. Esquema estratégico de um tipo de nanopartícula multifuncional para o tratamento do melanoma.

Figura 9. Diagrama esquemático de nanoemulsão do tipo óleo em água (O/A), tal como a NanoA sintetizada a partir de óleo, água e surfactante.

Figura 10. Representação esquemática do sistema utilizado para determinar a potência (mW) da fonte de diodo emissor (LED) conforme variação na distância frontal (cm) entre o LED e o detector de luz.

Figura 11. Delineamento experimental ilustrando a metodologia utilizada em cada etapa da pesquisa.

Figura 12. Sequência de etapas envolvidas no teste de citotoxicidade na ausência de luz da NanoA em células não tumorais NIH/3T3 e células de melanoma B16F10 expostas à nanoemulsão em diversas concentrações para os tempos de 24 e 48h.

Figura 13. Sequência de etapas envolvidas no teste de citotoxicidade da NanoA na ausência de luz em células não tumorais NIH/3T3 e células de melanoma B16F10 expostas à nanoemulsão nas concentrações de 5.555,00; 1.851,00; 617,00; 205,00; 68,00 µg/mL por 15 minutos.

Figura 14. Disposição do plaqueamento das células segundo o tipo de tratamento realizado no ensaio de TFD *in vitro*.

Figura 15. Disposição das placas segundo o tipo de tratamento realizado para análise de morte celular nas células NIH/3T3 e B16F10 pelo método de citometria de fluxo.

Figura 16. Cronograma experimental praticado no experimento piloto para Terapia Fotodinâmica.

Figura 17. Cronograma experimental praticado no experimento para Terapia Fotodinâmica.

Figura 18. Camundongo C57BL/6 portador de tumor de melanoma.

Figura 19. Espectro de emissão da fonte de diodo emissor de luz (LED) com pico máximo em 660 nm.

Figura 20. Diâmetro hidrodinâmico médio e índice de polidispersão da NanoA com proporção de óleo de açaí para tensoativo Tween-80 equivalente a 1:3, com até quatro ciclos de inversão de fase.

Figura 21. Diâmetro hidrodinâmico médio e índice de polidispersão da NanoA com proporção de óleo de açaí para tensoativo Tween-80 equivalente a 1:4, com até quatro ciclos de inversão de fase.

Figura 22. Diâmetro hidrodinâmico médio e índice de polidispersão da NanoA com proporção de óleo de açaí para tensoativo Tween-80 equivalente a 1:5, com até quatro ciclos de inversão de fase.

Figura 23. Espectro de absorvância do óleo de açaí, com pico de absorção em 666 nm.

Figura 24. Espectro de fluorescência (excitação em 350 nm) do óleo de açaí com pico de emissão em 670 nm.

Figura 25. Teste do benzofurano para comprovação de geração de espécies reativas de oxigênio pelo óleo de açaí ao ser irradiado por fonte diodo emissor de luz em diferentes doses de energia na presença de oxigênio molecular.

Figura 26. Distribuição de valores de diâmetro hidrodinâmico para a nanoemulsão contendo nanogotículas de óleo de açaí. As colunas representam a média \pm E.P.M. para três medidas realizadas em uma mesma amostra.

Figura 27. Distribuição gaussiana da frequência de tamanhos das nanogotículas contidas na NanoA.

Figura 28. Espectro de absorvância da NanoA e do óleo de açaí com pico de absorção em 666 nm.

Figura 29. Espectro de fluorescência da NanoA e do óleo de açaí com pico de emissão em 670 nm.

Figura 30. Eletromicrografia de transmissão das nanogotículas de óleo de açaí (esferas em cinza claro) em nanoemulsão (NanoA).

Figura 31. Teste de degradação do benzofurano-¹O₂-dependente para detecção de geração de espécies reativas de oxigênio pelo óleo de açaí associado à NanoA e pelo controle branco, Tween-80, ao serem irradiados por fonte diodo emissor de luz ($\lambda = 660$ nm) em diferentes doses de energia na presença de oxigênio.

Figura 32. Avaliação da estabilidade do diâmetro hidrodinâmico e do índice de polidispersão de alíquotas de NanoA armazenadas por 0, 3, 7, 15, 22, 30, 45, 60, 90, 180 e 365 dias após preparo e mantidas a 7 °C e à temperatura ambiente.

Figura 33. Efeito dose e tempo dependente de diversas concentrações de NanoA na ausência de irradiação em células murinas não tumorais da linhagem NIH/3T3 e células tumorais murinas B16F10 tratadas por 24 e 48 horas.

Figura 34. Efeito dose-dependente das concentrações de NanoA variando entre 68,00 e 16.666,00 $\mu\text{g/mL}$ em células murinas não tumorais da linhagem NIH/3T3 e células tumorais murinas B16F10 tratadas por 15 minutos.

Figura 35. Efeito da Terapia Fotodinâmica em células murinas não tumorais da linhagem NIH/3T3 tratadas com NanoA [617 $\mu\text{g/mL}$] por 15 minutos e em seguida irradiadas com diferentes fluências.

Figura 36. Efeito da Terapia Fotodinâmica em células murinas tumorais da linhagem B16F10 tratadas com NanoA [617 $\mu\text{g/mL}$] por 15 minutos e irradiada com diferentes fluências.

Figura 37. Análise morfológica por microscopia de contraste de fase de células normais e tumorais após tratamento com Terapia Fotodinâmica.

Figura 38. Avaliação por citometria de fluxo do tamanho e granulosidade (FSC e SSC) de células NIH/3T3.

Figura 39. Avaliação por citometria de fluxo do tamanho e granulosidade (FSC e SSC) de células B16F10.

Figura 40. Avaliação da morte celular por citometria de fluxo de células NIH/3T3, após exposição a diferentes amostras.

Figura 41. Avaliação da morte celular por citometria de fluxo de células B16F10, após exposição a diferentes amostras.

Figura 42. Análise por microscopia de fluorescência da presença de aglomerados de gotículas de óleo de açaí na pele de camundongos, 30 minutos após administração intratumoral.

Figura 43. Evolução do peso corporal em função do tempo em camundongos C57BL/6 controle sem tumor (Controle negativo) e portadores de tumor (Controle

tumor) submetidos a tratamento com PBS, NanoA [617 $\mu\text{g/mL}$], fonte diodo emissor de luz (LED) e Terapia Fotodinâmica (TFD) [NanoA: 617 $\mu\text{g/mL}$ e LED: 25,9 J/cm^2].

Figura 44. Variação do volume tumoral *in vivo* em camundongos C57BL/6 com melanoma em função do tratamento com Terapia Fotodinâmica (TFD) [NanoA: 617 $\mu\text{g/mL}$ e LED: 25,9 J/cm^2].

Figura 45. Variação do volume tumoral *ex vivo* em camundongos C57BL/6 com melanoma em função dos tratamentos aplicados segundo o grupo experimental.

Figura 46. Evolução do peso corporal em função do tempo em camundongos C57BL/6 controle e com tumor após diversos tratamentos.

Figura 47. Variação do volume tumoral *in vivo* em camundongos C57BL/6 com melanoma em função de diversos tratamentos.

Figura 48. Variação do volume tumoral *ex vivo* em camundongos C57BL/6 com melanoma em função do tratamento com Terapia Fotodinâmica (TFD), PBS (Controle tumor), NanoA e irradiação exclusiva com LED.

Figura 49. Cortes histológicos de melanoma implantado em camundongos C57BL/6 tratados com PBS ou com Terapia Fotodinâmica (TFD).

Figura 50. Fotomicrografia de secções histológicas de pulmão de camundongos C57BL/6.

Figura 51. Seção histológica de rim de camundongo C57BL/6 tratado com Terapia Fotodinâmica, mostrando caso de pielonefrite.

Figura 52. Cortes histológicos de baço de camundongo C57BL/6.

Figura 53. Micrografias de fígado de camundongos C57BL/6.

LISTA DE TABELAS

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

Tabela 2. Estimativas de vários tipos de câncer no Brasil, inclusive melanoma, para o ano de 2014 das taxas brutas de incidência por 100 mil habitantes e de número de casos novos por câncer, segundo sexo e localização primária (INCA, 2014).

Tabela 3. Estimativas de novos casos de câncer, incluindo melanoma para o Distrito Federal no ano de 2014, das taxas brutas de incidência por 100 mil habitantes segundo sexo e localização primária.

Tabela 4. Componentes e mecanismos empregados nas Fotoreações do Tipo I e Tipo II.

Tabela 5. Composição em ácidos graxos do óleo de açaí extraído de forma enzimática a partir da polpa.

Tabela 6. Descrição dos grupos experimentais segundo o tratamento aplicado em células não tumorais (NIH/3T3) e células de melanoma (B16F10).

Tabela 7. Grupos experimentais segundo o tipo de tratamento praticado no experimento piloto para Terapia Fotodinâmica.

Tabela 8. Valores de potência (mW) emitidos pela fonte de diodo emissor de luz (LED) conforme variação de distância (cm) entre o LED e o detector de luz. Medições foram feitas de forma frontal entre o detector de luz e o LED.

Tabela 9. Valores de potência (mW) emitidos pela fonte de diodo emissor de luz (LED) conforme variação de distância (cm) entre o LED e o detector de luz. Medições foram feitas de forma lateral entre o detector de luz e o LED.

Tabela 10. Peso absoluto e relativo dos órgãos analisados para os animais do grupo controle e animais com tumor submetidos a diversos tratamentos praticados em experimento piloto *in vivo*.

Tabela 11. Peso absoluto e relativo dos órgãos analisados para os animais do grupo controle e animais com tumor submetidos a diversos tratamentos praticados em experimento final *in vivo*.

Tabela 12. Efeito dos diversos tratamentos nos parâmetros hematológicos em camundongos CL57BL/6, 15 dias após transplantação tumoral.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| Abreviatura/Sigla | Significado |
|--------------------------|--|
| $^1\text{O}_2$ | Oxigênio singleto |
| ALA | Ácido 5-Aminolevulínico |
| AICIPc | Alumínio-Cloro-Ftalocianina |
| ANOVA | Análise de variância |
| AV | Anexina V |
| CC10 | Concentração citotóxica que inviabiliza 10% das células |
| CC50 | Concentração citotóxica que inviabiliza 50% das células |
| DAPI | 4'6'-diamidino-2- fenilindol |
| DMEM | Dulbecco's Modified Eagle Medium |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| EDTA | Ácido etilenodiamino tetra-acético |
| EGFR | Receptores de fator de crescimento epidermal |
| ERO | Espécies reativas de oxigênio |
| FS | Fotossensibilizante |
| IP | Iodeto de propídeo |
| LED | Diodo emissor de luz |
| MET | Microscopia Eletrônica de Transmissão |
| MTT | Brometo de 3(4,5 dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil-tetrazólio |
| NP | Nanopartícula |

| | |
|-----|----------------------------------|
| OMS | Organização Mundial da Saúde |
| PBS | Tampão fosfato salino |
| PIT | Inversão de fase por temperatura |
| PS | Fosfatidilserina |
| PTA | Ácido fosfotúngico |
| RGP | Fase de crescimento radial |
| SFB | Soro fetal bovino |
| TFD | Terapia Fotodinâmica |
| VGP | Fase de crescimento vertical |

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 2. REFERENCIAL TEÓRICO | 3 |
| 2.1 <i>CÂNCER</i> | 3 |
| 2.1.1 Aspectos gerais e etiologia | 3 |
| 2.1.2 Epidemiologia do câncer | 4 |
| 2.1.3 Câncer no Brasil | 5 |
| 2.2 <i>CÂNCER DE PELE</i> | 7 |
| 2.2.1 Melanoma | 7 |
| 2.2.1.1 Aspectos gerais e etiologia..... | 7 |
| 2.2.1.2 Epidemiologia do melanoma cutâneo..... | 12 |
| 2.2.1.3 Fatores de risco | 13 |
| 2.2.1.4 Prevenção e tratamento..... | 14 |
| 2.3 <i>TERAPIA FOTODINÂMICA</i> | 15 |
| 2.3.1 Mecanismo de ação..... | 15 |
| 2.3.2 Fontes de luz utilizadas na Terapia Fotodinâmica | 19 |
| 2.3.3 Aplicações da Terapia Fotodinâmica..... | 20 |
| 2.3.4 Terapia Fotodinâmica e melanoma..... | 21 |
| 2.3.5 Fotossensibilizantes..... | 23 |
| 2.3.5.1 Aspectos gerais | 23 |
| 2.3.5.2 Óleo de açaí como fotossensibilizante..... | 25 |
| 2.4 <i>NANOBIOTECNOLOGIA APLICADA À TERAPIA FOTODINÂMICA</i> | 28 |
| 2.4.1 Nanoemulsões..... | 32 |
| 3. JUSTIFICATIVA | 36 |
| 4. OBJETIVOS | 37 |
| 5. MATERIAIS E MÉTODOS | 38 |
| 5.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL | 38 |
| 5.2 <i>FONTE DE DIODO EMISSOR DE LUZ (LED)</i> | 38 |
| 5.3 <i>CARACTERIZAÇÃO FOTOFÍSICA E FOTOQUÍMICA DO ÓLEO DE AÇAÍ</i> | 41 |
| 5.3.1 Caracterização fotofísica | 41 |
| 5.3.2 Caracterização fotoquímica | 41 |
| 5.4 <i>NANOEMULSÃO CONTENDO GOTÍCULAS DE ÓLEO DE AÇAÍ COMO FOTOSSENSIBILIZANTE</i> | 43 |
| 5.4.1 Desenvolvimento da nanoemulsão de óleo de açaí (NanoA) | 43 |
| 5.4.2 Efeito da concentração do tensoativo Tween-80 sobre as características físico-químicas da NanoA..... | 43 |

| | |
|--|-----------|
| 5.4.3 Caracterização físico-química da NanoA..... | 44 |
| 5.4.4 Caracterização fotofísica e fotoquímica da NanoA | 44 |
| 5.4.5 Determinação da estabilidade físico-química e fotodinâmica da NanoA | 44 |
| 5.4.6 Análise morfológica da NanoA mediante microscopia eletrônica de transmissão | 45 |
| 5.5 EXPERIMENTAÇÃO IN VITRO..... | 46 |
| 5.5.1 Linhagens celulares..... | 46 |
| 5.5.2 Procedimentos de rotina realizados nos experimentos <i>in vitro</i> | 46 |
| 5.5.2.1 Meio de cultivo..... | 46 |
| 5.5.2.2 Manutenção das células | 47 |
| 5.5.2.3 Estabelecimento de subcultivos celulares | 47 |
| 5.5.2.4 Determinação da viabilidade celular mediante ensaio de MTT | 49 |
| 5.5.3 <i>Screening</i> inicial das concentrações de NanoA: citotoxicidade da NanoA nos tempos de exposição de 24 e 48 horas na ausência de irradiação | 50 |
| 5.5.4 Citotoxicidade da NanoA na ausência de irradiação no tempo de exposição de 15 minutos..... | 51 |
| 5.5.5 Efeito da Terapia Fotodinâmica <i>in vitro</i> | 52 |
| 5.5.6 Análise da morfologia das células após tratamento com Terapia Fotodinâmica..... | 56 |
| 5.5.7 Análise por citometria de fluxo do tipo de morte celular em células tratadas com Terapia Fotodinâmica | 56 |
| 5.6 EXPERIMENTAÇÃO IN VIVO..... | 59 |
| 5.6.1 Animais | 59 |
| 5.6.2. Transplantação das células de melanoma nos animais | 60 |
| 5.6.3 Definição de protocolo para tratamento por Terapia Fotodinâmica de de melanoma | 60 |
| 5.6.3.1 Etapa 1 – Piloto: Determinação da concentração de NanoA a ser administrada | 61 |
| 5.6.3.2 Etapa 2 – Piloto: Determinação do tempo de incorporação da NanoA | 62 |
| 5.6.3.3 Etapa 3 – Piloto: Determinação da fluência energética..... | 63 |
| 5.6.3.4 Etapa 4 – Piloto: Terapia Fotodinâmica para o tratamento de melanoma | 63 |
| 5.6.4 Terapia fotodinâmica para o tratamento de melanoma..... | 65 |
| 5.6.5 Avaliação clínica..... | 67 |
| 5.6.5.1 Peso corporal..... | 67 |
| 5.6.5.2 Volume tumoral..... | 67 |
| 5.6.5.3 Análise dos órgãos não alvo | 68 |
| 5.6.6 Avaliação histopatológica | 69 |
| 5.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA | 71 |
| 6. RESULTADOS..... | 72 |
| 6.1 CARACTERIZAÇÃO FOTOFÍSICA DA FONTE DE DIODO EMISSOR DE LUZ (LED) | 72 |
| 6.2 CARACTERIZAÇÃO DA NANOEMULSÃO CONTENDO GOTÍCULAS DE ÓLEO DE AÇAÍ COMO FOTOSSENSIBILIZANTE | 75 |
| 6.2.1 Padronização do protocolo de preparo de NanoA..... | 75 |

| | | |
|-----------|---|-----|
| 6.2.2 | Caracterização do óleo de açaí..... | 77 |
| 6.2.2.1 | Espectrofotometria | 77 |
| 6.2.2.2 | Geração de espécies reativas de oxigênio | 78 |
| 6.2.3 | Caracterização da NanoA | 79 |
| 6.2.3.1 | Variáveis físico-químicas da NanoA..... | 79 |
| 6.2.3.2 | Variáveis fotofísicas da NanoA..... | 81 |
| 6.2.3.3 | Análise da morfologia da NanoA mediante microscopia eletrônica de transmissão (MET) | 82 |
| 6.2.3.4 | Capacidade do óleo de açaí associado à nanoemulsão em gerar espécies reativas de oxigênio..... | 82 |
| 6.2.3.5 | Determinação da estabilidade coloidal e fotodinâmica da NanoA..... | 83 |
| 6.3 | EXPERIMENTAÇÃO IN VITRO | 85 |
| 6.3.1 | Citotoxicidade da NanoA nos tempos de exposição de 24 e 48 horas na ausência de irradiação..... | 85 |
| 6.3.2 | Citotoxicidade da NanoA na ausência de irradiação no tempo de exposição de 15 minutos..... | 86 |
| 6.3.3 | Efeito da Terapia Fotodinâmica <i>in vitro</i> | 87 |
| 6.3.4 | Análise da morfologia celular por microscopia de contraste de fase após tratamento com Terapia Fotodinâmica | 90 |
| 6.3.5 | Análise da morfologia celular mediante citometria de fluxo | 91 |
| 6.3.6 | Análise por citometria de fluxo do tipo de morte celular em células tratadas com Terapia Fotodinâmica | 94 |
| 6.4 | EXPERIMENTOS IN VIVO | 97 |
| 6.4.1 | Experimentos piloto para determinação de protocolo de aplicação da Terapia Fotodinâmica..... | 97 |
| 6.4.2 | Terapia Fotodinâmica para o tratamento de melanoma..... | 102 |
| 6.4.2.1 | Análise clínica..... | 102 |
| 6.4.2.1.1 | Peso corporal..... | 102 |
| 6.4.2.1.2 | Volume tumoral..... | 103 |
| 6.4.2.1.3 | Análise dos órgãos sistêmicos..... | 105 |
| 6.4.2.2 | Análise de ensaios hematológicos | 106 |
| 6.4.2.3 | Análise histopatológica | 107 |
| 6.4.2.3.1 | Tumores..... | 107 |
| 6.4.2.3.2 | Órgãos não alvo | 109 |
| 7. | DISCUSSÃO | 113 |
| 8. | CONCLUSÕES | 125 |
| 9. | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 127 |
| 10. | ANEXO | 143 |
| | Declaração do Comitê de Ética no uso Animal (CEUA) | 143 |

1. INTRODUÇÃO

O melanoma é responsável por somente 4% do número de incidências de câncer dermatológico, porém, é o tipo mais agressivo, sendo responsável por 80% das mortes dos pacientes com câncer de pele (revisado por Davids e Kleemann, 2013). Ao ser detectado em estágios iniciais, o melanoma pode ser tratado mediante cirurgia com efetividade de aproximadamente 80% (Davids e Kleemann, 2011), porém, as taxas de recidiva continuam altas, com valores aproximados de 36% (Nicholl *et al.*, 2011). Preocupantemente, o tempo médio de sobrevivência dos pacientes com melanoma metastático é de 2 a 8 meses (Mouawad *et al.*, 2010) e ainda há a dificuldade do melanoma avançado em responder aos tratamentos existentes, com uma expectativa na qual menos de 15% dos casos conseguem sobreviver por até 3 anos (Cummins *et al.*, 2006; Baldelli *et al.*, 2014).

Não existe nenhum tipo de terapia específica para tratar o melanoma metastático. Considerando que este tipo de câncer é inerentemente resistente às formas tradicionais de quimioterapia e radioterapia (Zbytek *et al.*, 2008), várias estratégias têm sido desenvolvidas, envolvendo imunoterapia (Carlson *et al.*, 2005) e terapia gênica (Schadendorf, 2002). Mas, apesar dos avanços alcançados até o momento, ainda existe a necessidade de desenvolver tratamentos novos e mais efetivos para tratar esta doença.

Por este motivo, uma série de estudos tem proposto a Terapia Fotodinâmica (TFD) como uma alternativa terapêutica adjuvante. Tais pesquisas tem mostrado resultados animadores em relação à eficácia da TFD utilizando diferentes protocolos em modelos *in vitro*, *in vivo* e estudos clínicos, sugerindo sua aplicação como terapia adjuvante para o tratamento do melanoma (estágios III e IV) (Kolarova *et al.*, 2007; Mamoon *et al.*, 2009; Maduray *et al.*, 2011; Maduray *et al.*, 2012; Baldea *et al.*, 2012; revisado por Davids e Kleemann, 2013). Porém, a TFD aplicada ao melanoma em experimentos *in vivo* raramente tem alcançado remissão completa (Dabrowski *et al.*, 2011), sendo que a maioria dos ensaios reportam remissão parcial (Ozler *et al.*, 1992; Haddad *et al.*, 1998; Hu *et al.*, 2002; Dabrowski *et al.*, 2011) e/ou recidiva do melanoma (Dabrowski *et al.*, 2011). Além disto, a administração sistêmica do

fotossensibilizante (FS) provoca efeitos secundários pela falta de seletividade com o tecido alvo e toxicidade no fígado e rins (Haddad *et al.*, 1998; Panagopoulos *et al.*, 1989). Além desses problemas, de forma geral, a maior parte dos FS empregados na TFD apresentam insolubilidade em meio aquoso, degradação prematura após administração e baixa disponibilidade devido à baixa seletividade pelo tecido alvo (Bechet *et al.*, 2008). Apesar dos FS de segunda geração terem mostrado maior eficiência e os FS de terceira geração terem sido descritos por sua maior seletividade *in vitro*, poucos tem sido avaliados para aplicações clínicas porque sua seletividade *in vivo* não foi suficientemente satisfatória (Taquet *et al.*, 2007).

Descobertas recentes no campo da TFD incluem a combinação deste tipo de tratamento com outras modalidades e o descobrimento de novos fotossensibilizantes. Neste sentido, o nosso grupo se propôs a estudar a atividade fotofísica e fotoquímica de vários tipos de óleos e extratos amazônicos com atividade farmacológica já comprovada. Estes resultados revelaram a atividade fotodinâmica da maioria desses óleos, despertando o interesse nas suas aplicações para TFD. Para isto, considerando a natureza hidrofóbica desses compostos, pensou-se em associá-los a novos sistemas de entrega, com ênfase especial na nanotecnologia (Zhao *et al.*, 2010). A nanotecnologia representa uma forma de trazer soluções para esses desafios farmacológicos (Thierry, 2009), melhorando a dispersão dos FS hidrofóbicos, protegendo o FS da degradação, promovendo a sua liberação controlada, aumentando a biodisponibilidade do fármaco (Jia e Jia, 2012), diminuindo a toxicidade, melhorando a biocompatibilidade e o uso seguro dos fármacos fotossensibilizantes (Paszko *et al.*, 2011), com tudo, melhorando a eficiência da TFD.

Diante do exposto acima, o presente trabalho objetivou-se a explorar de forma mais detalhada as propriedades fotossensibilizantes do óleo de açaí e a desenvolver uma nanoemulsão contendo esse óleo a fim de aprimorar a TFD *in vitro* e *in vivo*, e investigar os efeitos biológicos da aplicação da nanoemulsão para o tratamento do melanoma.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 CÂNCER

2.1.1 Aspectos gerais e etiologia

O termo “câncer” é usado de forma genérica para se referir a centenas de doenças diferentes que podem afetar qualquer parte do corpo. Outros termos utilizados são tumores malignos ou neoplasias malignas. O câncer é caracterizado por um desequilíbrio na proliferação celular, tornando-se desenfreada e associada à capacidade de invasão e destruição tecidual. Em estágios mais avançados da doença, as células tumorais podem migrar para outros sítios e produzir novas lesões em sítios distantes. Este processo é definido como metástase, a principal causa de morte em pacientes com esta doença (Ruddon, 2007; American Cancer Society, 2013; Globocan WHO, 2012).

As causas do câncer são variadas, podendo ser externas ou internas ao organismo, estando inter-relacionadas. O tema foi revisado por Chammas (2013), quem descreve que as causas internas são, na maioria das vezes, geneticamente pré-determinadas, e estão ligadas à capacidade do organismo de se defender das agressões externas. Dentre os agentes externos, podemos citar três categorias, em que se incluem: 1) agentes carcinogênicos físicos, tais como radiação ultravioleta e ionizante; 2) agentes carcinogênicos químicos, como asbestos, componentes do tabaco, aflatoxina e arsênico; e 3) carcinógenos biológicos, como infecções por certos tipos de vírus ou bactérias. Estes fatores podem agir em conjunto ou de forma sequencial para iniciar ou promover a carcinogênese. A exposição crescente do ser humano aos agentes químicos, físicos e biológicos potencialmente mutagênicos e/ ou carcinogênicos, explica parcialmente a incidência crescente da doença, pelo menos em grupos selecionados de indivíduos (revisado por Chammas, 2013).

De uma forma geral, o que há de comum em virtualmente todos os tipos de câncer é que apresentam: 1) capacidades intrínsecas à célula tumoral; 2) capacidades extrínsecas à célula tumoral, isto é, dependentes da interação da célula tumoral com

elementos extracelulares ou outras células do paciente com câncer. As capacidades intrínsecas incluem a capacidade de autorrenovação ilimitada, proliferação autônoma, resistência a fatores antiproliferativos, evasão à morte celular, evasão de mecanismos de defesa imune; e, mais recentemente, destacam-se ainda alterações metabólicas adaptativas e instabilidade genômica. As capacidades extrínsecas à célula tumoral incluem a capacidade de indução persistente de angiogênese, modificação do microambiente tecidual, evasão da resposta imunitária montada especificamente contra os tumores, modulação da resposta inflamatória e de reparo tecidual e cooptação de células desse microambiente nos processos de invasão e metástase (revisado por Chammas, 2013).

Segundo Colditz e colaboradores (2012), mais da metade dos casos da doença atualmente existentes podem ser prevenidos ou eliminados pela abstenção à exposição a fatores tais como o tabaco, evitando a obesidade, inatividade física e nutrição inadequada. Certos tipos de câncer poderiam ser evitados mediante mudanças no comportamento individual da população, e pelos esforços dos órgãos de saúde pública, sempre guiados por conhecimento científico. Além da prevenção, a Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda a detecção precoce de potenciais malignidades, tendo assim uma maior probabilidade do paciente ser tratado com sucesso, evitando a progressão da doença para um estágio que comprometa a qualidade de vida e até a sobrevivência do paciente (WHO, 2014).

2.1.2 Epidemiologia do câncer

O câncer é considerado um dos maiores problemas de saúde pública no mundo. De acordo com as últimas estimativas mundiais do projeto Globocan 2012, da Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC, do inglês International Agency for Research on Cancer), da OMS, o câncer apresentou uma incidência de 14,1 milhões de novos casos e foi responsável por 8,2 milhões de mortes mundialmente (Globocan WHO, 2012).

Neste estudo, dentre os principais tipos de câncer para ambos os sexos, excluindo o câncer de pele não melanoma, figura o câncer de pulmão como o tipo

com maior incidência, com 1,8 milhões de casos novos para o ano de 2012, seguido pelo câncer de mama com 1,7 milhões de novos casos, o colón retal com 1,3 milhões de novos casos e o câncer de próstata com 1,1 milhões de novos casos (Globocan WHO, 2012).

Estima-se que para o ano de 2030, a carga global será de 21,4 milhões de casos novos de câncer e 13,2 milhões de mortes por câncer, em consequência do crescimento e do envelhecimento da população, bem como da redução na mortalidade infantil e nas mortes por doenças infecciosas em países em desenvolvimento (INCA, 2014).

No continente Americano o câncer é uma das principais causas de mortalidade, com 1,3 milhões de mortes no ano de 2012, onde 47% das quais aconteceram na América Latina e Caribe. Espera-se que para o ano de 2030 a mortalidade por câncer nas Américas aumente em até 2,1 milhões (OMS, 2014).

2.1.3 Câncer no Brasil

Segundo dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA), o Brasil representa uma estimativa para o ano de 2014, que será válida também para o ano de 2015, para a ocorrência de aproximadamente 576 mil casos novos de câncer, incluindo os casos de pele não melanoma, reforçando a magnitude do problema do câncer no país. O câncer de pele do tipo não melanoma (182 mil casos novos) será o mais incidente na população brasileira, seguido pelos tumores de próstata (69 mil), mama feminina (57 mil), cólon e reto (33 mil), pulmão (27 mil), estômago (20 mil) e colo do útero (15 mil). Sem considerar os casos de câncer de pele não melanoma, estimam-se 395 mil casos novos de câncer, 204 mil para o sexo masculino e 190 mil para o sexo feminino. Em homens, os tipos mais incidentes serão os cânceres de próstata, pulmão, cólon e reto, estômago e cavidade oral; e, nas mulheres, os de mama, cólon e reto, colo do útero, pulmão e glândula tireóide (Tabela 1 e Figura 1).

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

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

*Números arredondados para 10 ou múltiplos de 10.

Fonte: Instituto Nacional do Câncer (INCA), Estimativa Câncer, 2014.

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

*Números arredondados para 10 ou múltiplos de 10.

Figura 1. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2014, por sexo, exceto câncer de pele não melanoma. **Fonte:** Instituto Nacional do Câncer (INCA), Estimativa Câncer, 2014.

2.2 CÂNCER DE PELE

O câncer de pele é dividido em dois grupos distintos: i) o não melanoma, sendo mais frequente e menos agressivo, com 70% dos diagnósticos do tipo carcinoma basocelular e 25% de carcinoma das células escamosas ou epidermóide; e ii) os melanomas, menos frequentes, porém apresentando letalidade mais elevada (INCA, 2014). Conforme colocado anteriormente, o câncer de pele não melanoma é o câncer mais frequente no Brasil, correspondendo a 25% de todos os tumores malignos registrados no país, porém apresenta altos percentuais de cura, se for detectado precocemente (INCA, 2014).

A incidência do câncer de pele tem alcançado proporções epidêmicas nas últimas décadas, tornando-se um tema de preocupação na área de saúde pública (Miller *et al.*, 2006, Bulletin WHO, 2009), atingindo principalmente os caucasianos que moram em países com alta intensidade de radiação ultravioleta (UV). No entanto, esse tipo de câncer afeta todos os grupos étnicos em alguma proporção (Demierre, 2006). No Brasil, o câncer de pele é o tipo mais incidente em ambos os sexos (INCA, 2014). Embora a incidência de melanoma represente apenas cerca de 4% dos tumores de pele, é considerado o de maior importância e gravidade, pois representa aproximadamente 80% das mortes devido ao seu alto potencial metastático (Miller *et al.*, 2006, Davids e Kleemann, 2011), sendo portanto, a forma mais agressiva de câncer de pele (Jhappan *et al.*, 2003).

2.2.1 Melanoma

2.2.1.1 Aspectos gerais e etiologia

O melanoma surge de fenótipos malignos dos melanócitos da pele, um tipo de células que se originam da crista neural em desenvolvimento e logo migram para a pele, folículos pilosos, olhos e orelhas (Gray-Schopfer *et al.*, 2007). Na pele, os melanócitos residem na camada basal da epiderme (Figura 2), sendo circundados por 36 queratinócitos – compartimento conhecido como unidade epidermal de melanina (UEM), que mantém a homeostase dos melanócitos (Slominski *et al.*, 2004). Na

unidade UEM, os melanócitos produzem o pigmento melanina via processo enzimático de melanogênese em organelas especializadas conhecidas como melanossomos (Slominski *et al.*, 2004). A presença desta organela célula-específica, o melanossomo, e seu produto associado, pigmento melanina, diferenciam o melanoma de qualquer outro tipo de câncer (Chen *et al.*, 2009). Em resposta à radiação UV, os queratinócitos secretam fatores que regulam a sobrevivência, diferenciação, proliferação e motilidade dos melanócitos, estimulando a produção de melanina, o que resulta em uma resposta de bronzeamento. Isto ilustra a importância dos melanócitos para a proteção da pele dos efeitos prejudiciais da radiação UV e na prevenção contra o câncer de pele. Desta forma, em pessoas com melanócitos não funcionais, como ocorre no caso de pacientes com doenças pigmentares como vitiligo e albinismo, ocorre hipersensibilidade à radiação UV (Gray-Schopfer *et al.*, 2007).

A proliferação dos melanócitos pode ser restrita à epiderme (nevus juncionais), à derme (nevus dérmicos) ou pode possuir componentes de ambos (nevus compostos). Geralmente os nevus são benignos, porém podem progredir para um melanoma de fase de crescimento radial (RGP, sigla em inglês) (Figura 2), uma lesão intraepidérmica que pode envolver microinvasão local da derme. As células RGP podem progredir para a fase de crescimento vertical (VGP, sigla em inglês) com espalhamento pagetóide onde ocorre o empilhamento vertical de melanócitos, histologicamente característico do melanoma. Este estágio é mais perigoso já que as células apresentam potencial metastático, com nódulos invadindo a derme. Porém, nem todos os melanomas passam por cada uma destas fases. As células RGP ou VGP podem se desenvolver diretamente a partir de melanócitos ou nevus isolados e podem ambos progredir diretamente para o melanoma maligno metastático (Miller *et al.*, 2006).

Aproximadamente 91,2% dos melanomas são cutâneos, 5,3% são oculares, e 1,3% ocorrem nas mucosas (Kawczyk-Krupka *et al.*, 2013). O melanoma ocular, também conhecido como melanoma de coróide, é o tipo mais comum de tumor maligno intra-ocular primário (Singh *et al.*, 2007). O melanoma de mucosas pode ocorrer em qualquer membrana mucosa do corpo, inclusive na cavidade nasal e oral, anorretal, genital, entre outros locais (Mihajlovic *et al.*, 2012).

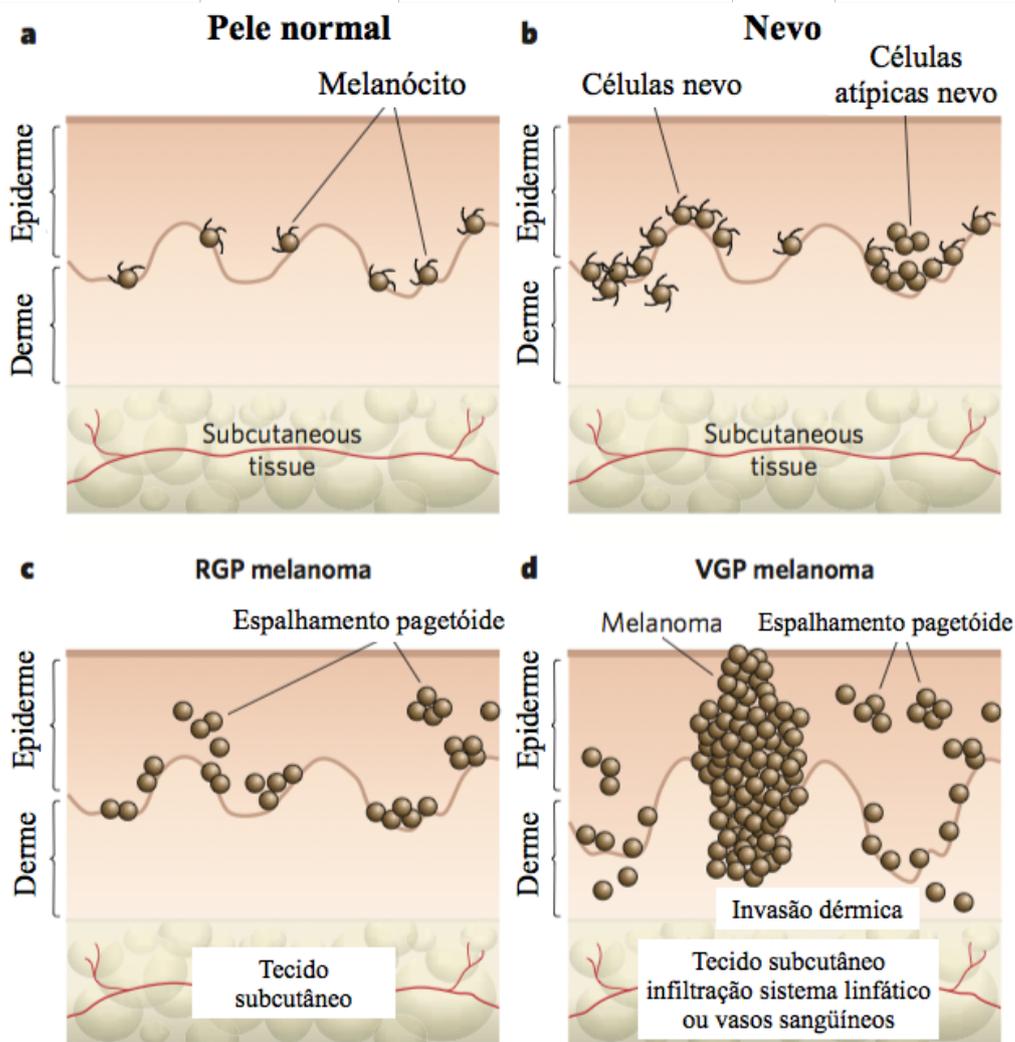


Figura 2. Processo de transformação dos melanócitos em casos de melanoma. Existem vários estágios na lesão melanocítica, cada um marcado por um novo clone de células com vantagens de crescimento em relação ao tecido em volta. **(A)** Pele normal, mostrando uma distribuição homogênea de melanócitos dendríticos na camada basal da epiderme. **(B)** Nevos. Nos estágios iniciais, os nevos melanocíticos benignos ocorrem com números elevados de melanócitos dendríticos. Segundo sua localização, os nevos são classificados como juncionais, dérmicos ou compostos. Alguns nevos são displásicos, com melanócitos morfologicamente atípicos. **(C)** Melanoma de fase de crescimento radial (RGP), considerado o estágio maligno primário. **(D)** Melanoma de fase de crescimento vertical (VGP), considerado o primeiro estágio com potencial maligno que leva diretamente ao melanoma maligno metastático, o estágio mais mortal, por infiltração dos sistemas vascular e linfático. O espalhamento pagetóide descreve o empilhamento vertical de melanócitos histologicamente característico do melanoma. **Fonte:** Gray-Schopfer *et al.*, 2007).

O melanoma cutâneo é o tipo mais comum, e é conhecido como uma doença heterogênea com muitos subtipos clínico-patológicos. Destes tipos, a maioria se encaixa em quatro categorias: melanoma disseminativo superficial (MDS), melanoma nodular (MN), lentigo maligno melanoma (LM) e melanoma acrolentiginoso (MA), representando 70% a 75%, 20% a 25%, 5% a 10% e 5% dos casos de melanoma cutâneo, respectivamente, em populações caucasianas (Saldanha *et al.*, 2006), e os melanomas acrolentiginosos sendo o subtipo histológico mais prevalente em populações africanas, africana-americanas, chinesas, taiwanesas e de herança racial mista (Forman *et al.*, 2008). Aparte das diferenças histopatológicas entre estes subtipos de melanoma cutâneo, outros fatores clínicos os diferenciam. Por exemplo, o MDS apresenta lesões pigmentadas, discretamente elevadas, de coloração variável, com crescimento assimétrico e bordas geográficas. O MN inicia-se como pápula ou nódulo pigmentado, de grande variabilidade clínica, com o crescimento vertical desde o início, situado principalmente em áreas expostas à luz solar intermitente, porém, pode ocorrer em qualquer parte do corpo. Apresenta pior diagnóstico por ter somente a fase vertical de crescimento. O LM apresenta evolução lenta, de vários anos e, geralmente, localiza-se em áreas expostas cronicamente à luz solar, como face, pescoço e membros superiores. As características clínicas são de mácula hiperocrômica acastanhada e bordas irregulares, e de crescimento periférico insidioso. No início, e por muitos anos, pode se apresentar como mancha de cor escura ou acastanhada e medir alguns centímetros de diâmetro, sendo denominado lentigo maligno, que seria considerado um melanoma *in situ*. Quando o crescimento se torna invasivo, a lesão passa a denominar-se lentigo maligno melanoma. Finalmente, o MA tem lesões pigmentadas, com crescimento radial em estruturas acrais, volares palmares, plantares e subungueais. Esta última, de difícil diagnóstico, têm a dermatoscopia da unha e do leito ungueal como excelente arma no auxílio do diagnóstico. Quando localizado na região subungueal, pode se apresentar somente como uma faixa de cor escura, geralmente com largura maior de 7 mm (James *et al.*, 2011; Forman *et al.*, 2008).

A maioria dos melanomas são melanóticos, contendo diferentes graus e tipos de pigmentação (melanina), porém, qualquer subtipo de melanoma cutâneo primário ou melanoma metastático pode ser amelanótico, com ausência de pigmentação no tumor. O melanoma amelanótico representa 1.8% - 8.1% dos melanomas (Koch *et al.*, 2000)

O desenvolvimento do melanoma é o resultado de interações complexas entre fatores genéticos e ambientais (Jhappan *et al.*, 2003). Assim, os melanócitos passam por uma série de etapas até a transformação maligna pela aquisição de várias características fenotípicas. As características histológicas particulares que caracterizam cada etapa do processo são as manifestações de mudanças genéticas (Clark *et al.*, 1984), epigenéticas e fenotípicas (Muthusamy *et al.*, 2006). As mutações em genes reguladores de crescimento, a produção de fatores de crescimento autócrinos e a perda de receptores de adesão contribuem para uma sinalização intracelular interrompida nos melanócitos, o que impede que sejam regulados pelos queratinócitos. Consequentemente, os melanócitos podem proliferar e se espalhar, levando à formação de nevos (Figura 2). Ao se originar de um nevo benigno, os melanócitos passam por crescimento aberrante dentro da lesão, apresentando subsequentemente bordas irregulares, mudança de cor e comumente uma resposta alérgica associada. Nesta etapa, a lesão é considerada displásica (Gray-Schopfer *et al.*, 2007).

Ao nível molecular, estas mudanças estão associadas à ativação anormal de vias devido a defeitos genéticos e/ou fatores ambientais. No caso do melanoma, uma das principais vias é a da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK). Essa ativação é resultado de mutações somáticas em genes diferentes, com uma taxa de mutação correspondente a 50% - 70% para *BRAF*, 15% - 30% para *NRAS*, 2% para *KRAS* e 1% para *HRAS* (Lin *et al.*, 1998; Brunet *et al.*, 1999, Chen *et al.*, 2013). O primeiro oncogene de melanoma a ser identificado foi o *RAS* (Albino *et al.*, 1984, 1989), sendo que o *NRAS* é o gene da família *RAS* que resulta mais afetado (Whiteman *et al.*, 2011). Já as mutações no oncogene *BRAF* foram originalmente descobertas em linhagens de células de melanoma (Davies *et al.*, 2002), e diferentemente do gene *NRAS*, tem sido associadas com características clínicas e histopatológicas específicas (Whiteman *et al.*, 2011). Por exemplo, pacientes com melanoma que apresentam mutação no gene *BRAF* são significativamente mais jovens do que pacientes com melanoma sem mutações nesse oncogene; geralmente o melanoma é do subtipo disseminativo superficial, aparecendo mais comumente no tronco do paciente e em pele exposta intermitentemente ao sol. Além disto, geralmente os melanomas com mutação no oncogene *BRAF* são mais pigmentados (Whiteman *et al.*, 2011).

2.2.1.2 Epidemiologia do melanoma cutâneo

Em contraste com as tendências mundiais de diminuição ou estabilidade de vários tipos de câncer, a incidência do melanoma tem mostrado nas últimas décadas um contínuo aumento, alcançando proporções epidêmicas, especialmente nas populações com altos índices de indivíduos caucasianos (Baldelli *et al.*, 2014; Siegel *et al.*, 2014). A incidência do melanoma varia segundo a latitude e a altitude, sendo que as áreas mais próximas ao equador e em altitudes maiores geralmente apresentam taxas mais elevadas de incidência. Porém, este padrão varia segundo a pigmentação da pele da população e seus padrões de exposição solar (Tucker e Goldstein, 2003).

De acordo com estimativas mundiais do projeto Globocan 2012 da OMS, aproximadamente 232.130 novos casos de melanoma foram estimados mundialmente para o ano de 2012 (Globocan WHO, 2012). No caso do Brasil, estima-se que no ano de 2014 haverão 2.960 casos de incidência de melanoma em homens e 2.930 casos novos em mulheres, totalizando 5.910 novos casos. Os maiores números estimados em homens e mulheres encontram-se no estado de São Paulo, Rio Grande do Sul e Paraná (Tabela 2).

Tabela 2. Estimativas de vários tipos de câncer no Brasil, inclusive melanoma, para o ano de 2014 das taxas brutas de incidência por 100 mil habitantes e de número de casos novos por câncer, segundo sexo e localização primária (INCA, 2014).

| Estados | Leucemias | Corpo do Útero | Pele Melanoma | Outras Localizações | Subtotal | Pele não melanoma | Todas as Neoplasias |
|---------------------|--------------|----------------|---------------|---------------------|----------------|-------------------|---------------------|
| Acre | 20 | ** | ** | 150 | 630 | 80 | 710 |
| Amapá | 20 | ** | ** | 100 | 560 | 100 | 660 |
| Amazonas | 110 | 50 | 30 | 680 | 3.860 | 970 | 4.830 |
| Pará | 250 | 70 | 40 | 1.190 | 6.650 | 1.980 | 8.630 |
| Rondônia | 50 | 20 | 20 | 370 | 1.710 | 650 | 2.360 |
| Roraima | 20 | ** | 20 | 90 | 550 | 120 | 670 |
| Tocantins | 60 | ** | 20 | 270 | 1.730 | 430 | 2.160 |
| Alagoas | 110 | 80 | 20 | 680 | 3.250 | 1.100 | 4.350 |
| Bahia | 460 | 270 | 170 | 3.350 | 18.130 | 5.280 | 23.410 |
| Ceará | 390 | 210 | 180 | 2.730 | 14.540 | 5.540 | 20.080 |
| Maranhão | 200 | 70 | 50 | 1.320 | 5.740 | 1.380 | 7.120 |
| Paraíba | 180 | 80 | 60 | 1.170 | 5.550 | 2.070 | 7.620 |
| Pernambuco | 380 | 290 | 150 | 3.070 | 15.460 | 4.610 | 20.070 |
| Piauí | 140 | 50 | 50 | 810 | 4.120 | 1.440 | 5.560 |
| Rio Grande do Norte | 160 | 60 | 50 | 1.080 | 5.040 | 2.020 | 7.060 |
| Sergipe | 60 | 30 | 40 | 560 | 2.930 | 860 | 3.790 |
| Distrito Federal | 120 | 130 | 90 | 950 | 5.280 | 2.470 | 7.750 |
| Goiás | 220 | 130 | 130 | 2.000 | 10.510 | 6.890 | 17.400 |
| Mato Grosso | 100 | 50 | 60 | 890 | 4.770 | 3.400 | 8.170 |
| Mato Grosso do Sul | 110 | 80 | 70 | 920 | 5.380 | 2.740 | 8.120 |
| Espírito Santo | 160 | 80 | 120 | 1.180 | 7.690 | 4.630 | 12.320 |
| Minas Gerais | 910 | 420 | 430 | 7.060 | 38.200 | 23.330 | 61.530 |
| Rio de Janeiro | 870 | 880 | 430 | 7.870 | 46.360 | 27.320 | 73.680 |
| São Paulo | 2.210 | 1.900 | 1.840 | 17.590 | 104.470 | 47.730 | 152.200 |
| Paraná | 740 | 330 | 560 | 5.550 | 28.380 | 11.630 | 40.010 |
| Rio Grande do Sul | 910 | 410 | 800 | 8.300 | 37.910 | 13.500 | 51.410 |
| Santa Catarina | 410 | 170 | 440 | 2.940 | 15.050 | 9.860 | 24.910 |
| Brasil | 9.370 | 5.900 | 5.890 | 72.870 | 394.450 | 182.130 | 576.580 |

*Números arredondados para 10 ou múltiplos de 10.

** Menor que 15 casos.

Fonte: Instituto Nacional do Câncer (INCA), Estimativa Câncer, 2014.

No Distrito Federal, a incidência para o ano de 2014 estima-se em 90 casos tanto em homens como em mulheres (Tabela 3).

Tabela 3. Estimativas de novos casos de câncer, incluindo melanoma para o Distrito Federal no ano de 2014, das taxas brutas de incidência por 100 mil habitantes segundo sexo e localização primária.

| Localização Primária da Neoplasia Maligna | Estimativa dos Casos Novos | | | |
|---|----------------------------|---------------|--------------|---------------|
| | Estado | | | |
| | Homens | | Mulheres | |
| | Casos | Taxa Bruta | Casos | Taxa Bruta |
| Próstata | 780 | 58,11 | - | - |
| Mama Feminina | - | - | 920 | 62,88 |
| Colo do Útero | - | - | 260 | 17,96 |
| Traqueia, Brônquio e Pulmão | 180 | 13,06 | 110 | 7,45 |
| Cólon e Reto | 200 | 14,55 | 300 | 20,11 |
| Estômago | 150 | 11,52 | 90 | 6,41 |
| Cavidade Oral | 90 | 7,05 | 50 | 3,18 |
| Laringe | 80 | 5,68 | ** | 0,90 |
| Bexiga | 70 | 5,23 | 40 | 2,97 |
| Esôfago | 80 | 6,17 | 30 | 2,02 |
| Ovário | - | - | 130 | 9,11 |
| Linfoma de Hodgkin | 40 | 3,17 | ** | 0,72 |
| Linfoma não Hodgkin | 70 | 5,04 | 80 | 5,73 |
| Glândula Tireoide | ** | 1,01 | 80 | 5,60 |
| Sistema Nervoso Central | 60 | 4,15 | 70 | 4,61 |
| Leucemias | 60 | 4,48 | 60 | 3,80 |
| Corpo do Útero | - | - | 130 | 8,53 |
| Pele Melanoma | 50 | 4,03 | 40 | 2,95 |
| Outras Localizações | 490 | 36,15 | 460 | 31,01 |
| Subtotal | 2.410 | 178,73 | 2.870 | 195,01 |
| Pele não Melanoma | 1.110 | 82,10 | 1.360 | 92,62 |
| Todas as Neoplasias | 3.520 | 261,05 | 4.230 | 287,41 |

*Números arredondados para 10 ou múltiplos de 10. / ** Menores que 15 casos.

Fonte: Instituto Nacional do Câncer (INCA), Estimativa Câncer, 2014.

2.2.1.3 Fatores de risco

Os principais fatores de risco do melanoma cutâneo incluem: o histórico de melanoma na família, múltiplos nevos benignos ou atípicos e melanoma prévio (Miller e Mihm, 2006). Também há outros fatores bem conhecidos, dentre eles: cor da pele clara, cor dos olhos clara, tendência ao surgimento de sardas e exposição prolongada e repetida ao sol na infância e adolescência (INCA, 2014). O risco individual para o desenvolvimento do melanoma é determinado pela possibilidade de ter herdado mutações em genes de alta susceptibilidade ao melanoma ou

polimorfismos em genes secundários modificadores de risco. Adicionalmente, o risco de desenvolver melanoma tem a ver com o quão aguda ou crônica foi a exposição solar à qual o indivíduo foi submetido ao longo da vida (Tucker e Goldstein, 2003).

2.2.1.4 Prevenção e tratamento

Tem sido sugerido que 2/3 dos casos de melanoma são atribuíveis à exposição excessiva ao sol (Armstrong e Kricke, 1994). Portanto, ações de prevenção primária que estimulem a proteção contra a luz solar são efetivas e de baixo custo para evitar o câncer da pele, inclusive o melanoma. A educação em saúde é outra estratégia internacionalmente aceita. O indivíduo deve procurar o dermatologista ao primeiro sinal de surgimento de manchas ou sinais novos na pele, ou a mudança nas características desses, reconhecendo assim possíveis alterações precoces sugestivas de malignidade (Demierre, 2006).

Pacientes com melanoma não metastático nas etapas iniciais podem ser tratados pela ressecção cirúrgica do tumor, mostrando altas taxas de sobrevivência. O tecido de crescimento primário e o normal ao redor do tumor são removidos e algumas vezes o nódulo linfático sentinela é coletado para biópsia para determinar o estágio do câncer. Aproximadamente 80% desses casos são tratados dessa maneira. Pacientes nesse mesmo estágio da doença tem sido também tratados com quimioterapia, alcançando taxas de cura de 97% - 99,8% (Boyle, 2011; Katipamula e Markovic, 2008).

Porém, de forma geral, a prognose do melanoma metastático é extremamente desanimadora, considerando que os protocolos de tratamentos utilizados não têm mostrado, até o momento, benefícios reais de sobrevivência (Tomic *et al.*, 2011). Uma vez que o melanoma avança para uma etapa tardia, torna-se extremamente difícil de ser tratado, apresentando altas taxas de mortalidade (Mouawad *et al.*, 2010; American Cancer Society Fact Sheets, 2013; Baldelli *et al.*, 2014). O tempo médio de sobrevivência dos pacientes com melanoma metastático, dependendo da resposta do paciente, o número e local das metástases, pode ser de 2 a 8 meses (Mouawad *et al.*,

2010). Os tratamentos disponíveis mais comumente utilizados, tais como a quimioterapia, imunoterapia e radioterapia tm mostrado pouca efetividade, além de uma série de efeitos secundários relacionados à falta de especificidade com as células tumorais (Bajetta *et al.*, 2002; Atallah e Flaherty, 2005). A dificuldade do melanoma metastático em responder aos tratamentos existentes se traduz em uma expectativa na qual menos de 15% dos casos conseguem sobreviver por até 3 anos (Baldelli *et al.*, 2014; American Cancer Society Cancer Fact Sheets, 2013).

Infelizmente, o rápido aumento observado nas últimas décadas nos índices de incidência do melanoma maligno não tem apresentando um paralelo em relação ao desenvolvimento de opções terapêuticas mais eficientes (Borisova *et al.*, 2011). Por esse motivo, além da prevenção ativa e a detecção em estágios iniciais, é de extrema importância a procura pelo desenvolvimento de novos fármacos direcionados e novas terapias que sejam menos tóxicas e que não apresentem quimioresistência.

2.3 TERAPIA FOTODINÂMICA

2.3.1 Mecanismo de ação

A Terapia Fotodinâmica é um tipo de tratamento promissor que utiliza a combinação de três componentes não tóxicos que ao serem combinados induzem estresse oxidativo no tecido alvo (Figura 3). Um dos componentes é luz em comprimento de onda específico. O outro é um fotossensibilizante (FS), uma molécula capaz de converter a energia luminosa em potencial químico e por fim, o oxigênio molecular. Uma concentração adequada de oxigênio molecular é necessária para que haja dano tecidual. Se algum desses componentes estiver ausente, não haverá efeito, portanto a efetividade como um todo requer um planejamento cuidadoso para determinar a quantidade de FS e a dosimetria de luz que será usada (Brown *et al.*, 2004).

De forma geral, a TFD funciona primeiramente pelo uso de um fotossensibilizante ou precursor que é administrado através de uma das seguintes vias:

tópica, oral, intravascular ou intratumoral. Na sequência, é dado um tempo para que o FS se distribua, localize e acumule no local de interesse. Em seguida, o alvo é exposto à luz em um comprimento de onda que coincida com a faixa de comprimento máximo de absorção do FS sendo utilizado (Rosa e Bentley, 2000) (Figura 3). Além disso, a fonte luminosa usada na TFD deve ser aplicada em potência adequada e com dose total de energia suficiente para induzir a destruição do tecido tumoral (Mang *et al.*, 2008). Por mais que o FS seja aplicado sistemicamente, o efeito de morte celular ocorrerá somente no local onde o FS teve acumulação com subsequente fotoativação gerando espécies reativas de oxigênio naquela região específica, obtendo um efeito local (Brown *et al.*, 2004).

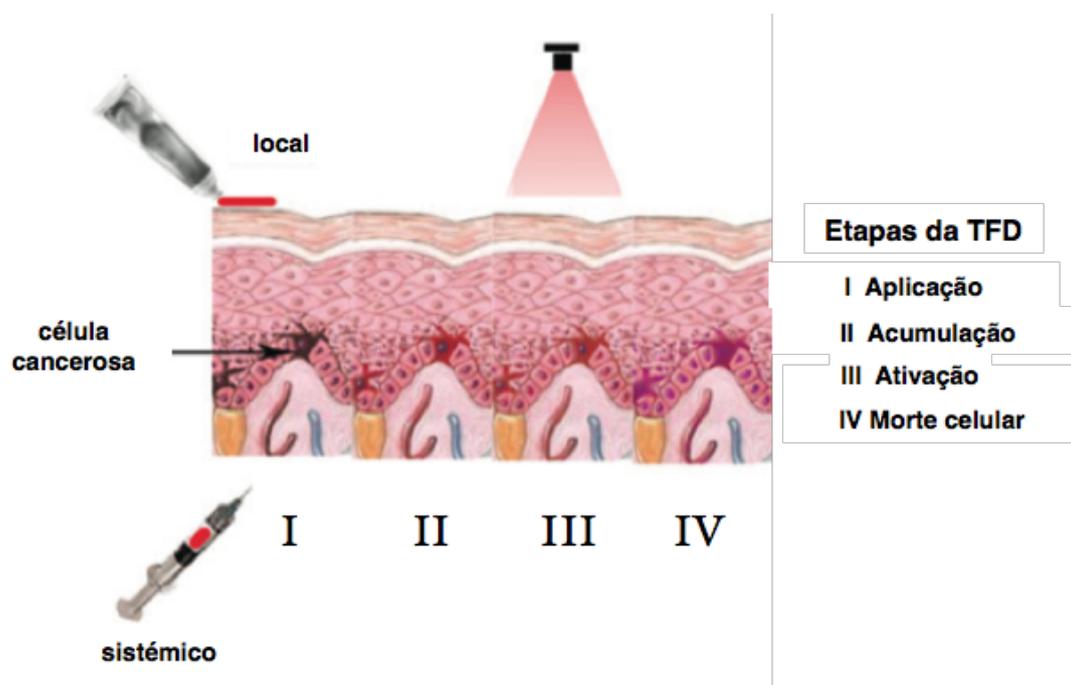


Figura 3. Etapas da Terapia Fotodinâmica (TFD). O fotossensibilizante (na seringa) é aplicado local ou sistemicamente (etapa I), acumula-se no tumor (etapa II) e é ativado por iluminação externa (etapa III), causando dano ou morte celular (etapa IV). **Fonte:** Chatterjee *et al.*, 2008.

Uma vez que o fotossensibilizante é fotoativado, este é excitado e passa do estado fundamental singlete (S_0) para o primeiro estado excitado singlete (S_1), que é bastante instável. O retorno à estabilidade ocorre pela liberação de energia na forma de luz, por emissão de fluorescência, ou alternativamente, o FS no estado S_1 , pode passar ao estado tripleto (T_1), mais estável e de vida longa, mediante o fenômeno conhecido como “cruzamento intersistemas”. O FS no seu estado excitado tripleto pode agir em dois tipos de mecanismos, Fotoreações do Tipo I e as Fotoreações do Tipo II (Figura 4) (Paszko *et al.*, 2011).

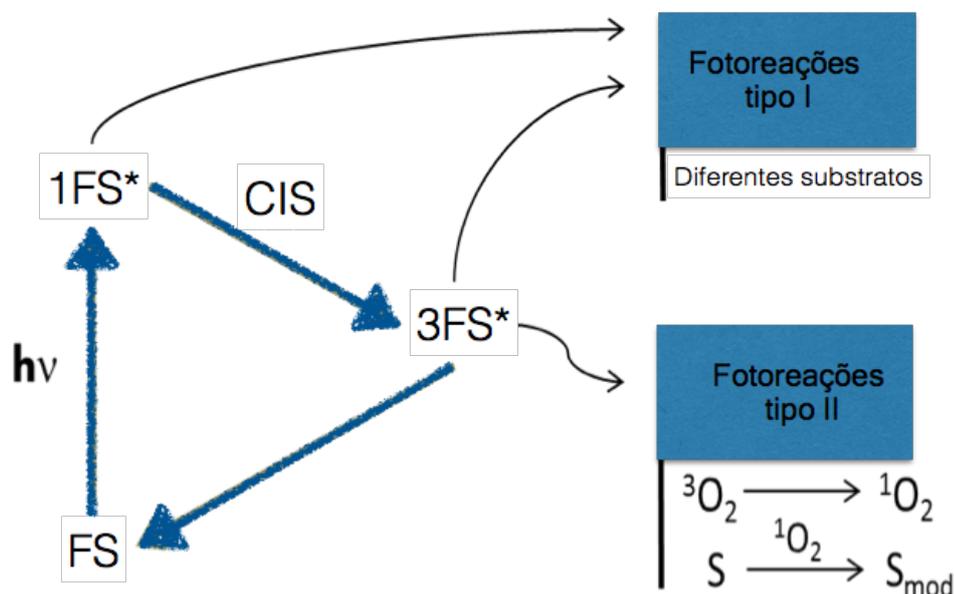


Figura 4. Diagrama ilustrando os principais eventos que conduzem às fotoreações do tipo I e II que em última instância levam ao dano oxidativo celular. FS= fotossensibilizante; $1FS^*$ = FS em estado singlete excitado; $3FS^*$ = FS em estado tripleto excitado; $h\nu$ = fóton; CIS = cruzamento intersistema; 3O_2 = oxigênio tripleto; 1O_2 = oxigênio singlete; S = substrato (biomoléculas); S_{mod} = biomoléculas quimicamente modificadas.

O mecanismo de Fotoreações do Tipo I envolve a abstração de átomo de hidrogênio ou reações de transferência de elétrons entre o estado excitado do FS e o substrato que pode ser biológico, um solvente ou outro FS, com o intuito de ceder radicais livres e radicais iônicos (Tabela 4). Estas espécies de radicais livres são

geralmente altamente reativas e podem prontamente interagir com oxigênio molecular para gerar espécies reativas de oxigênio que produzem danos oxidativos expressos como lesões biológicas (Sharman *et al.*, 1999). Por outro lado, os mecanismos das Fotoreações do Tipo II resultam na transferência de energia entre o estado excitado tripleto do FS e o estado fundamental do oxigênio molecular, gerando oxigênio no seu estado excitado, o oxigênio singleto (Tabela 4) (Sharman *et al.*, 1999). Logo, é o oxigênio singleto que age como o verdadeiro agente citotóxico que reage rapidamente com os componentes celulares causando o dano que finalmente conduz à morte celular (Gibson *et al.*, 1999). Durante este processo, o fotossensibilizante é regenerado agindo como catalizador para que cada molécula de FS participe em muitos ciclos de produção de oxigênio singleto (Brown *et al.*, 2004; Chatterjee *et al.*, 2008).

Tabela 4. Componentes e mecanismos empregados nas Fotoreações do Tipo I e Tipo II.

| Princípios fotoquímicos e fotofísicos da Terapia Fotodinâmica | | |
|--|---|---|
| Sensibilizante | $h\nu$ | $^1\text{Sensibilizante}^*$ |
| $^1\text{Sensibilizante}^*$ |  | $^3\text{Sensibilizante}^*$ |
| Mecanismo do Tipo I | | |
| $^3\text{Sensibilizante}^* + ^3\text{Sensibilizante}^*$ |  | $\text{Sensibilizante}^{\cdot+} + \text{Sensibilizante}^{\cdot-}$ |
| $^3\text{Sensibilizante}^* + \text{Substrato}$ |  | $\text{Substrato}^{\cdot+} + \text{Sensibilizante}^{\cdot-}$ |
| $\text{Sensibilizante}^{\cdot-} + \text{O}_2 (^3\Sigma_g^-)$ |  | Dano oxidativo |
| $\text{Substrato} + \text{O}_2^{\cdot-}$ |  | Dano oxidativo |
| Mecanismo do Tipo II | | |
| $^3\text{Sensibilizante}^* + \text{O}_2 (^3\Sigma_g^-)$ |  | $\text{Sensibilizante} + \text{O}_2 (^1\Delta_g)$ |
| $\text{O}_2 (^1\Delta_g) + \text{Substrato}$ |  | Dano oxidativo |

Abreviações: $h\nu$: energia da luz; * : estado excitado; \cdot : radical; ($^3\Sigma_g^-$): oxigênio molecular no estado fundamental; ($^1\Delta_g$): oxigênio singleto. Adaptado de Sharman *et al.*, 1999.

É geralmente aceito que os mecanismos de Fotoreações do Tipo II predominam durante a TFD, portanto, as Fotoreações do Tipo I se tornam mais importantes em situações com baixas concentrações de oxigênio. Porém, a reação inicial resulta de menor importância já que tanto as reações do Tipo I como as do Tipo II conduzem a danos oxidativos semelhantes e reações em cadeia de radicais livres comparáveis na presença de oxigênio. O efeito geral das Fotoreações do Tipo I e do Tipo II é a produção de dano oxidativo dentro da célula alvo que em última instância conduz à destruição tumoral (Sharman *et al.*, 1999).

2.3.2 Fontes de luz utilizadas na Terapia Fotodinâmica

Os tipos de fontes luminosas utilizadas para TFD podem ser divididas em três classificações: 1) lâmpada incandescente com comprimento de onda filtrado, 2) lasers, e 3) fontes de diodo emissor de luz (LED). A luz solar também tem sido usada para o tratamento de grandes áreas de pele, mas não é muito aplicada devido aos potenciais problemas práticos relacionados ao controle e entrega da luz (Wilson e Patterson, 1986).

Tanto os lasers como as lâmpadas incandescentes tem sido utilizadas na TFD, mostrando eficácia semelhante. Os lasers do tipo diodo são os mais eficientes, em comparação com os de bomba de corante, sendo mais baratos e simples de instalar, com dosimetria automatizada, recursos de calibração e uma vida útil mais longa. Os lasers podem ser acoplados a fibras ópticas para tratamentos na bexiga e trato digestório (Umeda *et al.*, 2011).

Os diodos emissores de luz (LED) têm sido recentemente investigados como novas fontes luminosas para a ativação de FS utilizados na TFD. O uso dos LED apresenta uma série de vantagens, dentro delas: estes são facilmente manipulados, podem ser considerados de baixo custo e a irradiação emitida por eles é menos danosa para os olhos em comparação com a irradiação de laser (Umeda *et al.*, 2011). Apesar destas vantagens não existe um tipo de fonte luminosa ideal para todas as aplicações da TFD. Portanto, a escolha da fonte de luz a ser utilizada baseia-se no comprimento de onda de absorção do FS, o tipo e tamanho de doença a ser tratada (local, tamanho

da lesão, acesso, características do tecido), e custos relacionados à aquisição da fonte luminosa (Agostinis *et al.*, 2011).

2.3.3 Aplicações da Terapia Fotodinâmica

Milhares de anos atrás o efeito da luz solar isolada ou em combinação com bálsamos foi utilizado por civilizações no antigo Egito, China e Índia, para o tratamento de doenças tais como psoríase, vitiligo e câncer de pele. Porém, não foi até o início do século XX que o termo ‘ação fotodinâmica’ foi cunhado por Tappeiner e colegas para descrever as reações químicas do consumo de oxigênio induzidas pela efeito fotossensibilizante aplicado à biologia (revisado por Zhao e He, 2010). A aplicação clínica em humanos da TFD como terapia anticâncer começou no Instituto do Câncer Roswell Park em 1978 quando o Dr. Thomas Dougherty usou pela primeira vez um derivado da hematoporfirina (HPD) e posteriormente a sua forma parcialmente purificada, Photofrin[®], para tratar efetivamente de uma série de malignidades (Dougherty, 1996). Nas últimas duas décadas, a TFD tem ganho popularidade mundial como terapia anticâncer primária ou adjuvante.

Uma ampla variedade de malignidades envolvendo vários órgãos e sistemas têm sido tratadas utilizando a TFD. A eficácia da TFD é demonstrada numa série de estudos para o tratamento de câncer nos seus estágios iniciais, tal como no caso de displasia esofágica (Gray e Fullarton, 2007), câncer pulmonar (Kato *et al.*, 2004), câncer da cabeça e pescoço (Allison *et al.*, 2005; Tapajós *et al.*, 2008; Longo *et al.*, 2009; Bicalho *et al.*, 2013), câncer de pele não melanoma (Souza *et al.*, 2009), câncer anal (Allison *et al.*, 2010), câncer peritoneal ovariano (Guyon *et al.*, 2012), entre outros. A TFD também tem sido empregada com sucesso como co-terapia em câncer avançado e tem mostrado resultados promissores no campo da dermatologia. Atualmente, a TFD tem se tornado uma modalidade terapêutica estabelecida no campo da dermatologia para o tratamento do câncer de pele não melanoma, para tratar, por exemplo, casos de queratose actínica, doença de Bowen, carcinoma de células escamosas *in situ* e carcinoma basocelular superficial (Ikram *et al.*, 2011), principalmente pela acessibilidade da pele à exposição da luz. Com base nesses

resultados, centros de dermatologia no Canadá, Estados Unidos, Japão e Europa reconhecem a TFD como uma modalidade terapêutica eficiente (Rosa e Bentley, 2000). A TFD igualmente tem se mostrado promissora para o tratamento de outras doenças inflamatórias e proliferativas não neoplásicas, tais como casos de escleroderma, acne vulgaris, psoríase, sarcoidose, necrobiose lipóidica e leishmaniose (Mitra e Stables, 2006; Escobar *et al.*, 2006; Hernández *et al.*, 2012).

Mais recentemente, uma série de estudos têm reportado o uso da TFD combinada com outras terapias tais como a crioterapia (Kim *et al.*, 2013) e laser com dióxido de carbono (Shokrollahi *et al.*, 2013) para o tratamento do câncer de pele nodular, demonstrando boa eficácia e resultados cosméticos satisfatórios. Porém, em relação ao uso de TFD para o tratamento do melanoma, algumas peculiaridades deste tipo de câncer levantam questões importantes que precisam ser consideradas.

2.3.4 Terapia Fotodinâmica e melanoma

Conforme discutido previamente, a ativação do FS pela luz na presença de oxigênio molecular representa um evento crucial para a TFD. Idealmente, a luz usada na TFD deve ser fracamente absorvida pelo tecido biológico e fortemente absorvida pelo FS (Nighswander-Rempel *et al.*, 2005).

A absorção de luz nos tecidos é em grande parte devido à presença de cromóforos teciduais, como hemoglobina, mioglobina, melanina e citocromos. O espectro de absorção dessas moléculas define a janela óptica dos tecidos biológicos para a aplicação de luz na TFD (Figura 5). O perfil de absorção dessas moléculas biológicas limita em 650-1200 nm (janela óptica dos tecidos biológicos), a faixa do espectro de absorção adequada para o uso de TFD, que compreende a região do vermelho visível e a do infravermelho próximo (Plaetzer *et al.*, 2009; Huang *et al.*, 2009). Assim, o emprego de um FS capaz de ser ativado na faixa de absorção da janela óptica dos tecidos biológicos, contribui na eficácia do tratamento na medida em que aumenta o índice de penetração luminosa ativando o FS com o mínimo de desvio óptico (Agostinis *et al.*, 2011).

No caso do melanoma cutâneo, o cenário é complexo devido ao alto conteúdo de melanina no tecido (Ma *et al.*, 2007). A melanina funciona como antioxidante e fotoprotetor da pele que absorve a luz em grande parte da região de comprimento de onda usado para a TFD (400 - 750 nm), com maior absorção nos comprimentos de onda mais curtos (Borisova *et al.*, 2011; Davids e Kleeman, 2011) (Figura 5). Consequentemente, os melanomas melanóticos comumente apresentam uma resposta fraca à TFD clássica. Com o intuito de comprovar que a melanina é de fato um obstáculo importante para o tratamento via TFD, vários estudos têm comparado resultados experimentais com linhagens celulares pigmentadas, por exemplo, B16F1 e B16F10, e linhagens celulares despigmentadas, como a A₃₇₅ (Sharma *et al.*, 2011; Sharma e Davids, 2012). Estes estudos corroboram que a ausência de pigmento nos melanomas diminui sua resistência à morte celular após tratamento com TFD (Zhao *et al.*, 2009).

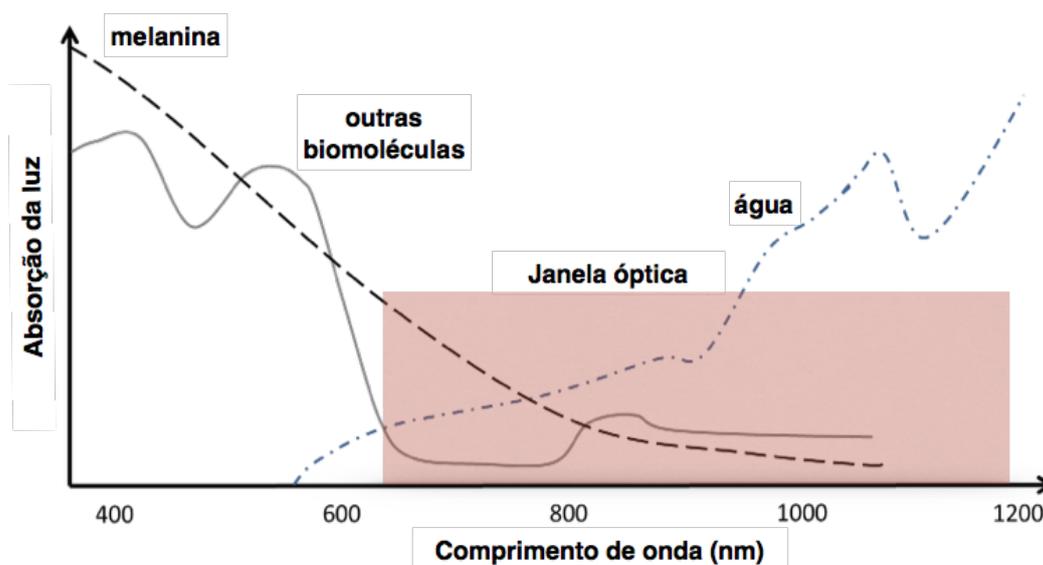


Figura 5. Contribuição dos diferentes compostos para a densidade óptica dos tecidos biológicos. Faixa do espectro adequada para uso na Terapia Fotodinâmica varia entre os comprimentos de onda de 650 a 1200 nm.

Um amplo número de estudos conduzidos *in vitro* tem mostrado resultados altamente satisfatórios, sugerindo protocolos que visam à indução da morte celular em células de melanoma pigmentadas de diversas linhagens (Kolarova *et al.*, 2007;

Mamoon *et al.*, 2009; Maduray *et al.*, 2011; Maduray *et al.*, 2012). Estudo conduzido por Tammela e colaboradores (2011) em porcos apoia o uso da TFD para a destruição seletiva de vasos linfáticos. Isto representa um resultado bastante importante ao considerarmos que o que torna o melanoma um tipo de câncer tão letal é a sua alta capacidade em criar metástase.

Uma série de modificações aplicadas à TFD clássica tem mostrado resultados promissores para o tratamento do melanoma. Estudos envolvendo FS capazes de serem ativados na região do infravermelho sugerem que um alto nível de pigmentação da pele não representa um obstáculo para a aplicação da TFD contra tumores pigmentados (Peeva *et al.*, 1999; Borisova, 2011). Porém, conforme colocado por Bechet e colaboradores (2008), a maioria dos FS testados em estudos pré-clínicos ainda não alcançaram suas aplicações clínicas devido a fatores como baixa seletividade em termos de diferenciar entre tecido alvo e tecido não tumoral, baixos coeficientes de extinção e alta acumulação na pele. A maioria dos FS que estão disponíveis comercialmente apresentam características benéficas específicas, mas nenhum deles incorpora todas as características de um FS ideal.

2.3.5 Fotossensibilizantes

2.3.5.1 Aspectos gerais

Os fotossensibilizantes são compostos capazes de absorver a luz em um comprimento de onda específico e transformá-la em potencial químico. No caso da TFD, este processo químico envolve a produção de agentes citotóxicos letais. Existem centenas de FS naturais e sintéticos, variando desde extratos de plantas até macrociclos sintéticos complexos. O ponto chave dos FS é ter a capacidade de se acumular no tecido alvo e assim gerar agentes citotóxicos para induzir os efeitos biológicos desejados (Sharman *et al.*, 1999).

Uma grande variedade de FS tem sido testada em experimentos *in vitro* e *in vivo*, mas nenhum deles tem mostrado propriedades ideais. Um FS ideal apresenta:

seletividade pelas células tumorais, estabilidade química e física, curto intervalo entre administração e acumulação máxima nos tecidos tumorais, ativação em comprimentos de onda com penetração tecidual ótima, rápida eliminação do organismo (Pass, 1993; Fritsch *et al.*, 1998), toxicidade mínima quando na ausência de luz, máxima eficácia uma vez ativado (Juarranz *et al.*, 2008), e tendência mínima de auto-agregação (Bechet *et al.*, 2008). Devido a estas propriedades, uma série de compostos tanto sintéticos como naturais têm sido estudados para combater uma variedade de tipos de câncer.

Atualmente destacam-se no mercado três gerações de fotossensibilizantes. A primeira geração foi inicialmente desenvolvida nos anos 1970s e início dos 1980s e é composta de derivados da porfirina, sendo seu principal representante o Photofrin[®]. Este FS tem sido aceito para uso clínico em vários países para tratamento de câncer de pulmão, câncer do esôfago superficial ou avançado, câncer de bexiga, câncer gástrico inicial ou avançado e câncer cervical inicial (Sharman *et al.*, 1999). Apesar do sucesso na sua aplicação clínica e de ainda ser o fotossensibilizante mais amplamente utilizado, o Photofrin[®] apresenta uma série de desvantagens, tais como: trata-se de uma mistura de derivados de porfirinas, possuindo elevada heterogeneidade química, além de baixo comprimento de onda de ativação (na faixa de 630nm), restringindo sua aplicação em cânceres superficiais, uma vez que a luz incidente penetra 4 mm na pele e ainda apresenta tempo de retenção prolongada de aproximadamente 10 semanas após administração, favorecendo sua toxicidade cutânea após TFD (Jori, 1996).

A segunda geração de FS foi estabelecida com o intuito de contornar os efeitos limitantes dos fármacos de primeira geração. Os FS de segunda geração se referem aos derivados da porfirina, clorinas e corantes, entre eles citando o ácido 5-Aminolevulínico (ALA), azul de metileno, Verteporfin, Temoporfin, Texafrinas, ftalocianinas, clorin e6, rodaminas, e porfírenos, entre outros (Sharman *et al.*, 1999). Os FS de segunda geração mostram uma série de vantagens quando comparados com os FS de primeira geração, por exemplo, demonstram absorção em comprimentos de onda maiores, variando entre 650 e 800 nm onde a penetração dos tecidos é ótima; apresentam coeficientes de extinção maiores; a acumulação no tecido é de menor duração, portanto o tratamento pode ser realizado no mesmo dia da aplicação do FS; e possuem menor toxicidade. Apesar destas vantagens, estes FS ainda apresentam uma

série de obstáculos, entre eles a alta hidrofobicidade e baixa seletividade pelo tecido tumoral (Paszko *et al.*, 2011).

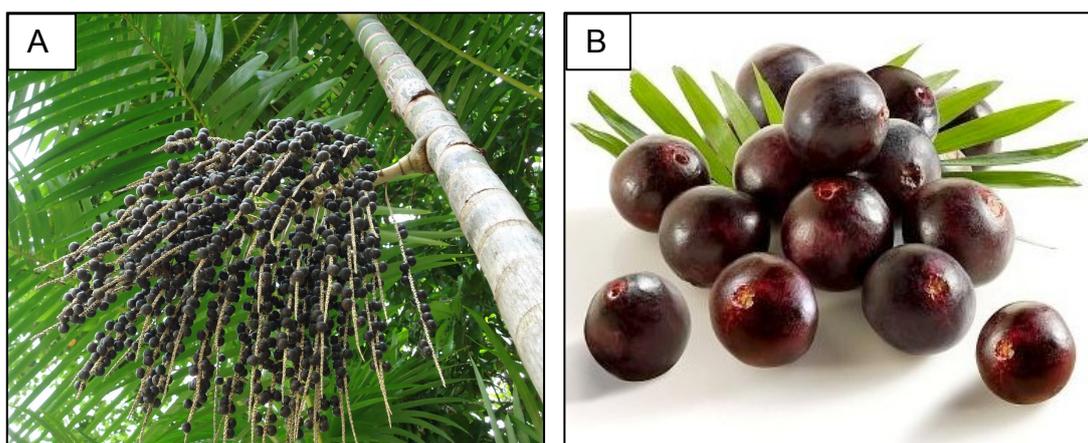
Com isso, houve a necessidade de desenvolver sistemas carreadores que possibilitem a administração do FS, bem como potencializem sua seletividade tumoral. Nesse contexto, surgiram os fármacos fotossensibilizantes de terceira geração que correspondem aos mesmos fármacos de primeira e segunda geração acima descritos, associados a sistemas como lipossomas, micelas, anticorpos conjugados, peptídeos, ácido fólico (Yano *et al.*, 2011) e plataformas nanotecnológicas (Muehlmann *et al.*, 2014). Dentre as diferentes gerações de FS, esta classe tem apresentado resultados promissores no aprimoramento de suas propriedades para a aplicação em TFD, com destaque para o direcionamento sítio-específico, conduzindo à elevada acumulação do composto no tecido tumoral (Castano *et al.*, 2005; Yano *et al.*, 2011).

Os produtos naturais tem sido reconhecidos como importantes fontes farmacêuticas, sendo que 63% dos medicamentos comercializados entre 1981 e 2008 reportaram ser derivados de uma forma ou de outra a partir de produtos naturais (revisado por Jong *et al.*, 2013). Atualmente uma boa parte da pesquisa realizada com TFD engloba o desenvolvimento de FS novos que sejam naturalmente derivados e que apresentem maior afinidade pelas células neoplásicas e menores períodos de sensibilização (Davids e Kleemann, 2011).

2.3.5.2 Óleo de açaí como fotossensibilizante

A *Euterpe oleracea* Martius (Arecaceae), uma das espécies do popular açaí, ocorre naturalmente na região Amazônica (Almeida *et al.*, 2004). O açaí, fruto da palmeira do açazeiro, apresenta formato esférico, com diâmetro entre 1,0 e 1,5 cm e cor roxa (Figura 6). O açaí apresenta grande potencial para o desenvolvimento de novos medicamentos, e recentemente tem recebido bastante atenção devido aos seus benefícios na área da saúde, principalmente pela sua alta atividade antioxidante e composição fitoquímica (Lichtenthaler *et al.*, 2005; Rodrigues *et al.*, 2006; Schauss *et*

al., 2006; Pacheco-Palencia *et al.*, 2007; Favacho *et al.*, 2011). Estudos têm revelado que o fruto do açaí é rico em polifenóis bioativos, com ênfase especial nas antocianinas, proantocianidinas, flavonóides, orientina, isovitexina e deoxihexose taxifolina (Schauss *et al.*, 2006; Del Pozo-Insfran *et al.*, 2004; Favacho *et al.*, 2011).



Fonte: plantasdepoder.com.br

Fonte: journalggn.com.br

Figura 6. (A) Palmeira de açaizeiro *Euterpe oleracea* Martius (Arecaceae). (B) Detalhe do fruto de açaí.

A análise da composição do açaí mostra que a polpa contém aproximadamente 13% de proteínas, 53% de lipídeos, 1,5% de açúcar total, fibra e polifenóis. O alto teor de óleo vegetal no açaí, representa uma fonte de ácidos graxos essenciais (Schauss *et al.*, 2006; Nascimento *et al.*, 2008). O óleo é obtido a partir da polpa do açaí principalmente por extração com éter de petróleo e extração enzimática. Em estudo realizado por Nascimento e colaboradores (2008) foi observado que o óleo obtido pela extração enzimática apresentou 71% de ácidos graxos insaturados, 60,81% de monoinsaturados e 10,36% de poliinsaturados, enquanto que o óleo extraído com o éter mostrou cerca de 68% de ácidos graxos insaturados, 60,33% de monoinsaturados, 7,83% de poliinsaturados e 3,54% dos ácidos não foram identificados. Além destes resultados, o mesmo grupo de pesquisa investigou a composição em ácidos graxos da fração lipídica da polpa de açaí por cromatografia gasosa de alta resolução, determinando que o óleo de açaí é principalmente composto por ácidos graxos do tipo oléico e palmítico (Tabela 5) (Nascimento *et al.*, 2008),

importantes nos processos de regeneração da pele (Machado *et al.*, 2008).

Tabela 5. Composição em ácidos graxos do óleo de açaí extraído enzimaticamente a partir da polpa.

| Ácido graxo | Composição percentual (%) | Número de átomos de carbono |
|-------------------|---------------------------|-----------------------------|
| Láurico | 0,04 | 12:0 |
| Mirístico | 0,11 | 14:0 |
| Palmítico | 25,93 | 16:0 |
| Palmitoleico | 4,88 | 16:1 |
| (cis 9) Oléico | 52,54 | 18:1 |
| (cis 11) Vacênico | 3,39 | 18:1 |
| Linoléico | 9,72 | 18:2 |
| Linolênico | 0,64 | 18:3 |
| Araquídico | 0,12 | 20:0 |
| Não identificados | 0,77 | - |
| Total saturados | 28,06 | - |
| Total insaturados | 71,17 | - |

Fonte: Nascimento *et al.*, 2008.

O óleo de *Euterpe oleracea* apresenta também flavonóides e vários compostos fenólicos, com ênfase especial nos ácidos vanílicos. Estes compostos fenólicos possuem propriedades antioxidantes, o que torna este tipo de óleo uma interessante alternativa para ser adicionado em alimentos, suplementos, cosméticos e em medicamentos (Pacheco-Palencia *et al.*, 2008). Pesquisas têm mostrado que compostos contendo altos níveis de antioxidantes podem reduzir o risco de doenças cardiovasculares e alguns tipos de câncer (Wiseman e Halliwell, 1996). Além disto, os compostos polifenólicos presentes no óleo de açaí mostram propriedades de inibição da proliferação celular, induzem apoptose, alteram a cinética do ciclo celular e interferem com a transdução de sinais intracelulares em vários modelos celulares de câncer (Robards *et al.*, 1999; Elattar e Viriji, 1999; Briviba *et al.*, 2002; Mertens-Talcott *et al.*, 2006).

O potencial fotossensibilizante e as propriedades fotofísicas do óleo de açaí foram descritas de forma inédita por pesquisadores do nosso grupo de pesquisa em 2012, constando em pedido de patente (PI1020120210436). Além disto, o mesmo grupo descreveu pela primeira vez a incorporação do óleo de açaí em um sistema nanoestruturado composto por polímeros.

2.4 NANOBIOTECNOLOGIA APLICADA À TERAPIA FOTODINÂMICA

Conforme mencionado anteriormente, um dos grandes desafios da TFD é o emprego de FS que contemplem a maioria das características desejadas para um FS ideal. Portanto, a utilização das ferramentas nanotecnológicas para o tratamento de doenças a través da TFD torna-se uma estratégia atrativa para contornar grande parte das desvantagens geralmente apresentadas pelos FS.

O termo nanotecnologia refere-se ao entendimento e controle da matéria em dimensões que variam entre 1 – 100 nm, uma escala dentro da qual propriedades únicas tanto químicas como físicas emergem, permitindo, por exemplo, o desenvolvimento de novas modalidades de diagnóstico e tratamento (Burda *et al.*, 2005; Neuberger *et al.*, 2005; Cheon e Lee, 2008; Singh e Lillard, 2009; Monge-Fuentes *et al.*, 2011).

O uso da nanotecnologia tem disponibilizado uma série de ferramentas que podem trazer novas perspectivas para o tratamento de diversos tipos de doenças (Figura 7), tais como o melanoma. Vários tipos de nanomateriais tais como nanopartículas (NP) de sílica, NP de ouro, NP de óxido de ferro, NP de poliacrilamida, NP biodegradáveis, quantum dots e lipossomas, dentre outros, também têm sido empregados na TFD (Chatterjee *et al.*, 2008; Paszko *et al.*, 2011). Segundo Paszko e colaboradores (2011), a maioria dos estudos existentes no tema de nanotecnologia e TFD estão direcionados a melhorar a eficácia de FS já existentes e que são aprovados para uso na clínica ou estão focados no desenvolvimento de veículos de entrega direcionada.

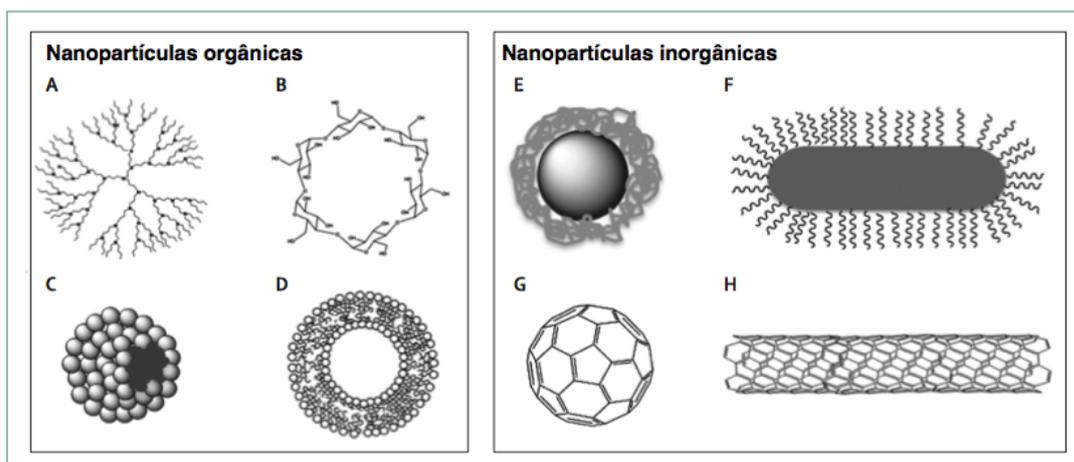


Figura 7. Nanomateriais frequentemente usados no campo da nanomedicina aplicada à oncologia. Esquerda: nanopartículas orgânicas: (A) dendrímero; (B) ciclodextrina; (C) micelas; (D) lipossomas. Direita: nanopartículas inorgânicas: (E) nanopartículas core-shell; (F) nanorod; (G) fullerenos; (H) tubo de carbono. Fonte: Baldelli *et al.*, 2014.

A aplicação da nanotecnologia para a TFD também se direciona ao melhoramento da solubilidade dos fármacos fotossensibilizantes que apresentam baixa solubilidade nos meios aquosos, protegendo assim o fármaco da sua degradação, produzindo a liberação controlada do fármaco e aumentando a biodisponibilidade deste (Jia e Jia, 2012; Muehlmann *et al.*, 2014). Outras vantagens apresentadas pelas nanopartículas incluem: capacidade de carreamento de vários fármacos, facilitando a terapia com combinação de fármacos; proteção dos fármacos da degradação; e desenho de nanopartículas com funções múltiplas, por exemplo com capacidade diagnóstica (contraste de imagem) e terapêutica (direcionamento para as células alvo) (Chen *et al.*, 2013) (Figura 8).

A seguir são discutidas algumas das vantagens facilitadas pelo uso da nanotecnologia na TFD com a finalidade de aumentar a eficácia do tratamento e seu uso seguro.

1) Entrega do FS ao local de ação

Os primeiros carreadores de fármacos quimioterapêuticos foram testados nos anos 1980s, onde os resultados iniciais demonstraram que melhores índices terapêuticos poderiam ser alcançados para fármacos anticâncer clássicos ao serem associados a sistemas de entrega nanoestruturados (Brasseur *et al.*, 1980; Couvreur *et al.*, 1986; Kreuter, 2007). Sabe-se que os sistemas nanoestruturados classificados como passivos acumulam-se em alguns tipos de tumores sólidos devido ao efeito de aumento de permeação e retenção vascular (EPR), resultante da microvasculatura defeituosa e drenagem linfática ineficiente observadas em vários desses tumores (Torchilin, 2007; Paszko *et al.*, 2011). Experimentos mostram que o acúmulo de partículas em tecidos tumorais é um evento tamanho dependente, portanto, a questão do tamanho das partículas é um fator importante para a quimioterapia do câncer. Ao utilizar nanopartículas de tamanho adequado, é possível aumentar a concentração do FS contido nelas no tecido tumoral, enquanto é reduzida a sua concentração nos tecidos não tumorais (Bechet *et al.*, 2008; Camerin *et al.*, 2010; Kano *et al.*, 2013; Master *et al.*, 2012).

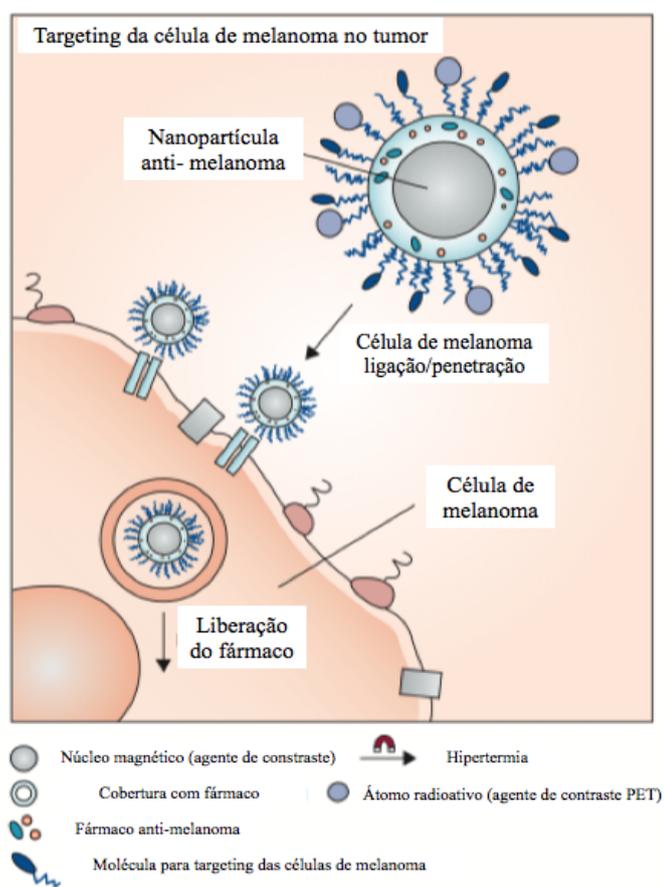


Figura 8. Esquema estratégico de um tipo de nanopartícula multifuncional para o tratamento do melanoma. Fonte: Baldelli *et al.*, 2014.

O acúmulo de fármacos em tumores também pode ser melhorado mediante o uso de nanomateriais com estratégias ativas de direcionamento. Moléculas tais como anticorpos, peptídeos catiônicos, ligantes de receptores de membrana, e outros, podem ser anexados à superfície das nanopartículas carregadas com fármaco, aumentando a sua afinidade pelo tecido tumoral (Brannon-Peppas *et al.*, 2004; Chatterjee *et al.*, 2008; Bugaj, 2011). Esta estratégia já foi aplicada em sistemas de entrega de fármacos na TFD. Por exemplo, micelas de co-polímero biocompatíveis contendo FS Pc4 tiveram a sua superfície modificada com peptídeos GE11 para direcioná-las aos receptores de fator de crescimento epidermal (EGFR) (os receptores são super expressos pelas células cancerosas). As micelas foram colocadas em contato com células de carcinoma epidermóide e em seguida tratadas com TFD. Os resultados indicaram que o direcionamento ativo com EGFR acelera a captação intracelular do FS, melhorando a citotoxicidade induzida pela TFD (Master *et al.*, 2012). Além disso, novos conjugados conhecidos como *nanobodies* (NB) capazes de fazer o direcionamento do EGFR e FS foram estudados, mostrando que estes conjugados induzem especificamente a morte de células que super expressam o EGFR em concentrações baixas, nanomolares, enquanto que o FS livre e os conjugados de NB-FS, na ausência da luz, não induzem toxicidade (Heukers *et al.*, 2014).

A eficiência da TFD também foi demonstrada em conjugados de óxido de grafeno com ácido fólico e clorina e6 para o tratamento de células MGC803 de câncer de estômago (Huang *et al.*, 2011). Yoon e colaboradores (2012) também testaram a clorina e6 em nanopartículas de ácido hialurônico com direcionamento tumoral (HANPs), resultando na supressão efetiva do crescimento tumoral.

2) Aplicação biológica dos fotossensibilizantes

Uma grande parcela dos FS disponíveis para TFD anti-câncer possuem uma natureza altamente hidrofóbica (Paszko *et al.*, 2011). Este é o caso de vários FS já aprovados para uso clínico. A referida hidrofobicidade apresenta aspectos tanto negativos quanto positivos. Dentre os pontos positivos temos o maior acúmulo e retenção do FS hidrofóbico pelas células tumorais (Chan *et al.*, 1988; Chan *et al.*,

1990) devido a que o FS hidrofóbico (por exemplo: hipericina) se associa com lipoproteínas séricas, lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e de alta densidade (HDLs) (Crnolatac *et al.*, 2007), as quais são avidamente capturadas pelas células tumorais (Theodossiou *et al.*, 2009). Conforme discutido por Davids e Kleemann (2011), este mecanismo foi apoiado por estudo conduzido por Ho e colegas (2009), mostrando que o colesterol funciona como chave determinante para a captura da hipericina nas membranas celulares, devido à natureza lipofílica da hipericina.

Por outro lado, os FS hidrofóbicos agregam-se facilmente na presença de água, dificultando a administração *in vivo* do fármaco, e fazendo com que ocorra a perda da atividade fotodinâmica (Konan *et al.*, 2002; Roozebomm *et al.*, 2013; Muehlmann *et al.*, 2014), resultando em um fator limitante para a aplicação clínica da TFD. Neste contexto, sabe-se que os nanomateriais podem ser utilizados para dispersar FS hidrofóbicos em meio biológico. Por exemplo, em estudo conduzido por Lima e colaboradores (2013), o encapsulamento de hipericina em nanopartículas lipídicas sólidas melhorou a eficiência fotodinâmica deste FS, mostrando um aumento de 30% na captura celular e uma melhora correlacionada de 26% na citotoxicidade. Em outro estudo por Muehlmann e colaboradores (2014), foi observado que a atividade fotodinâmica do cloreto de alumínio-ftalocianina (ALPc), um derivado da ftalocianina altamente efetivo mas muito hidrofóbico, foi significativamente melhorado no meio aquoso pela associação com nanopartículas de poli(vinil, metil-éter-co-maleico anidrido maleico). Quando associado a estas nanopartículas poliméricas, a ALPc teve a sua capacidade de geração de oxigênio singleto (ativada pela luz) aumentada em 10 vezes no meio aquoso, em comparação com o FS na sua forma livre (Muehlmann *et al.*, 2014).

2.4.1 Nanoemulsões

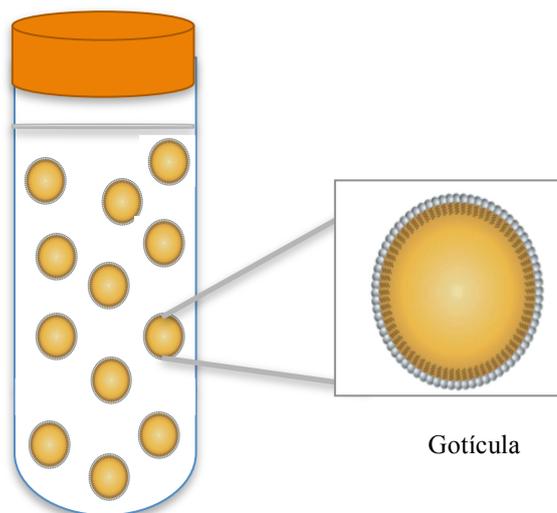
Uma das desvantagens da utilização de nanoterapêuticos para o tratamento do câncer em comparação com terapias que utilizam fármacos convencionais refere-se aos altos custos de manufatura provenientes da complexa formulação de

nanomateriais em larga escala (Baldelli *et al.*, 2014). Porém, ao considerar um tipo de nanomaterial que seja adequado para a aplicação na TFD, fácil de preparar, com custos relativamente baixos, e que apresente a habilidade de encapsular componentes lipofílicos em ambientes aquosos, pensa-se na aplicação de nanoemulsões (NE) para a entrega direcionada de fármacos anticâncer, fotossensibilizantes e agentes de diagnóstico com aplicações práticas na indústria farmacêutica (Shah *et al.*, 2010; Fryd e Mason, 2012).

As nanoemulsões são dispersões coloidais que podem ser do tipo óleo em água (O/A) ou água em óleo (A/O), dependendo se o óleo está disperso como gotículas na água ou vice versa. Considerando sua aplicação no campo biomédico, o foco é dado nas NE do tipo O/A que consistem de pequenas partículas compostas de óleo e moléculas de tensoativo dispersas em um meio aquoso. As NE do tipo O/A são definidas como dispersões coloidais termodinamicamente instáveis que consistem de dois líquidos imiscíveis, um deles na forma de gotículas esféricas dispersas no outro líquido. As NE podem ser transparentes ou translúcidas (com diâmetros variando entre 20 e 200 nm) ou leitosas (com diâmetro até 500 nm). Diferentemente das microemulsões, as quais são transparentes e termodinamicamente estáveis, as NE são somente cineticamente estáveis (Izquierdo *et al.*, 2002). De forma a dar estabilidade ao sistema e para garantir estabilidade cinética da NE durante o seu armazenamento, surfactantes e inclusive co-surfactantes podem ser usados. A estrutura das partículas em uma NE apresenta as caudas não polares das moléculas de surfactante imersas em um núcleo hidrofóbico formado por uma fase oleosa, e os grupos polares das moléculas de surfactante expostos para o meio aquoso circundante (McClements, 2012) (Figura 9).

A estrutura da nanoemulsão depende do processo usado para sua formulação (Sonneville-Aubrun *et al.*, 2004), sendo geralmente obtidas por condensação, métodos de emulsificação de baixa energia ou pela aplicação de alta energia durante a emulsificação (conhecido como métodos de dispersão) (Forgiarini *et al.*, 2001). Dentre os métodos de emulsificação de baixa energia, cabe mencionar o método de inversão de fase por temperatura (PIT, siglas em inglês) (Fryd e Mason, 2012), descrito inicialmente por Shinoda e Saito em 1969. Este método se baseia em mudanças de temperatura no sistema, forçando a transição entre uma emulsão O/A em

temperatura baixa, para uma emulsão A/O em temperaturas maiores (fase de inversão transicional). Durante o resfriamento, o sistema passa por um ponto de curvatura espontânea zero com tensão de superfície mínima, promovendo a formação de gotículas de óleo finamente dispersas, retornando para a conformação O/A (Fernández *et al.*, 2004).



Nanoemulsão óleo em água

Figura 9. Diagrama esquemático de nanoemulsão do tipo óleo em água (O/A), tal como a NanoA produzida a partir de óleo, água e tensoativo. Em destaque, ilustra-se a conformação estrutural da gotícula composta por um núcleo hidrofóbico de óleo e caudas de tensoativo e uma parte externa conformada por grupos de cabeças hidrofílicas de tensoativo.

As NE do tipo O/A permitem o encapsulamento de componentes lipofílicos a serem usados em meios aquosos, o que oferece vantagens para o uso de FS empregados na TFD. Uma série de estudos têm demonstrado que as NE possuem a capacidade de melhorar a entrega preferencial de FS aos sítios tumorais tratados com TFD e assim, diminuir os possíveis efeitos tóxicos (Primo *et al.*, 2007). Além disto, a possibilidade de poder funcionalizar a superfície com agentes de direcionamento tem aberto novos caminhos para a entrega direcionada de fármacos, genes, FS e outras moléculas (Shah *et al.*, 2008).

Uma série de estudos tem focado na aplicação de NE e TFD para o tratamento de câncer de pele do tipo não melanoma (Szeimies *et al.*, 1996; Primo *et al.*, 2007; Primo *et al.*, 2008; Gholam *et al.*, 2011; Passos *et al.*, 2013), porém, em revisão recente da literatura não foi possível encontrar nenhum estudo pesquisando a aplicação de nanoemulsões na TFD para o tratamento de melanoma.

3. JUSTIFICATIVA

A prognose do melanoma metastático é extremamente negativa, considerando que os protocolos de quimioterapia e imunoterapia não tem proporcionado, até o momento, uma alta taxa de sobrevida dos pacientes submetidos aos tratamentos convencionalmente utilizados. Estes dados colocam o melanoma em uma posição desafiadora na busca de novos agentes terapêuticos e tratamentos que possibilitem o aumento da sobrevida dos pacientes portadores.

Uma série de trabalhos têm proposto a Terapia Fotodinâmica como uma forma promissora de tratamento. Por este motivo, o presente estudo se propõe a explorar a utilização de nanoemulsões como uma solução nanotecnológica que possibilite a utilização do óleo de açaí como fotossensibilizante de origem natural a ser aplicado na TFD, visando um tratamento adjuvante capaz de combater o melanoma localizado.

Considerando uma série de estudos que comprovaram o potencial terapêutico do óleo de açaí, o qual apresenta propriedades antitumorais, antiinflamatórias, inibitórias da proliferação e crescimento celular, indutor de apoptose e regenerador da pele (Del Pozo-Insfran *et al.*, 2004, Heinrich *et al.*, 2011, pretende-se explorar as suas propriedades fotofísicas, fotoquímicas e terapêuticas em modelos *in vitro* e *in vivo* de melanoma visando a um tratamento mais eficaz e seguro.

4. OBJETIVOS

Com base no que foi anteriormente colocado, o presente trabalho teve como objetivo geral desenvolver nanoemulsões à base de óleo de açaí (NanoA) e avaliar a eficácia das mesmas na Terapia Fotodinâmica (TFD) para o tratamento do melanoma, em modelos *in vitro* e *in vivo*.

Como objetivos específicos foram estabelecidos os seguintes aspectos:

- Avaliar as características físico-químicas, morfológicas (forma e aspecto da superfície) e de estabilidade da nanoemulsão desenvolvida.
- Avaliar as propriedades fotofísicas (espectros de fluorescência e absorbância) e fotoquímicas (produção fotoativada de oxigênio singlete) do óleo de açaí livre e em nanoemulsão.
- Avaliar a citotoxicidade em células de melanoma (B16F10) e em células não tumorais (NIH/3T3) submetidas à exposição com diferentes concentrações de óleo de açaí em nanoemulsão sem irradiação.

Avaliar a citotoxicidade em células de melanoma (B16F10) e em células não tumorais (NIH/3T3) decorrente do tratamento com Terapia Fotodinâmica (óleo de açaí em nanoemulsão e posterior fotoativação com LED).

- Avaliar as alterações morfológicas nas células NIH/3T3 e B16F10 tratadas por TFD mediada por NanoA.
- Avaliar o tipo de morte celular decorrente do tratamento por TFD das células não tumorais (NIH3T3) e de melanoma maligno (B16F10).
- Determinar protocolo para um modelo experimental *in vivo* com células de melanoma transplantadas em camundongos, observando os parâmetros necessários (concentração da nanoemulsão, tempo de acumulação e tempo de irradiação) para aplicação da TFD utilizando a nanoemulsão desenvolvida.
- Avaliar a eficácia da TFD mediada pelo óleo de açaí em nanoemulsão aplicada em modelos *in vivo* mediante avaliação clínica, hematológica e histopatológica de camundongos C57BL/6 com tumores induzidos por injeção subcutânea de células de melanoma murino da linhagem B16F10.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

A elaboração do presente estudo foi feita com base nas etapas metodológicas ilustradas no delineamento experimental (Figura 11). Em resumo, quatro etapas foram desenvolvidas: i) avaliação das atividades fotofísicas e fotoquímica do óleo de açaí; ii) desenvolvimento, caracterização e estabilidade de nanoemulsões à base de óleo de açaí; iii) avaliação *in vitro*, e iv) avaliação *in vivo* da nanoemulsão desenvolvida.

5.2 FONTE DE DIODO EMISSOR DE LUZ (LED)

Para a irradiação da solução de óleo e da nanoemulsão foram utilizados bancos de 20 diodo emissores de luz (LED) modelo XL001WP01NRC660 (Shenzhen Sealand Optoelectronics Co., Ltd., China). O circuito de alimentação foi gentilmente montado pelo Professor Dr. Paulo Souza do Instituto de Física da Universidade de Brasília. O controle da corrente de alimentação capaz de garantir a estabilidade da iluminação foi realizado por um controlador RCD-24-0.35/W, Constant Current LED Driver (Recom Power, Inc., Alemanha). O espectro de emissão dos LED foi determinado utilizando um espectrofotômetro portátil (Ocean Optics Inc., EUA) e um potencímetro digital (Fieldmax II, Coherent, EUA) foi usado para definir o valor de potência máxima do LED e os valores de potência em função da distância e a posição relativa do banco de LEDs. Para garantir a reprodutibilidade da intensidade luminosa emitida pelo banco de LEDs, optou-se por periodicamente realizar a aferição da energia por unidade de tempo mediante potencímetro.

A dosimetria e fluência foram determinadas com base nos valores de potência do LED conforme a variação na distância frontal e lateral entre o detector de luz, associado ao potencímetro, e o LED. Tanto o detector de luz como o LED foram

montados sobre um sistema de suportes sobre trilhos, estes com marcação em centímetros (Figura 10). Foram feitas medições frontais, onde o LED foi mantido em uma posição fixa e o detector de luz foi colocado inicialmente em contato com o LED (distância de dois centímetros) e em seguida foi deslocado em linha reta, até atingir uma distância de 15 centímetros. As medições laterais foram realizadas mantendo o LED em uma posição fixa e o detector a uma distância de cinco centímetros do LED. Em seguida, o detector foi deslocado perpendicularmente em relação ao LED, variando a distância até cinco centímetros, tanto com deslocamento para a direita como para a esquerda do LED. As medições da potência foram feitas a cada deslocamento de um centímetro. Os dados foram aplicados em um *software*, desenvolvido pelo Professor Dr. Paulo Souza, que permitiu calcular um único valor de potência produto do valor de potência obtido para o deslocamento frontal e para o deslocamento lateral.

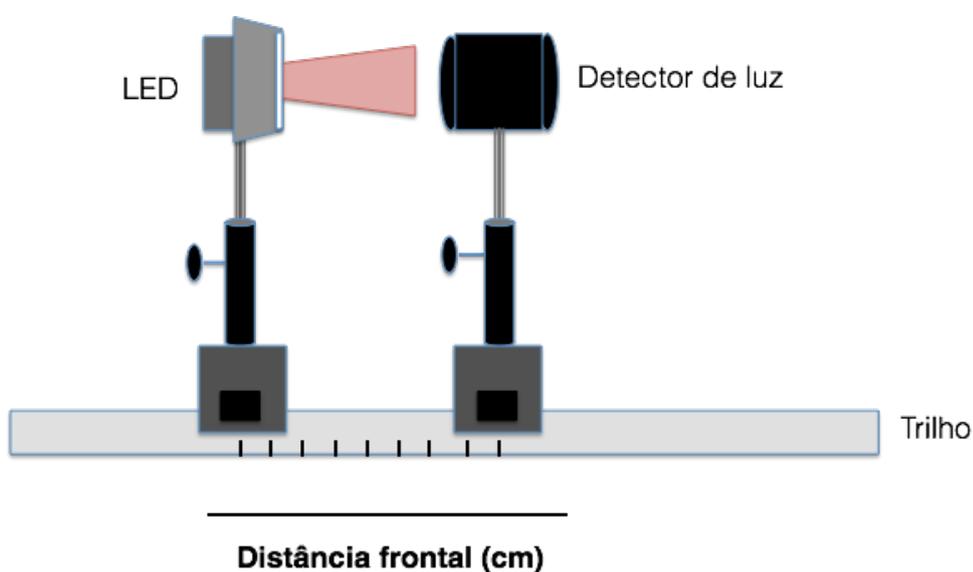


Figura 10. Representação esquemática do sistema utilizado para determinar a potência (mW) da fonte de diodo emissor (LED) conforme variação na distância frontal (cm) entre o LED e o detector de luz.

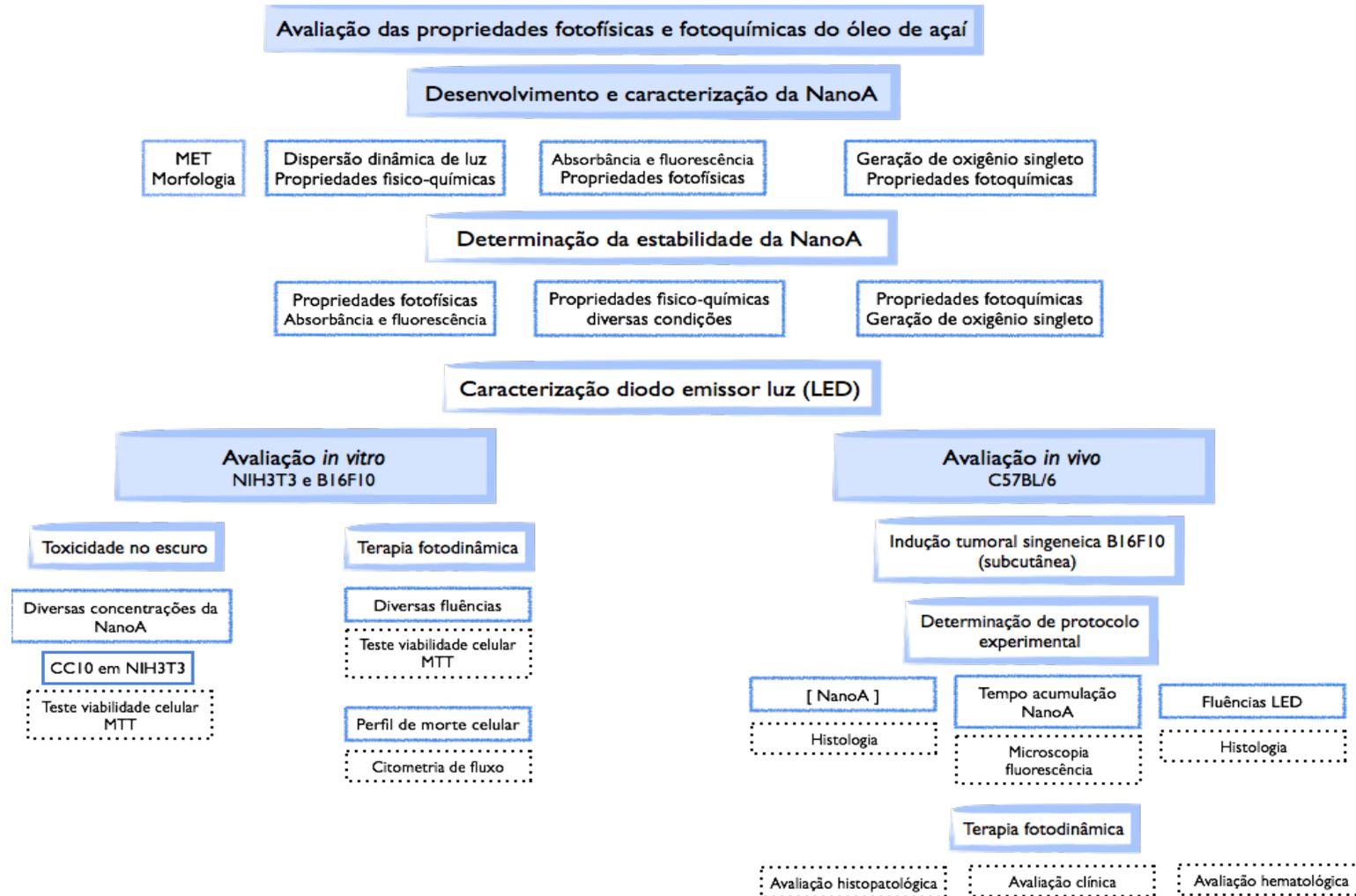


Figura 9. Delineamento experimental ilustrando a metodologia utilizada em cada etapa da pesquisa. Microscopia eletrônica de transmissão (MET), concentração citotóxica (CC), diodo emissor de luz (LED), teste de viabilidade celular 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)2,5-Difenil Brometo de Tetrazolium (MTT), nanoemulsão contendo nanogotículas de óleo de açai como fotossensibilizante (NanoA), e terapia fotodinâmica (TFD).

5.3 CARACTERIZAÇÃO FOTOFÍSICA E FOTOQUÍMICA DO ÓLEO DE AÇAÍ

O óleo de açaí foi extraído a partir de frutos de açaí pela empresa Beraca/Brasmazon Industria de Oleaginosas e Produtos da Amazônia Ltda. (Pará, Brasil) e adquirido da empresa Opção Fênix Distribuidora de Insumos Farmacêuticos, Ltda. (São Paulo, Brasil) para uso na presente pesquisa. O óleo apresentou uma aparência visual de líquido viscoso, com cor amarela-esverdeada e odor característico.

5.3.1 Caracterização fotofísica

Para determinar os espectros de absorvância e de fluorescência do óleo de açaí livre foram pipetados 200 μ L de óleo de açaí puro na concentração de 50 mg/mL em placa (Greiner-BioOne, Brasil) de 96 poços translúcida para efetuar a leitura da sua absorvância e em placa opaca para efetuar a leitura da fluorescência. A absorvância foi obtida no modo *Spectrum* entre os comprimentos de onda de 350 e 750 nm com resolução de 2 nm. No caso da fluorescência, esta foi mensurada utilizando o valor de comprimento de onda de 400 nm para a excitação e comprimento de onda de emissão entre 400 e 750 nm, com resolução de 2 nm, também no modo *Spectrum*. Leituras da absorvância e fluorescência em poços vazios também foram realizadas com o intuito de eliminar dúvidas em relação a possíveis sombras ou artefatos causados pelo aparelho de leitura. Os espectros de absorvância e fluorescência foram obtidos na temperatura de 25 °C em espectrofotômetro leitor de microplacas (SpectraMax M2[®], Molecular Devices, EUA).

5.3.2 Caracterização fotoquímica

Visando a determinar se o óleo de açaí incorporado na NanoA é um eficaz gerador de oxigênio singlete ao ser fotoativado, foi usado o método de degradação do benzofurano-¹O₂-dependente, segundo metodologia adaptada de Spiller e

colaboradores (1998). O 1,3-difenil- isobenzofurano (DBF) é uma molécula que reage pronta e irreversivelmente com o $^1\text{O}_2$, extinguindo a sua absorbância característica em $\lambda = 410 \text{ nm}$. Conforme o benzofurano é decomposto pela geração de $^1\text{O}_2$, a sua absorbância é reduzida de forma proporcional à quantidade de moléculas de oxigênio singlete geradas. Assim, a absorbância decai de forma diretamente proporcional à geração de $^1\text{O}_2$, o que permite a sua quantificação percentual.

Para isto, foi preparada uma solução de benzofurano (Sigma-Aldrich, Ltda., Alemanha) em uma concentração de 1,5 mg/mL diluído em etanol. Em seguida, a solução foi homogeneizada no vórtex e levada ao banho-maria (40 °C) por 10 minutos. Logo, 700 μL da NanoA na concentração de 0,5 mg/mL (diluída em água nanopura) foi preparada e colocada em cubeta de quartzo para leitura no espectrofotômetro (SpectraMax M2[®], Molecular Devices, EUA). Em seguida, adicionaram-se 5 μL de solução etanólica de benzofurano à nanoemulsão, sem irradiação e foi feita leitura dessa amostra. Após, foram feitas irradiações com duração de 10 segundos cada, fazendo leitura de absorbância entre cada irradiação.

A capacidade do fotossensibilizante para gerar $^1\text{O}_2$ foi avaliada pela análise das leituras da absorbância da nanoemulsão pura (sem adição de benzofurano), nanoemulsão com adição de benzofurano antes e após a irradiação da NanoA com o LED. As leituras foram realizadas no espectrofotômetro no modo *Endpoint*, no comprimento de onda de 410 nm. A NanoA foi irradiada com diferentes doses de energia controladas pela distância entre o LED e a cubeta de quartzo, e pelo tempo de irradiação, tendo um efeito de energia acumulativo. Neste experimento, o controle branco utilizado consistiu apenas do tensoativo Tween-80. Estes ensaios foram realizados de forma independente em duas ocasiões, a 25 °C, na presença de O_2 atmosférico e na ausência de luz ambiente. A geração de $^1\text{O}_2$ foi expressa como porcentagem de decaimento da absorbância do benzofurano em relação ao valor de absorbância da solução controle (nanoemulsão + solução de benzofurano antes das irradiações).

5.4 NANOEMULSÃO CONTENDO GOTÍCULAS DE ÓLEO DE AÇAÍ COMO FOTOSSENSIBILIZANTE

5.4.1 Desenvolvimento da nanoemulsão de óleo de açaí (NanoA)

No presente estudo, a nanoemulsão utilizada foi preparada com base no método descrito inicialmente por Shinoda e Saito em 1969, conforme as seguintes etapas:

- **Etapa 1:** foram colocados nove gramas de tensoativo Tween-80 e dois gramas de óleo de açaí em um Becker. Após, a solução foi colocada sob agitação branda por cinco minutos em agitador magnético.
- **Etapa 2:** foi acrescentado um volume de 25 mL de água nanopura à solução de Tween-80 e óleo de açaí. Sob agitação, a emulsão foi aquecida até atingir a temperatura de 85 °C, ponto no qual ocorre a inversão de fases da emulsão e a mesma torna-se translúcida. Completou-se a solução com água nanopura para obter um volume final de 40 mL.
- **Etapa 3:** a emulsão foi resfriada até atingir 40 °C, sobre gelo seco, enquanto mantida sob agitação. Foi realizada apenas uma única inversão de fase.

Como produto final foi obtida uma nanoemulsão com concentração de óleo de açaí de 50 mg/mL. É importante ressaltar que a reprodutibilidade no preparo da NanoA foi testada em diversas ocasiões, mostrando características físico-químicas semelhantes.

5.4.2 Efeito da concentração do tensoativo Tween-80 sobre as características físico-químicas da NanoA

Ao considerarmos que a proporção de tensoativo utilizada no preparo afeta diretamente as propriedades físicas da emulsão (Mun *et al.*, 2005), foi testada uma série de proporções de tensoativo Tween-80 (Sigma- Aldrich, Ltda., EUA) mantendo as quantidades de óleo de açaí e de água nanopura constantes. O presente ensaio foi realizado com o objetivo de determinar a concentração de Tween-80 que possibilita a

obtenção de uma nanoemulsão com características físico-químicas desejáveis para sua aplicação em sistemas biológicos. Assim, para testar o efeito desta variável, o protocolo de preparação de NanoA descrito no item 5.4.1 foi seguido, desta vez variando a razão entre óleo de açaí e o Tween-80, nas proporções de 1:3; 1:4; e 1:5 (óleo : surfactante, massa : massa). Em seguida foi realizada a caracterização físico-química da NanoA. Vale a pena ressaltar que nesta altura do trabalho, a NanoA preparada ainda não tinha sido testada em nenhum sistema biológico.

5.4.3 Caracterização físico-química da NanoA

O diâmetro hidrodinâmico, o potencial zeta e o índice de polidispersão (PDI) da NanoA foram avaliados por espalhamento dinâmico de luz e mobilidade eletroforética utilizando um Zetasizer Nano (ZS90, Malvern[®], EUA) com ângulo de detecção de 90 graus em cubetas de poliestireno. As formulações foram diluídas 100 vezes em solução tampão fosfato salina (PBS) (Laborclin, Ltda., Brasil), pH 7,4 de modo a obter a concentração de NanoA de 0,5 mg/mL. Todas as medidas foram feitas na temperatura de 25 °C e cada valor foi obtido a partir da média de três corridas com pelo menos 10 medições por corrida.

5.4.4 Caracterização fotofísica e fotoquímica da NanoA

Foi seguido o mesmo protocolo descrito nos itens 5.3.1 e 5.3.2 que descrevem a caracterização fotofísica e fotoquímica do óleo de açaí.

5.4.5 Determinação da estabilidade físico-química e fotodinâmica da NanoA

Com o intuito de monitorar a estabilidade da NanoA durante o período inicial de 180 dias, foram preparadas alíquotas de 2 mL mantidas sob as seguintes condições: i) 7 °C; ii) temperatura ambiente; iii) estufa a 50 °C; iv) congelada a -20 °C e v) sequência de vários congelamentos e descongelamentos. A análise foi feita com

amostras frescas (T0) e armazenadas no escuro por 7, 15, 22, 30, 60, 90, 120, 150, e 180 dias após preparo.

As amostras foram analisadas em aparelho de espalhamento dinâmico de luz e mobilidade eletroforética (Zetasizer Nano ZS90, Malvern® Instruments, Ltda., Reino Unido), em relação aos seguintes parâmetros: 1) diâmetro hidrodinâmico médio (D_H); 2) índice de polidispersão (PDI); e 3) potencial zeta. As amostras foram diluídas 100 vezes em PBS de modo a obter a concentração de 0,5 mg/mL e foram lidas com ângulo de detecção de 90 graus em cubetas de poliestireno. Todas as medições foram realizadas na temperatura de 25 °C e cada valor foi obtido pela média de três corridas, sendo que cada corrida consistiu de 10 medidas. Uma vez obtidos os resultados para a estabilidade até 180 dias, somente as amostras de NanoA armazenadas na temperatura ambiente e geladeira (7 °C) mostraram estabilidade, portanto, foram analisadas até o tempo de 365 dias. Adicionalmente, a estabilidade de uma amostra mantida a 37 °C começou a ser avaliada.

Visando a analisar a estabilidade fotodinâmica da NanoA, amostras frescas (tempo 0) e mantidas em temperatura ambiente até o final do experimento de estabilidade (tempo 365 dias) foram analisadas. Assim, amostras de NanoA na concentração de 0,5 mg/mL foram testadas quanto à fluorescência, à absorvância e à capacidade de geração de oxigênio singleto (conforme descrito nas seções 5.3.1 e 5.3.2).

5.4.6 Análise morfológica da NanoA mediante microscopia eletrônica de transmissão

A utilização da microscopia eletrônica de transmissão (MET) teve como objetivo analisar e caracterizar a morfologia das gotículas contidas na nanoemulsão. Assim, foram obtidas informações sobre o tamanho, distribuição de tamanho e formato das gotículas contidas na emulsão.

As amostras de NanoA foram preparadas para a concentração de 0,5 mg/mL em água. No dia do preparo da amostra, 2 µL de NanoA foram colocados em telas de cobre de 300 mesh. A amostra foi então fixada e contrastada com 2 µL de ácido

fosfotúngstico (PTA) 2% por 24 horas em placa de Petri semi-aberta, permitindo a secagem da amostra e a fotoproteção simultânea. Finalmente, o material foi analisado em Microscópio Eletrônico de Transmissão marca Jeol[®] 1011C (Tóquio, Japão) operado a 80 kV para observação e captura de imagens pela câmara Gatan Digital Micrograph[™] 3.11.0 Copyright[©] 1996-2006. As imagens digitais capturadas foram gravadas em formato TIFF.

As eletronicografias obtidas permitiram também a análise morfométrica de 100 nanogótulas selecionadas aleatoriamente e medidas em relação ao seu diâmetro médio pelo *software* Zen versão 1.0.1.0 (Carl Zeiss[®] Microscopy GmbH, EUA).

5.5 EXPERIMENTAÇÃO *IN VITRO*

5.5.1 Linhagens celulares

Os ensaios *in vitro* foram realizados em linhagens celulares imortalizadas murinas de melanoma maligno B16F10 (ATCC[®] CRL-6475[™]) e fibroblastos não tumorais NIH/3T3 (ATCC[®] CRL-1658[™]), ambas adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro, BCRJ, Brasil. No presente trabalho foram utilizadas alíquotas dessas células, as quais encontravam-se congeladas em nitrogênio líquido e mantidas no estoque de células do Laboratório de Nanobiotecnologia do Departamento de Genética e Morfologia da Universidade de Brasília, UnB.

5.5.2 Procedimentos de rotina realizados nos experimentos *in vitro*

5.5.2.1 Meio de cultivo

Para ambas as linhagens foi utilizado o meio de cultivo Dulbecco Modificado (Dulbecco's Modified Eagle Medium – DMEM) (Gibco[®] Life Technologies, Ltda., EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco[®] Invitrogen[™], EUA) e 1% de antibiótico Pen Strep (Gibco[®] Invitrogen[™], EUA) composto por

penicilina 100 U/mL e estreptomicina 100 µg/mL, com pH ajustado para 7,2.

5.5.2.2 Manutenção das células

Todos os procedimentos *in vitro* foram realizados em câmara de fluxo laminar (VecoFlow Ltda, Brasil) previamente esterilizada com luz ultravioleta por 20 minutos e utilizando materiais novos esterilizados. Alíquotas de células foram retiradas do estoque de nitrogênio líquido e descongeladas à temperatura ambiente. Assim, cada alíquota de 500 µL de suspensão celular foram transferidos lenta e cuidadosamente para um tubo tipo Falcon (TPP® Techno Plastic Products, Suíça) contendo dois mililitros de meio de cultivo. Em seguida, o conteúdo do tubo foi submetido à centrifugação a 750 g por três minutos. Após, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspensionado em um mililitro de meio de cultivo, e transferido para garrafa de cultivo celular (TPP® Techno Plastic Products, Suíça) de 25 cm² contendo cinco mililitros de meio de cultivo completo. A garrafa foi mantida em estufa (Thermo Fisher Scientific, Inc., EUA) a 37 °C, em atmosfera contendo 5% de CO₂ e 80% de umidade.

Com a intenção de assegurar a qualidade das células utilizadas nos experimentos, a cada 48 horas metade do meio de cultivo foi substituído por meio novo. O cultivo celular foi observado e monitorado em microscópio de luz invertido modelo CK2 (Olympus Optical Co, Ltd., Japão) com o objetivo de acompanhar o crescimento celular, identificar qualquer mudança nas características morfológicas e detectar possíveis contaminações bacteriana ou fúngica.

5.5.2.3 Estabelecimento de subcultivos celulares

Uma vez que a garrafa com células de interesse atingiam uma confluência de 80-90%, as mesmas eram transferidas para outra garrafa, desta vez em uma menor densidade celular. Para isto, primeiro foi descartado o meio de cultivo contendo células mortas e detritos celulares. Em seguida, as células vivas aderidas ao fundo da garrafa foram desprendidas com dois mililitros (para garrafas de 25 cm²) de solução de Tripsina 0,125% / EDTA 0,02% (Gibco® Invitrogen™, EUA) por três minutos a 37

°C. Após, foi acrescentado meio de cultivo no mesmo volume usado de Tripsina para a inativação da atividade da enzima. Assim, o conteúdo da garrafa foi transferido para um tubo tipo Falcon de 15 mL submetido à centrifugação a 750 g por dois minutos. Após esta etapa, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* de células ressuspendido em um mililitro de meio de cultivo completo.

Para determinar o número de células, 10 µL da suspensão descrita acima foram adicionados a 40 µL de solução de azul tripan (0,4%, p/v, diluídos em PBS). De forma geral, o princípio básico do corante é que este só cora de azul as células que apresentam uma membrana plasmática descontínua, o que indica que a célula não está viável. No caso das células vivas, que apresentam uma membrana plasmática contínua, a célula mantém-se com uma coloração clara. Dez microlitros do preparado foram retirados e colocados em hemocitômetro de Neubauer (Boeco, Alemanha). A concentração de células foi determinada baseando-se na contagem das células viáveis nos quatro quadrantes de canto da câmara de Neubauer. A continuação, o valor foi inserido na seguinte equação:

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

Uma vez feita a contagem, a quantidade de células desejada foi colocada em garrafa de cultivo celular e mantida em incubadora a 37 °C, em atmosfera contendo 5% de CO₂ e 80% de umidade. O meio de cultivo foi renovado conforme necessário para manter o ambiente celular o mais apto possível para a manutenção e crescimento das células em cultivo.

Para cada linhagem de células utilizadas neste estudo foi determinado um limite máximo de 10 passagens para a formação de subculturas. Após este limite, as células eram descartadas. Para a realização dos experimentos, após a quantificação, as células foram transferidas para microplacas de cultura (TPP® Techno Plastic Products, Suíça) com disposição na placa segundo o experimento a ser realizado.

Um estoque de células foi mantido mediante o congelamento das mesmas. Na segunda passagem, as células foram tripsinizadas, centrifugadas e ressuspendidas em

um mililitro de meio completo para sua contagem em câmara de Neubauer. Uma vez feitos os cálculos, as células foram centrifugadas novamente por um minuto e o meio de cultivo foi removido. As células foram ressuspensas em meio de congelamento (95% soro fetal bovino e 5% de dimetilsulfóxido (DMSO)) (Macron™ Chemicals, Avantor™ Performance Materials, Inc., EUA). A suspensão celular foi rapidamente transferida para criotubos autoclavados, cada um recebendo uma concentração celular de 1×10^6 células. Os criotubos foram devidamente identificados, embrulhados em varias folhas de papel toalha, mantidos a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 horas e após esse período foram estocados em nitrogênio líquido.

5.5.2.4 Determinação da viabilidade celular mediante ensaio de MTT

Um dos métodos de análise de viabilidade celular mais utilizados, principalmente pela sua praticidade em relação à rapidez e precisão, é o ensaio colorimétrico quantitativo de brometo de 3(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil de tetrazólio (MTT) (Invitrogen™, EUA), originalmente proposto por Mosmann (1983). O ensaio detecta de forma indireta as células vivas e o sinal gerado é dependente do grau de ativação das células. Em células viáveis, enzimas desidrogenases mitocondriais, em especial a succinil desidrogenase, promovem a redução do reagente MTT em formazan, composto de cor roxa insolúvel em meios hidrofílicos. Assim, somente as células viáveis com mitocôndrias ativas, reduzem o MTT, de forma que a quantificação dos cristais de formazan por espectrofotometria permite fazer uma correlação com a proporção de células vivas.

Para a realização do MTT, o meio de cultivo de cada poço foi substituído por 150 μL de um meio novo contendo uma solução de MTT (5 mg/mL) a 10%. O preparado foi colocado na estufa a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por duas horas. Após esse período, o meio contendo a solução de MTT foi removido e os cristais de formazan de cada poço foram solubilizados pela adição de 150 μL de DMSO. Após homogeneização dos cristais, foi realizada leitura de absorbância a 595 nm em espectrofotômetro conjugado com leitora de microplacas (SpectraMax M2® Molecular Devices, EUA).

5.5.3 *Screening* inicial das concentrações de NanoA: citotoxicidade da NanoA nos tempos de exposição de 24 e 48 horas na ausência de irradiação

Considerando que a pesquisa de novos tipos de tratamentos requer a realização de ensaios iniciais que indiquem o efeito da substância em questão ao interagir com modelos celulares, células NIH/3T3 e B16F10 foram primeiramente mantidas em contato com NanoA pelos tempos de 24 e 48 horas.

Com o objetivo de determinar a maior concentração de NanoA que mantém maior viabilidade celular nas condições de ausência de irradiação, foi calculada a concentração citotóxica que inviabiliza 10% das células (CC10). Para isto foram testadas diferentes concentrações da nanoemulsão nas linhagens celulares de interesse (Figura 12). Portanto, a NanoA estoque [50.000 µg/mL] foi diluída de forma seriada em meio de cultivo completo para obter as seguintes concentrações: 16.666,00; 5.555,00; 1.851,00; 617,00; 205,00; 68,00; 22,00; 7,60; 2,50; 0,85; 0,28; 0,09; e 0,03 µg/mL. Estas concentrações se referem à concentração do óleo de açaí, partindo da sua concentração pura equivalente a 50.000,00 µg/mL.

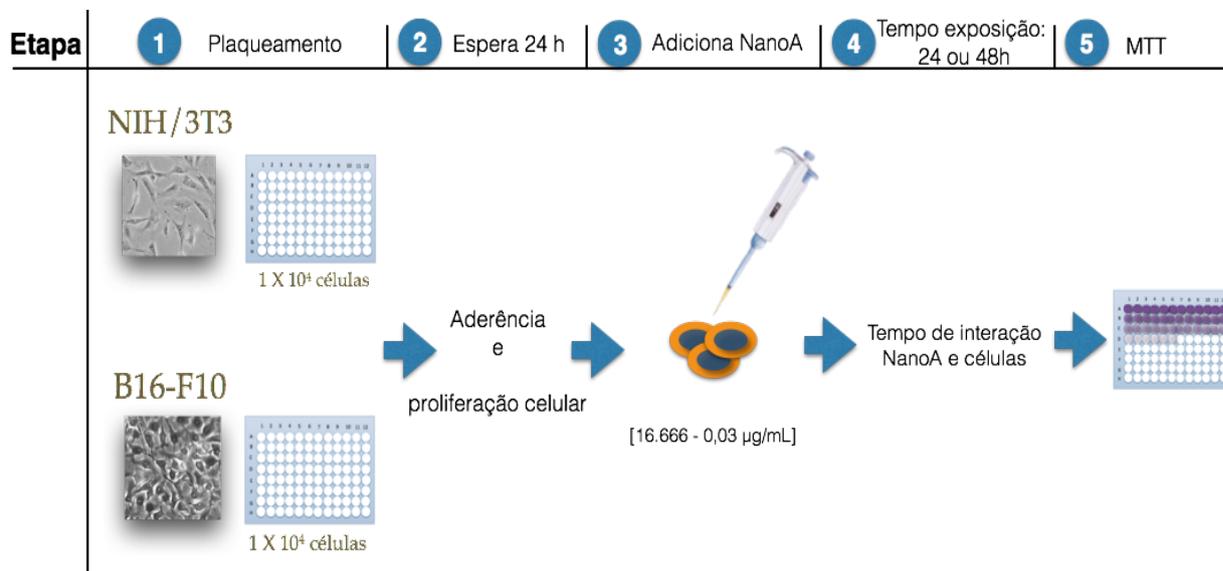


Figura 12. Sequência de etapas envolvidas no teste de citotoxicidade na ausência de irradiação da NanoA em células não tumorais NIH/3T3 e células de melanoma B16F10 expostas à nanoemulsão nas concentrações de 16.666,00; 5.555,00; 1.851,00; 617,00; 205,00; 68,00; 22,00; 7,6; 2,5; 0,85; 0,28; 0,09; e 0,03 µg/mL para os tempos de 24 e 48h. Viabilidade celular foi indiretamente avaliada pelo teste de brometo de 3(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil de tetrazólio (MTT).

Levando em conta que cada linhagem celular apresenta um tempo particular de crescimento e proliferação, as células foram semeadas em microplacas de 96 poços em uma concentração específica para garantir que no dia da administração da NanoA haveria uma confluência aproximada de 60% por poço e uma confluência de 80-90% por poço no dia do teste de viabilidade MTT. Assim, fibroblastos NIH/3T3 e células de melanoma B16F10 foram semeados na concentração de 1×10^4 . Após 24 horas da semeadura, as células se encontravam aderidas à placa, prontas para receberem as diferentes concentrações da NanoA. Assim as células foram mantidas em contato com a NanoA pelos tempos de 24 e 48 horas. Uma vez cumpridos esses tempos, o meio de cultivo com NanoA foi removido e o teste de viabilidade celular MTT descrito na seção 5.5.2.4 foi realizado. O ensaio foi realizado em três experimentos independentes, cada concentração sendo testada em triplicata.

5.5.4 Citotoxicidade da NanoA na ausência de irradiação no tempo de exposição de 15 minutos

Com base nos resultados obtidos nos ensaios de citotoxicidade na ausência de irradiação para o tempo de 24 horas, os próximos experimentos foram realizados usando concentrações específicas de NanoA. O tempo de exposição da nanoemulsão utilizado foi o de 15 minutos, conforme descrito por Carvalho (2013).

O procedimento empregado é descrito a seguir. As células NIH/3T3 e B16F10 foram semeadas em placas de cultivo de 96 poços na concentração de 1×10^4 células por poço. Vinte quatro horas após, o meio de cultivo foi retirado e substituído por meio de cultivo com NanoA nas concentrações de 5.555,00; 1.851,00; 617,00; 205,00; 68,00 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (preparadas por diluição seriada). As células ficaram expostas à NanoA pelo tempo de 15 minutos. Transcorrido esse tempo, a NanoA foi removida e cada poço foi lavado duas vezes com 200 μL de PBS à temperatura ambiente. Em seguida, cada poço foi completado com 200 μL de meio de cultivo novo. A placa foi então colocada na estufa por 24 horas adicionais para então realizar o teste de viabilidade celular MTT. O ensaio foi realizado em três experimentos independentes, cada concentração sendo testada em triplicata (Figura 13).

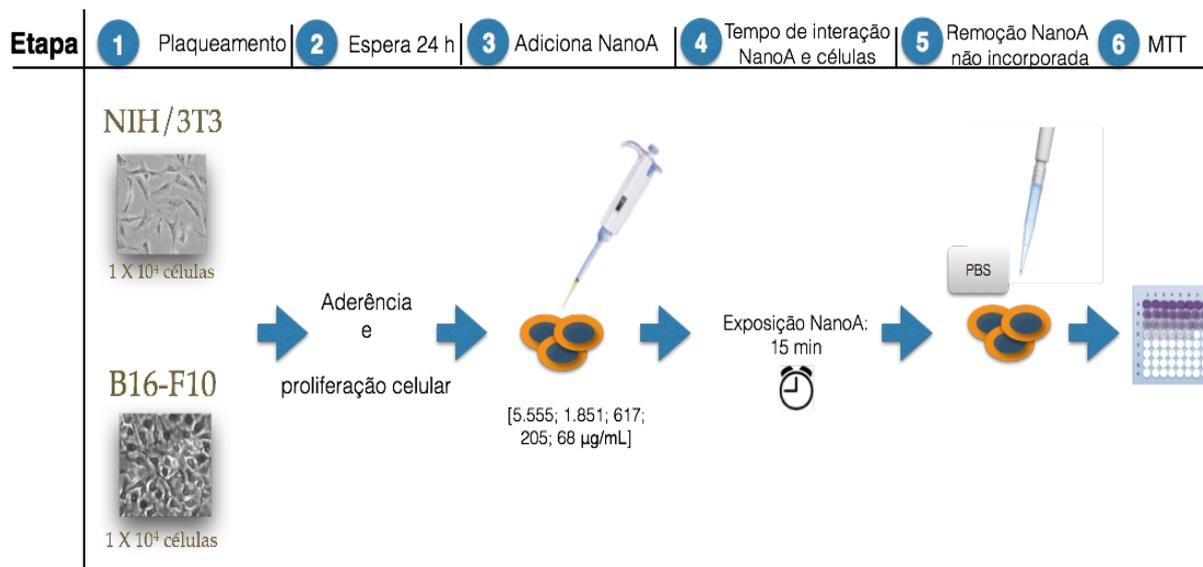


Figura 13. Sequência de etapas envolvidas no teste de citotoxicidade da NanoA na ausência de irradiação em células não tumorais NIH/3T3 e células de melanoma B16F10 expostas à nanoemulsão nas concentrações de 5.555,00; 1.851,00; 617,00; 205,00; 68,00 µg/mL por 15 minutos. Viabilidade celular foi indiretamente avaliada pelo teste de MTT (brometo de 3(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil de tetrazólio).

5.5.5 Efeito da Terapia Fotodinâmica *in vitro*

Considerando que o óleo de açaí contido na NanoA nas condições descritas nas seções 5.5.3 e 5.5.4 mostrou citotoxicidade, procedeu-se à realização de ensaios para determinar os efeitos da TFD com a NanoA, observando variações nas fluências utilizadas.

Para este experimento foi utilizada a NanoA na concentração de 617,00 µg/mL, determinada como a concentração que causa somente 10% de toxicidade (CC10) nas células não tumorais quando expostas pelo tempo de 15 minutos. Foi utilizado LED com $\lambda = 660$ nm. Com o intuito de determinar a dose de energia luminosa aplicada nas células, foi empregada a expressão de fluência, definida como a razão entre a potência luminosa incidente sobre uma circunferência infinitesimal e a sua área de seção reta iluminada pelo feixe incidente, medida na unidade J/cm² (American Association of Physics in Medicine, 2005). Em termos práticos, a fluência representa a energia incidida sobre a área do detector de potência por tempo de

irradiação. Vale a pena esclarecer que o valor da fluência não depende do objeto (placa com células ou tumor) sendo irradiado e sim do sistema de irradiação (LED). Dessa forma, a fluência aplicada nos ensaios foi determinada segundo a equação abaixo:

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

Durante a etapa de caracterização do LED foi observado que nem todos os pontos dentro da área irradiada recebiam a mesma energia. Portanto, com a intenção de garantir que todos os poços/células irradiados recebessem doses semelhantes de energia luminosa, foi estabelecido o uso de placas de 96 poços, sendo que somente 16 poços poderiam ser empregados para semear as células. A disposição desses poços foi centralizada na placa, conforme ilustrado na Figura 14.

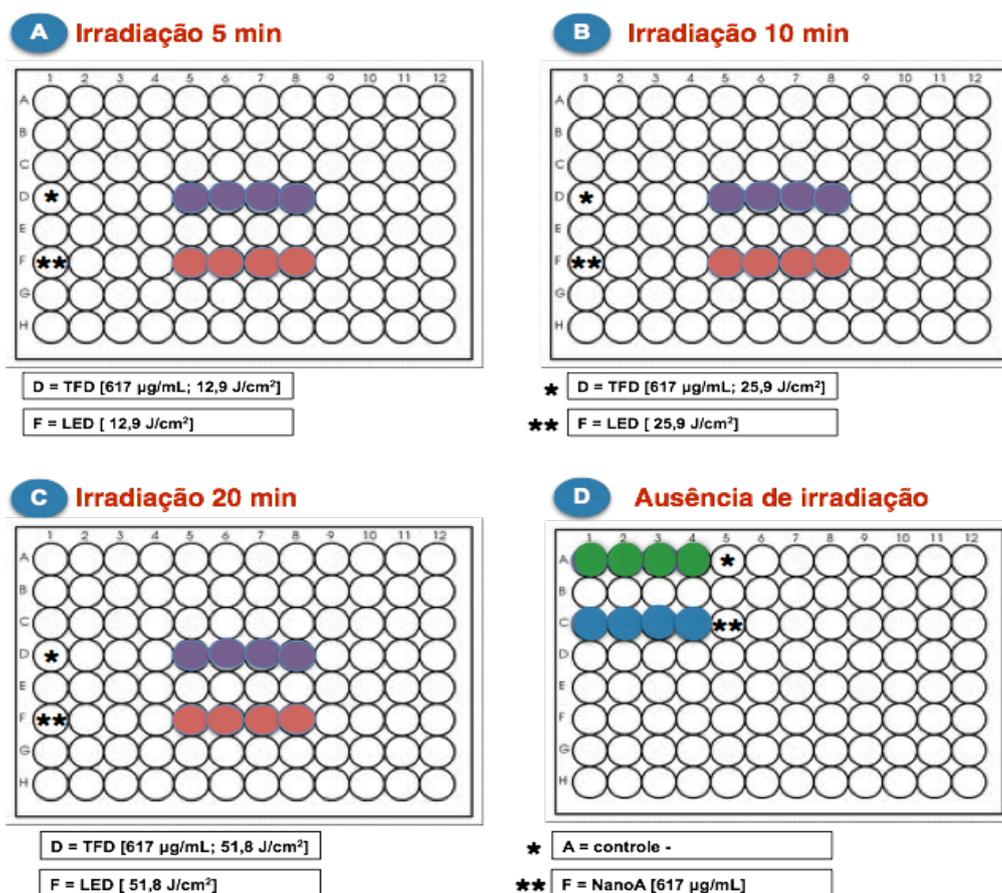


Figura 14. Disposição do plaqueamento das células segundo o tipo de tratamento realizado no ensaio de TFD *in vitro*. **A)** Células tratadas com TFD e LED, irradiadas com fluência de 12,9 J/cm²; **B)** Células tratadas com TFD e LED, irradiadas com fluência de 25,9 J/cm²; **C)** Células tratadas por TFD e LED, irradiadas com fluência de 51,8 J/cm²; **D)** Células não tratadas e tratadas com NanoA, na ausência de luminosidade. TFD: terapia fotodinâmica; LED: diodo emissor de luz; NanoA: nanoemulsão contendo gotículas de óleo de açaí como fotossensibilizante. * e **: Usados para indicar fileira segundo o tipo de tratamento. **Poços em roxo:** células tratadas com TFD; **poços em vermelho:** células tratadas somente com LED; **poços em verde:** células sem tratamento; **poços em azul:** células tratadas com NanoA.

É importante salientar que a taxa de fluência usada foi estabelecida mediante a variação de dois parâmetros: potência (variando segundo a distância entre o LED e o objeto irradiado) e o tempo de exposição à energia luminosa.

Foram designados oito grupos experimentais para cada linhagem celular (Tabela 6). De forma geral, conforme descrito anteriormente, as células de ambas linhagens foram semeadas na densidade de 1×10^4 por poço, sendo que a semeadura foi feita seguindo a disposição ilustrada na Figura 14. As células foram mantidas na estufa para aderir e proliferar por 24 horas e foram feitos os seguintes tratamentos conforme o grupo experimental:

- A) **Controle negativo:** as células não receberam nenhum tipo de tratamento, permanecendo a 37 °C na estufa.

- B) **NanoA:** as células foram expostas à NanoA na concentração de 617,00 µg/mL pelo tempo de 15 minutos a 37 °C na estufa. Após esse tempo, a nanoemulsão não incorporada foi removida com duas lavagens de PBS estéril à temperatura ambiente. Depois, foi colocado meio de cultivo completo nos poços.

- C) **LED:** o meio de cultivo foi removido e substituído por 200 µL de PBS estéril. As células foram irradiadas nas seguintes fluências: 12,9 J/cm²; 25,9 J/cm²; e 51,8 J/cm², lembrando que não houve adição de NanoA. Após a irradiação, o PBS foi removido e substituído por meio de cultivo completo.

- D) **TFD:** as células foram expostas à NanoA na concentração de 617,00 µg/mL pelo tempo de 15 minutos a 37 °C na estufa. Após esse tempo, a nanoemulsão não incorporada foi removida com duas lavagens de PBS estéril e foram colocados 200 µL de PBS em cada poço. Em seguida, as células foram irradiadas com as seguintes fluências: 12,9 J/cm²; 25,9 J/cm² e 51,8 J/cm². Posteriormente à irradiação, o PBS foi removido e substituído por meio de cultivo completo.

Todos os procedimentos foram realizados protegidos da luz, e uma vez terminados os tratamentos, as placas foram protegidas com papel alumínio e recolocadas na estufa de CO₂ à temperatura de 37 °C pelo tempo de 24 horas. Após esse tempo, as células foram submetidas ao ensaio de viabilidade MTT, conforme descrito na seção 5.5.2.4. O ensaio foi realizado em três experimentos independentes, sendo cada tratamento testado em quadriplicata.

As concentrações que matam 10% (CC10) e 50% (CC50) das células foram determinadas pelo *software* GraphPad Prism versão 6.00 (La Jolla, California, EUA).

Tabela 6. Descrição dos grupos experimentais segundo o tratamento aplicado em células não tumorais (NIH/3T3) e células de melanoma (B16F10).

| Grupos experimentais | Tratamento |
|---|---|
| Controle negativo | Nenhum |
| NanoA [617,00 µg/mL] | Exposição à NanoA [617,00 µg/mL]/ sem irradiação |
| Controle LED [12,9 J/cm ²] | Irradiação por 5 min sem adição de NanoA |
| Controle LED [25,9 J/cm ²] | Irradiação por 10 min sem adição de NanoA |
| Controle LED [51,8 J/cm ²] | Irradiação por 20 min sem adição de NanoA |
| TFD [617,00 µg/mL; 12,9 J/cm ²] | Exposição à NanoA [617,00 µg/mL]/ irradiação 5 min |
| TFD [617,00 µg/mL; 25,9 J/cm ²] | Exposição à NanoA [617,00 µg/mL]/ irradiação 10 min |
| TFD [617,00 µg/mL; 51,8 J/cm ²] | Exposição à NanoA [617,00 µg/mL]/ irradiação 20 min |

TFD: terapia fotodinâmica; LED: diodo emissor de luz; NanoA: nanoemulsão contendo gotículas de óleo de açaí como fotossensibilizante; min: minutos.

5.5.6 Análise da morfologia das células após tratamento com Terapia Fotodinâmica

Uma vez realizada a TFD tanto nas células NIH3T3 como nas B16F10, as placas foram analisadas em microscópio de luz invertido com contraste de fase. Foram avaliadas as mudanças na morfologia celular, densidade celular e presença de debris. As fotomicrografias foram capturadas utilizando o programa computacional AxioPhot 2.0 (Carl Zeiss[®], EUA,) em microscópio invertido (Axioskop 2, Carl Zeiss[®], Alemanha).

5.5.7 Análise por citometria de fluxo do tipo de morte celular em células tratadas com Terapia Fotodinâmica

Conforme descrito anteriormente na seção 5.5.4, as células de ambas as linhagens foram semeadas na densidade de 1×10^4 por poço, sendo que o plaqueamento foi sempre feito segundo a disposição ilustrada na Figura 15. As células foram deixadas para aderir e proliferar por 24 horas na estufa.

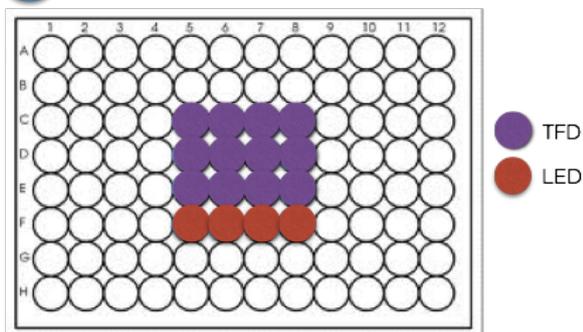
Para este ensaio, foram designados cinco grupos experimentais para a linhagem NIH/3T3 e seis para B16F10. Além dos grupos experimentais já descritos no item 5.5.5, três novos grupos foram adicionados com o objetivo de ter controles positivos de morte para as células estudadas. Dando continuidade à sequência dos grupos experimentais, temos:

E) Peróxido: o meio de cultivo de cada poço foi removido e substituído por 200 μ L de peróxido de hidrogênio a 1 mM, diluído com água nanopura estéril.

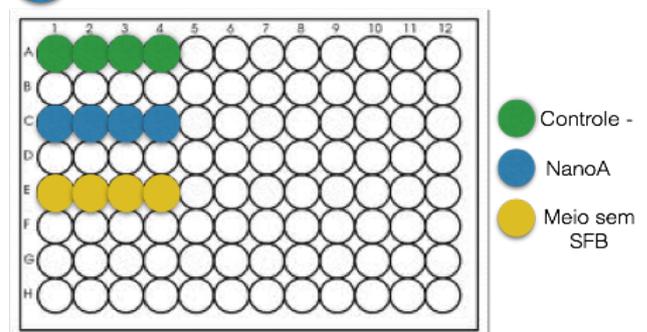
F) Meio de cultivo com privação de soro fetal bovino: o meio de cultivo completo de cada poço foi removido e em seu lugar foram colocados 200 μ L meio de cultivo incompleto (sem adição de soro fetal bovino).

G) Fluoruracila: o meio de cultivo de cada poço foi removido e substituído por 200 μ L de fluoruracila a 4 mg/mL, diluída em água nanopura estéril.

NIH/3T3

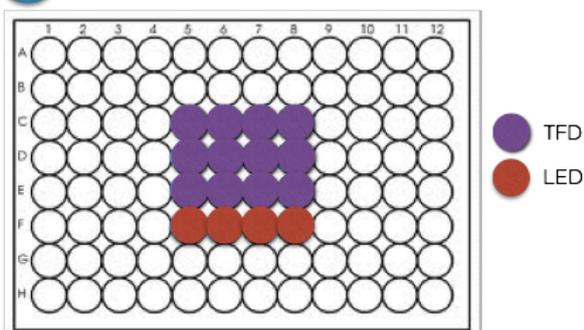
A TFD e controle LED

Placa irradiada

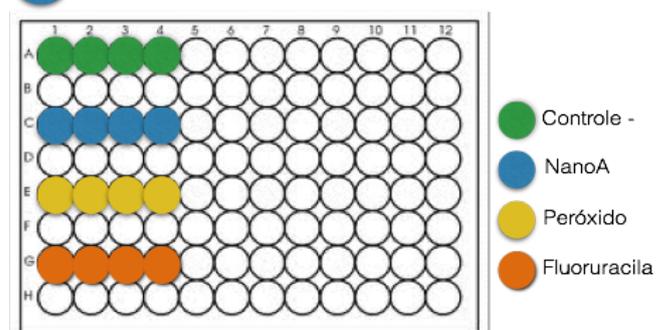
B Controles

Placa não irradiada

B16F10

C TFD e controle LED

Placa irradiada

D Controles

Placa não irradiada

Figura 15. Disposição das placas segundo o tipo de tratamento realizado para análise de morte celular nas células NIH/3T3 e B16F10 pelo método de citometria de fluxo. NIH/3T3 (A e B) e B16F10 (C e D): **A e C**) Células tratadas com TFD [617,00 µg/mL; 25,9 J/cm²] e LED [25,9 J/cm²]; **B**) Grupos controle com células não tratadas (Controle -); células tratadas com NanoA [617,00 µg/mL] na ausência de luminosidade; células tratadas com meio de cultivo incompleto. **D**) Grupos controle com células não tratadas (Controle -); células tratadas com NanoA [617,00 µg/mL] na ausência de luminosidade; células tratadas com peróxido de hidrogênio 1 mM; e células tratadas com fluoruracila 4 mg/mL. TFD: terapia fotodinâmica; LED: diodo emissor de luz; NanoA: nanoemulsão contendo gotículas de óleo de açaí como fotossensibilizante.

Todos os procedimentos foram realizados protegidos da luz, e uma vez terminados os tratamentos, as placas foram protegidas com papel alumínio e colocadas na estufa à temperatura de 37 °C pelo tempo de 24 horas. Depois, foi aplicado o protocolo para citometria de fluxo descrito a seguir.

O sobrenadante de cada poço foi coletado e armazenado em microtubo de centrifugação, de acordo com o seu grupo experimental. As células ainda aderidas em cada poço foram tripsinizadas por três minutos na estufa e a seguir as suspensões celulares foram adicionadas nos microtubos de centrifugação que continham seus respectivos sobrenadantes. Após a centrifugação por cinco minutos, a 2000 g e temperatura de 10 °C, os sobrenadantes foram cuidadosamente removidos e o *pellet* de cada grupo experimental foi ressuspensão em 400 µL de tampão de ligação do kit Anexin-V-FITC (Invitrogen™ – Molecular Probes®, EUA). O volume de 400 µL foi subdividido em quatro grupos, cada microtubo contendo 100 µL da suspensão, considerando que foram feitas as seguintes marcações: 1) negativo para anexina V e iodeto de propídeo; 2) positivo para anexina V e iodeto de propídeo; 3) positivo para anexina V; e 4) positivo para iodeto de propídeo. Tanto a anexina V (A_V) como o Iodeto de Propídeo (IP) foram adquiridos em kit Anexin-V-FITC (Invitrogen™ – Molecular Probes®, EUA). Segundo o tipo de marcação, foram adicionados 5 µL de anexina-V e 10 µL de iodeto de propídeo por microtubo e os mesmos foram incubados por 15 minutos no escuro à temperatura ambiente. Em seguida, as células foram levadas ao citômetro de fluxo Cyflow® Space (Partec, Alemanha). O conteúdo de cada microtubo foi transferido para um tubo especial para citometria de fluxo contendo 1 mL de PBS gelado. Os canais de fluorescência selecionados foram FL1 (sensível na faixa de 520 - 550 nm) para detecção de anexina V e FL2 (sensível na faixa de 560 – 580 nm) para detecção de iodeto de propídeo. No mesmo experimento, as análises de tamanho e granulosidade de superfície das células foram obtidas pela seleção de canais SSC e FSC. As análises foram feitas a partir da aquisição de 10.000 eventos utilizando o software FlowMax® (Partec, Alemanha) e os resultados percentuais foram expressos de acordo com o número total de eventos. O ensaio foi realizado em três experimentos independentes, sendo cada tratamento testado em quaduplicata.

Brevemente, o kit utilizado neste ensaio funciona da seguinte maneira: nas células normais, a fosfatidilserina (PS) se localiza na superfície citoplasmática da membrana celular. Porém, nas células apoptóticas, a PS é translocada da parte interna para a parte externa da membrana plasmática, expondo a PS ao ambiente celular externo (Engeland *et al.*, 1998). A anexina V, é uma proteína que apresenta alta afinidade e especificidade por este fosfolipídio, ligando-se a este e emitindo

fluorescência entre os comprimentos de onda de 515 - 530 nm. A marcação positiva para o IP acontece quando há lesão da membrana celular, marcando o DNA e emitindo fluorescência em comprimentos de onda entre 560-580 nm. Isoladamente, a marcação com IP não é indicativa de apoptose e pode estar associada à ocorrência de necrose celular. Casos em que ocorrem dupla emissão de fluorescência correspondentes tanto à exposição de fosfatidilserina quanto à fragmentação de membrana estão relacionados à morte celular pelo processo de necrose celular, associada com apoptose tardia (Vermes *et al.*, 1995).

5.6 EXPERIMENTAÇÃO *IN VIVO*

5.6.1 Animais

O segundo modelo celular mais utilizado nas pesquisas de melanoma é a linhagem celular de melanoma murino B16, derivada há mais de 60 anos a partir de um tumor induzido quimicamente em camundongos C57BL/6. Desta forma, a linhagem celular e o tipo de camundongo citados representam um modelo singeneico (Fidler e Nicolson, 1976). Considerando que tanto as células B16 como os camundongos C57BL/6 compartilham procedência genética, isto evita que haja rejeição das células tumorais pelo sistema imunitário do animal. Além do mais, os camundongos C57BL/6 possuem um sistema imunitário normal, melhor representando um microambiente tumoral típico (NIH, 2014). Por estes motivos, foi utilizado um total de 75 camundongos fêmeas (*Mus musculus*) C57BL/6, dos quais um primeiro grupo de 60 animais foi destinado para experimentos piloto e os 15 animais restantes foram designados para o experimento final. No início dos experimentos piloto, os animais apresentaram peso variando entre 21,2 - 25,9 gramas e idades entre 12 e 26 semanas. Já para o experimento final, os camundongos tinham peso entre 17,6 - 22,7 gramas e idade de 14 semanas.

Estes animais foram adquiridos do IPEN - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares do CNEN - Comissão Nacional de Energia Nuclear (São Paulo, Brasil) e foram mantidos no Alojamento do Laboratório de Nanobiotecnologia do

Departamento de Genética e Morfologia (Instituto de Ciências Biológicas) da UnB durante o período de quarentena e experimental. Foram alojados em gaiolas (mini isoladores) (Alesco[®], Brasil) de polissulfona, colocadas em prateleiras ventiladas diretamente com sistema de filtração de ar individual para cada mini isolador, evitando assim possível contaminação cruzada. Os camundongos foram mantidos à temperatura controlada (23 °C) com ciclo circadiano automatizado (12/12 horas) e com fornecimento de água filtrada e ração comercial balanceada *ad libitum*. A condução da pesquisa foi previamente autorizada pela Comissão de Ética no Uso Animal do Instituto de Biologia, da UnB (UnBDOCn^o66314/2013) (Anexo).

5.6.2. Transplantação das células de melanoma nos animais

No dia da transplantação das células tumorais, os animais foram anestesiados via intraperitoneal com 100 µL de solução de cloridrato de cetamina 10% (União Química Farmacêutica Nacional S/A., Brasil) e cloridrato de xilazina 2% (Syntec do Brasil, Ltda., Brasil) (80 mg/kg e 10 mg/kg, respectivamente). A seguir, os camundongos receberam injeção subcutânea (no flanco direito) de células de melanoma B16F10 na concentração de 5×10^5 células ressuspensas no volume de 50 µL de meio de cultivo DMEM sem soro fetal bovino.

5.6.3 Definição de protocolo para tratamento por Terapia Fotodinâmica de melanoma

Considerando a utilização inédita do óleo de açaí em nanoemulsão, foi necessário realizar uma série de experimentos piloto (etapas 1 – 4 descritas a seguir) que permitissem definir os parâmetros a serem empregados no experimento final.

Os seguintes procedimentos foram empregados em todas as etapas dos experimentos piloto. O tratamento teve início no quarto dia experimental (T4), momento em que o tumor tornou-se palpável. No dia do término do tratamento, os animais foram eutanasiados mediante overdose de anestésicos, recebendo via

intraperitoneal 200 μ L da solução mãe preparada com 700 μ L de cloridrato de cetamina 10% e 500 μ L cloridrato de xilazina 2%. A coleta de órgãos e tumores foi feita somente quando confirmado o óbito do animal.

5.6.3.1 Etapa 1 – Piloto: Determinação da concentração de NanoA a ser administrada

O objetivo desta etapa foi o de determinar a concentração de nanoemulsão a ser administrada por tumor. Foram utilizados 12 animais com idade de 12 semanas, divididos em quatro grupos experimentais:

1) Grupo controle: recebeu somente a administração intratumoral de 30 μ L de PBS;

2) Grupo experimental NanoA [50 mg/mL]: recebeu a administração intratumoral de 30 μ L de NanoA na concentração de 50 mg/mL.

3) Grupo experimental NanoA [25 mg/mL]: recebeu a administração intratumoral de 30 μ L de NanoA na concentração de 25 mg/mL.

4) Grupo experimental NanoA [12,5 mg/mL]: recebeu a administração intratumoral de 30 μ L de NanoA na concentração de 12,5 mg/mL.

Vinte quatro horas após os tratamentos descritos acima, os animais foram eutanasiados. A seguir, os tumores foram coletados e fixados com fixador Davidson durante 24 horas à temperatura de 4 °C. Seguidamente o material foi processado para sua posterior análise histológica (procedimento histológico descrito em detalhe na seção 5.6.6). A análise visou determinar a proporção entre área de necrose em relação à área tumoral. Vale a pena ressaltar que os animais não foram fotoirradiados, pois o objetivo desta etapa foi o de determinar a concentração máxima de nanoemulsão que não induz ou induz necrose tecidual mínima na ausência de fotoirradiação.

5.6.3.2 Etapa 2 – Piloto: Determinação do tempo de incorporação da NanoA

Uma vez determinada a concentração de NanoA que causa necrose tecidual mínima, procedeu-se à determinação do tempo ideal que permite o maior acúmulo de NanoA no tecido tumoral. Assim, foram destinados nove animais (idade de 16 semanas), subdivididos em três grupos experimentais, cada um com três animais, e um animal como controle. Os animais experimentais foram anestesiados, tiveram as células de melanoma transplantadas e foram tratados conforme descrito anteriormente. O animal controle, em vez de ser tratado com NanoA, recebeu injeção intratumoral de PBS. Foram testados os seguintes tempos de acumulação: 30, 45 e 60 minutos. Uma vez cumpridos os respectivos tempos, os animais foram eutanasiados e o tumor foi preparado para análise por microscopia de fluorescência.

Desta forma, o tumor foi retirado do animal, colocado em microtubo e preservado em *embedding medium*, Tissue Tek[®] O.C.T[™] (Sakura Finetek, Inc., EUA). Logo as amostras foram congeladas rapidamente em nitrogênio líquido e a seguir mantidas em congelador a -80 °C por 24 horas. Para os cortes, foi utilizado um criostato marca Leica[®] modelo CM1850 (Leica Microsystems Limited, Suíça). No dia da criomicrotomia, o tubo contendo a amostra foi descongelado e o tumor foi rapidamente separado para ser emblocado em água dentro do criostato, formando um bloquinho de gelo com o órgão incorporado nele. Cada corte teve uma espessura de 10 µm e foram colocados de oito a dez cortes por lâmina histológica.

A seguir, procedeu-se à marcação, em ausência de luminosidade no ambiente, de cada corte com 20 µL de marcador corante fluorescente DAPI (4'6'-diamidino-2-fenilindol) usado para marcar diretamente o DNA nuclear. O DAPI apresenta máxima absorção no comprimento de onda de 358 nm (ultravioleta) e máximo de emissão de 461 nm (azul). As lâminas preparadas foram então analisadas e fotografadas por microscopia de fluorescência com lâmpada ultravioleta em Microscópio Axiophot Zeiss[®] (Carl Zeiss Microscopy, EUA), capturando as imagens com o software AxioVision, versão 4.6.1.0, Copyright[©] 2002-2004.

5.6.3.3 Etapa 3 – Piloto: Determinação da fluência energética

Nesta última fase dos experimentos piloto, contando já com as informações sobre concentração de NanoA a ser usada e o seu tempo de acumulação, foi colocado como meta determinar a fluência a ser aplicada. Desta forma, foram testadas as seguintes fluências: 12,9 J/cm²; 25,9 J/cm² e 51,8 J/cm². Cada fluência foi testada em três animais e foram usados também três animais como controles com tumor. Assim, todos os animais foram anestesiados, tiveram células de melanoma transplantadas no seu flanco direito, conforme descrito no item 5.6.2. No quarto dia experimental, os animais experimentais foram anestesiados e receberam injeção intratumoral de NanoA e após o tempo de exposição à nanoemulsão, foram irradiados com o LED. Os animais controles receberam somente injeção intratumoral de PBS e não foram fotoirradiados. Vinte-quatro horas após, os animais foram eutanasiados e os tumores foram preparados para análise por microscopia de luz (conforme descrito na seção 5.6.6), com o intuito de escolher a fluência que causou mais áreas de necrose tecidual em relação à área tumoral.

5.6.3.4 Etapa 4 – Piloto: Terapia Fotodinâmica para o tratamento de melanoma

Nesta etapa, foi utilizado um total de 30 animais, divididos em cinco grupos experimentais, conforme ilustrado na Tabela 7:

Tabela 7. Grupos experimentais segundo o tipo de tratamento aplicado no experimento piloto para Terapia Fotodinâmica.

| Grupo experimental | Tumor | NanoA | LED |
|---------------------------|--------------|--------------|------------|
| Controle | não | não | não |
| Controle com tumor | sim | não | não |
| NanoA | sim | sim | não |
| LED | sim | não | sim |
| TFD | sim | sim | sim |

Seis animais por grupo experimental. NanoA: nanoemulsão contendo gotículas de óleo de açaí. LED: diodo emissor de luz. TFD: terapia fotodinâmica.

Conforme determinado pelos resultados obtidos nas etapas anteriores, os grupos experimentais foram compostos da seguinte maneira:

- 1) **Grupo Controle:** os camundongos não tiveram transplantação de células tumorais e não receberam nenhum tipo de tratamento. Os animais foram anestesiados nos mesmos dias que os camundongos dos demais grupos receberam tratamento;
- 2) **Grupo Controle tumor:** animais com tumor, receberam somente a administração intratumoral (30 μ L) de PBS;
- 3) **Grupo experimental NanoA:** animais com tumor, receberam a administração intratumoral de 30 μ L de NanoA na concentração de 25 mg/mL;
- 4) **Grupo experimental irradiado com LED:** animais com tumor, irradiado com a fluência de 29,5 J/cm²;
- 5) **Grupo experimental tratado com TFD:** animais com tumor, receberam administração intratumoral de 30 μ L de NanoA na concentração de 25 mg/mL, com tempo de acumulação de 30 minutos e seguidamente os tumores foram irradiados com LED na fluência de 25,9 J/cm².

Todos os animais foram tratados nos dias experimentais quatro (T4), sete (T7) e dez (T10) após a transplantação tumoral (T0) (Figura 16).

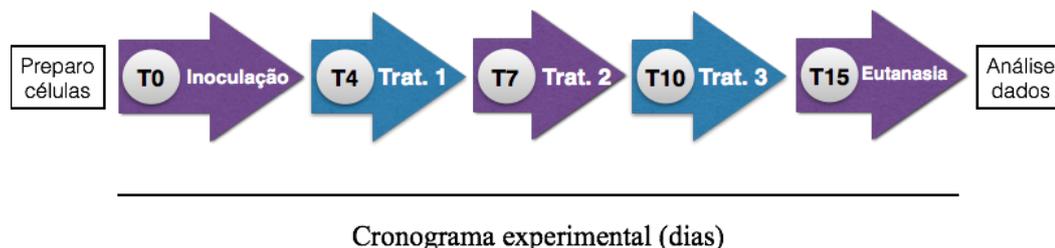


Figura 16. Cronograma experimental praticado no experimento piloto para Terapia Fotodinâmica.

5.6.4 Terapia fotodinâmica para o tratamento de melanoma

Considerando os resultados obtidos na Etapa 4 do experimento piloto, algumas alterações foram praticadas no experimento final de TFD. Entre elas, foi modificada a concentração e volume de NanoA a ser injetada, e o número de tratamentos foi aumentado de três para cinco.

Nesta etapa, foi utilizado um total de 15 animais, divididos em cinco grupos experimentais, com grupos experimentais conforme ilustrado na Tabela 7.

Conforme determinado pelos resultados obtidos nos experimentos piloto, os grupos experimentais consistiram da seguinte disposição:

- 1) **Grupo Controle:** os animais não tiveram transplantação de células tumorais e não receberam nenhum tipo de tratamento. Os camundongos foram anestesiados a cada vez que os animais dos demais grupos foram tratados;
- 2) **Grupo Controle tumor:** camundongos com tumor, receberam somente a administração intratumoral (100 μ L) de PBS;
- 3) **Grupo experimental NanoA:** camundongos com tumor, receberam a administração intratumoral de 100 μ L de NanoA na concentração de 50 mg/mL;
- 4) **Grupo experimental irradiado com LED:** camundongos com tumor irradiado por 10 minutos, com a fluência de 25,9 J/cm²;
- 5) **Grupo experimental tratado com TFD:** camundongos com tumor, receberam a administração intratumoral de 100 μ L de NanoA na concentração de 50 mg/mL, com tempo de acumulação de 30 minutos e seguidamente os tumores foram irradiados com LED na fluência de 25,9 J/cm², por 10 minutos.

Como procedimentos gerais, no dia da transplantação das células de melanoma (T0), os animais foram anestesiados via intraperitoneal com 100 μ L de solução de cloridrato de cetamina 10% e cloridrato de xilazina 2% (80 mg/kg e 10 mg/kg, respectivamente). A seguir, os camundongos dos grupos controle tumor, NanoA, LED e TFD receberam injeção subcutânea (no flanco direito) de células de melanoma na concentração de 5×10^5 células ressuspensas no volume de 50 μ L de

meio de cultivo DMEM sem soro fetal bovino.

Vale a pena ressaltar que em relação ao experimento piloto TFD realizado, no experimento final os animais foram tratados em cinco ocasiões, nos dias experimentais dois (T2), quatro (T4), sete (T7), dez (T10) e treze (T13) após a transplantação das células de melanoma (T0) (Figura 17).

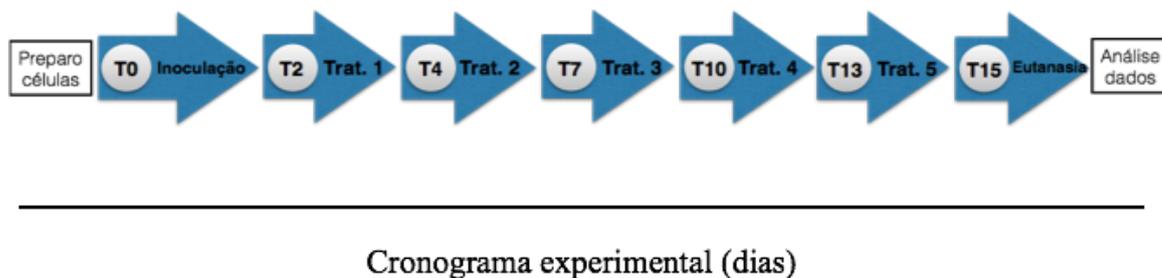


Figura 17. Cronograma experimental praticado no experimento para Terapia Fotodinâmica.

No dia do término do experimento, os camundongos foram eutanasiados mediante overdose de anestésicos, recebendo 200 μ L da solução mãe preparada a partir de 700 μ L de cloridrato de cetamina 10% e 500 μ L cloridrato de xilazina 2%. A coleta de sangue, órgãos e tumores foi feita somente quando confirmado o óbito do animal.

Uma vez que os animais encontravam-se profundamente anestesiados, foi realizada a coleta de amostra sanguínea (aproximadamente 600 μ L) mediante punção cardíaca. A amostra foi separada, colocando-a em tubo condicionado com anticoagulante EDTA (sal dissódico) (Vetec Química Fina Ltda, Brasil) na concentração de 20%, efetivamente sendo usado na concentração de 10% quando diluído no sangue, para análise de hemograma. Todos os tubos foram colocados em uma caixa de isopor contendo gelo e levados ao laboratório de análises. Foi feita uma parceria com o Núcleo de Apoio à Pesquisa do Laboratório Clínico Sabin para a realização destes exames. Foram medidos parâmetros hematológicos tais como: contagem de eritrócitos, hematócrito, hemoglobina, plaquetas, linfócitos, monócitos e leucócitos. A análise foi feita em analisador hematológico Sysmex XE 2100 (Sysmex, Japão).

5.6.5 Avaliação clínica

5.6.5.1 *Peso corporal*

Com o intuito de avaliar o impacto dos tratamentos sendo testados no estado de saúde geral dos animais, o peso destes foi monitorado e registrado logo antes da transplantação das células de melanoma, antes de cada sessão de tratamento e no dia da eutanásia. A medição foi realizada em balança de alta precisão marca Marte, modelo AY220 (Shimadzu Philippines Manufacturing Inc., Filipina) e o peso foi comparado entre os grupos experimentais.

5.6.5.2 *Volume tumoral*

O volume tumoral *in vivo* foi monitorado durante todo o período experimental até o dia da eutanásia (T15) com o objetivo de determinar a eficiência dos tratamentos praticados. A medição foi realizada com paquímetro digital de alta precisão (King Tools) uma vez que o tumor tornou-se mensurável. Tal medição foi feita antes do início de cada sessão de tratamento e antes da eutanásia dos animais. A Figura 18 mostra um camundongo portador de tumor de melanoma no tempo experimental 15 dias. O volume tumoral *in vivo* foi determinado pela fórmula (Schuh, 2004):

$$\text{Volume tumoral } in \text{ vivo: } (\text{comprimento}) \times (\text{largura})^2 \times 0,5$$

Uma vez excisados os tumores, foi realizada a medição destes, e o volume *ex vivo* foi determinado pela fórmula (Schuh, 2004):

$$\text{Volume tumoral } ex \text{ vivo: Comprimento } \times \text{ largura } \times \text{ altura}$$



Figura 18. Camundongo C57BL/6 portador de tumor de melanoma. No caso, o animal pertence ao grupo Controle tumor. Tempo experimental 15 dias.

5.6.5.3 Análise dos órgãos não alvo

Com o intenção de avaliar qualquer tipo de alteração nos órgãos não alvo, decorrente da presença de tumor no animal, foram feitas observações macroscópicas e foram calculados o peso absoluto e relativo do fígado, baço, rim direito e rim esquerdo.

O peso absoluto do órgão é determinado pelo peso bruto obtido na balança. O peso relativo é calculado segundo a fórmula:

$$\text{Peso relativo: } \frac{\text{peso do órgão}}{\text{peso total do animal}} \times 100$$

Além disto, os animais foram monitorados em relação ao seu comportamento, e presença de necrose tumoral.

5.6.6 Avaliação histopatológica

Imediatamente após a retirada de cada órgão, os mesmos foram rapidamente lavados com solução salina 0,9% e posteriormente fixados com fixador Davidson (9 partes de solução Davidson estoque- 400 mL de glicerina, 800 mL de formaldeído 37%, 1200 mL de etanol 95%, 1200 mL água destilada- e uma parte de ácido acético glacial (Shaw e Battle, 1957)) durante 24 horas à temperatura de 7 °C.

Após a fixação, as amostras foram desidratadas com etanol, em uma série de concentrações crescentes (70, 80 e 90%) e três vezes em etanol absoluto. Em seguida, as amostras foram diafanizadas ao serem colocadas em uma solução 1:1 de álcool e xilol, seguido por três banhos em xilol puro. Para a inclusão, o material foi submetido a três banhos de parafina em estufa a 58 °C. Cada banho do material nas soluções teve uma duração de 45 minutos e cada banho na parafina teve uma duração de 1 hora. Por último, o material foi incluído em blocos de parafina e moldados por barras de metal reguláveis.

Após a solidificação dos blocos de parafina, foi utilizado um micrótomo Leica® modelo RM2125RT (Leica Microsystems, China) para realizar a microtomia. O tipo de corte praticado foi o semi-seriado, definido aqui pela obtenção inicial de quatro cortes, cada um com uma espessura de 5 µm, colocados em uma lâmina de vidro (Bioslide, China). Em seguida, desprezaram-se cinco cortes, cada um com espessura de 50 µm. Após, cortaram-se mais quatro cortes com espessura de 5 µm cada, os quais foram colocados em outra lâmina de vidro, produzindo para cada órgão uma média aproximada de três lâminas, uma lâmina para a região proximal, media e distal do bloco. Todas as lâminas foram mantidas em estufa a 37 °C durante 48 horas para garantir uma melhor aderência dos cortes às lâminas.

Uma vez obtidos os cortes histológicos, procedeu-se à coloração pelo método

de hematoxilina e eosina (H&E). As lâminas selecionadas foram submetidas a um processo de desparafinização e hidratação, com três banhos em soluções de xileno (um minuto cada), três de soluções de etanol 100% (um minuto cada), etanol 90%, 80% e 70% (um minuto cada). As lâminas foram colocadas primeiro no corante hematoxilina, lavadas por um minuto em água corrente e, posteriormente, coradas em eosina. Os tempos de coloração tanto na hematoxilina como na eosina variaram dependendo do tipo de tecido sendo corado.

Em seguida, o material foi desidratado em uma concentração crescente de etanol 70%, 80%, 90%, 100% (três vezes) e xileno puro (três vezes), cada banho com duração de um minuto. Após o último banho de xileno, as lâminas foram recobertas com lamínulas (Glasscyto) utilizando-se Entellan[®] (Merck, Alemanha) como meio de montagem, e colocadas para secar em estufa, a 37 °C, por 24 horas. Todos os solventes utilizados (xilol P.A., etanol P.A., formaldeído, ácido acético P.A.) foram fabricados pela Vetec[®] Química Fina, Ltda., Brasil.

As lâminas histológicas foram analisadas no microscópio óptico de luz modelo Axioskop 2 (Carl Zeiss[®] Microscopy, EUA) e documentadas digitalmente mediante o *software* Zen versão 1.0.1.0 (Carl Zeiss[®] Microscopy GmbH, EUA).

De forma geral, os tumores foram analisados em relação à presença, tipo e intensidade de infiltrados inflamatórios; presença e padrão de necrose; número de campos (mm^2) com necrose e números de campos (mm^2) com tumor. Qualquer outro tipo de anormalidade foi levada em consideração. A análise das áreas de necrose ocupando o tecido tumoral foi realizada mediante planimetria por contagem de pontos. Para isto, utilizou-se um sistema padrão composto por um retículo graduado contendo 100 campos, cada campo resultante das intersecções entre as linhas horizontais e verticais, formando quadrados com área de 1 mm^2 cada. O retículo foi sobreposto à imagem histológica e assim determinou-se o número de campos sendo ocupados com necrose e com tumor. Em seguida, a razão (número de campos com necrose (mm^2) / número de campos com tumor) (mm^2) e a média desses dados foi calculada.

Em relação à análise histopatológica dos órgãos de interesse para o estudo (pulmão, rim, baço, fígado) foram consideradas possíveis alterações segundo as

peculiaridades de cada órgão. Todas as lâminas de pulmão foram analisadas em relação à presença, intensidade, tipo e localização de infiltrados inflamatórios; e alterações nos septos alveolares. No rim foram considerados os seguintes aspectos para análise: congestão, degeneração tubular, alterações glomerulares, hemorragia e áreas de necrose. No tecido esplênico, foi analisada a presença de congestão e intensidade de hiperplasia linfóide da polpa branca (quantidade de polpa branca vs. polpa vermelha). Alguns achados ocasionais foram também considerados. No caso do fígado, foram consideradas as seguintes alterações: presença de lesões celulares reversíveis (degeneração hidrópica e esteatose), necrose, congestão de vasos sanguíneos e infiltrado inflamatório. A degeneração hidrópica foi graduada como discreta e moderada de acordo com a amplitude de células afetadas no órgão, e não com base no tamanho celular dos hepatócitos (edema citoplasmático).

5.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram avaliados por meio de estatística paramétrica ou não paramétrica de acordo com a distribuição da normalidade. Para os dados paramétricos foi realizada ANOVA (Análise de Variância) seguida do teste Tukey-Kramer e os dados não paramétricos foram analisados com o teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn. O programa estatístico utilizado foi GraphPad InStat versão 3.02 (GraphPad software, EUA), com nível de significância considerado $p < 0,05$.

6. RESULTADOS

6.1 CARACTERIZAÇÃO FOTOFÍSICA DA FONTE DE DIODO EMISSOR DE LUZ (LED)

A caracterização do LED utilizado neste trabalho mostrou, pela análise do espectro de emissão, um pico máximo em 660 nm (Figura 19), portanto, emitindo fótons dentro da faixa do vermelho visível.

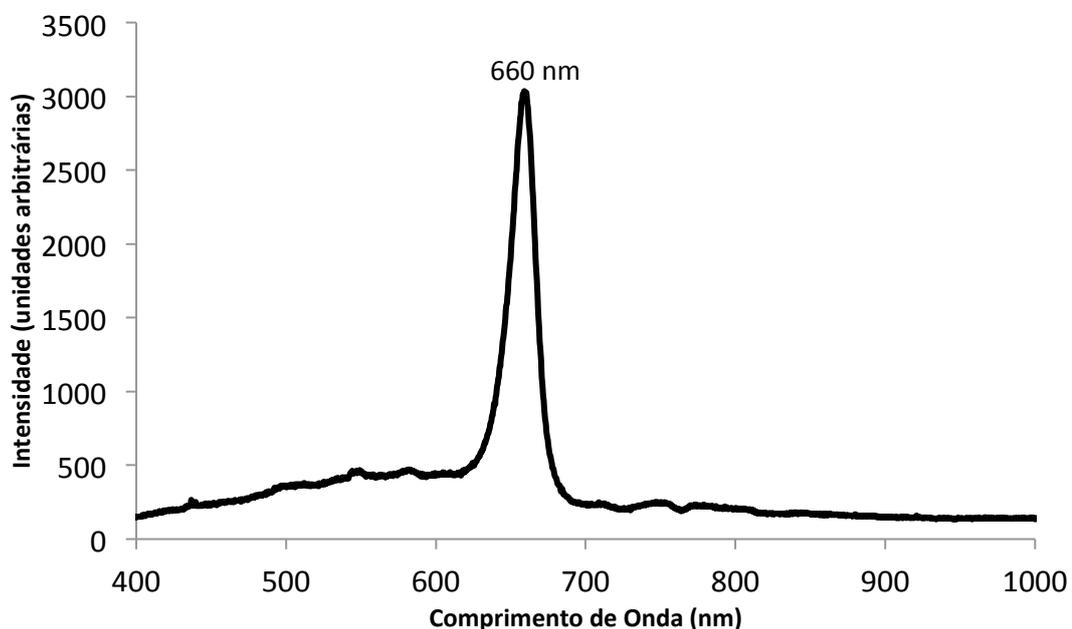


Figura 19. Espectro de emissão da fonte de diodo emissor de luz (LED) com pico máximo em 660 nm.

A medição feita mediante potencímetro digital revelou que o LED apresentou uma potência máxima de 800 mW e uma taxa de fluência de 55 mW/cm². Considerando que a eficácia clínica da TFD depende de uma dosimetria e fluência adequada da luz (Agostinis *et al.*, 2011), foram feitas medições frontais (Tabela 8) e laterais (Tabela 9) entre o LED e um detector de luz para determinar a condição experimental ideal.

Tabela 8. Valores de potência (mW) emitidos pela fonte de diodo emissor de luz (LED) conforme variação de distância (cm) entre o LED e o detector de luz. Medições foram feitas de forma frontal entre o detector de luz e o LED.

| Distância (cm) | Potência (mW) |
|-----------------------|----------------------|
| 2 | 715 |
| 3 | 391 |
| 4 | 232 |
| 5 | 151 |
| 6 | 104 |
| 7 | 76 |
| 8 | 58 |
| 9 | 45 |
| 10 | 37 |
| 11 | 31 |
| 12 | 25 |
| 13 | 22 |
| 14 | 19 |
| 15 | 16 |

Medições feitas com deslocamento lateral entre o detector e o LED revelaram que há diferenças nos valores de potência dependendo da localização do alvo dentro do campo sendo irradiado (Tabela 9).

Tabela 9. Valores de potência (mW) emitidos pela fonte de diodo emissor de luz (LED) conforme variação de distância (cm) entre o LED e o detector de luz. Medições foram feitas de forma lateral entre o detector de luz e o LED.

| Distância (cm) | Potência (mW) |
|-----------------------|----------------------|
| -5 | 17 |
| -4 | 28 |
| -3 | 43 |
| -2 | 62 |
| -1 | 79 |
| 0 | 89 |
| 1 | 88 |
| 2 | 72 |
| 3 | 52 |
| 4 | 35 |
| 5 | 24 |

De acordo com a literatura, o desejado é trabalhar com fontes de luz com valores de potência oscilando entre a faixa de 1 mW – 500 mW e comprimento de onda entre 600-800 nm para evitar efeitos térmicos (Huang *et al.*, 2009; Soares *et al.*, 2011). Desta forma, considerando os resultados de caracterização obtidos, determinou-se que a distância entre o LED e o objeto a ser irradiado seria de cinco centímetros (deslocamento frontal), pois ao considerar um valor de deslocamento lateral de zero, ou em outra palavras, a potência no ponto central do campo sendo irradiado, equivale a 145,5 mW. Já quando foi considerado um deslocamento lateral, por exemplo de 2,5 cm, representando a periferia do campo de irradiação, temos que o valor de potência equivale a 98,6 mW. Estes valores de potência foram usados nos

cálculos de fluência, utilizando o valor da média (122,05 mW) destes com o intuito de abarcar todos os pontos entre o centro e a periferia do campo.

6.2 CARACTERIZAÇÃO DA NANOEMULSÃO CONTENDO GOTÍCULAS DE ÓLEO DE AÇAÍ COMO FOTOSSENSIBILIZANTE

6.2.1 Padronização do protocolo de preparo de NanoA

Considerando que diferentes proporções de tensoativo e o número de inversões de fase alteram as características físico-químicas das nanogotículas, especialmente o PDI e o diâmetro hidrodinâmico, foram testadas as proporções de 1:3, 1:4 e 1:5 (óleo / tensoativo Tween-80) (Figuras 20 - 22).

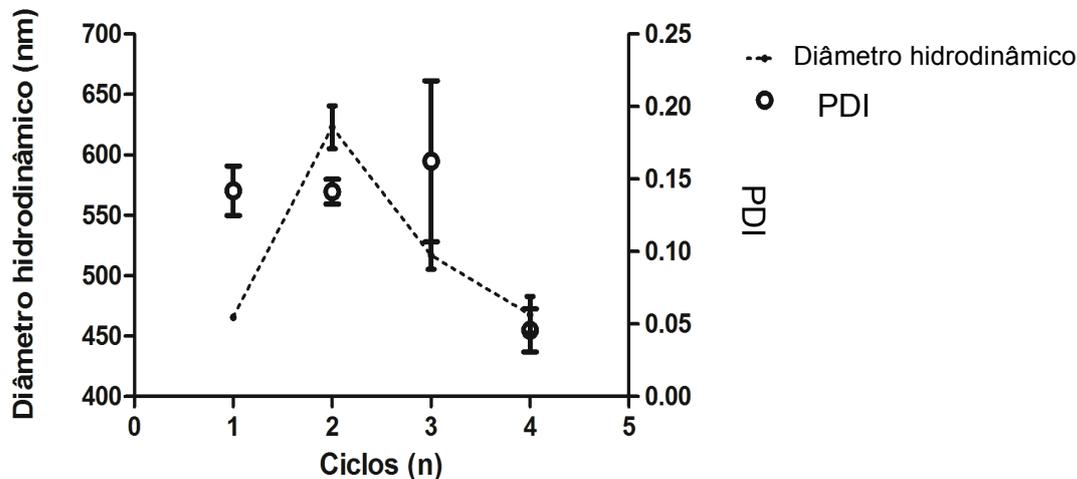


Figura 20. Diâmetro hidrodinâmico médio e índice de polidispersão da NanoA com proporção de óleo de açaí para tensoativo Tween-80 equivalente a 1:3, com até quatro ciclos de inversão de fase.

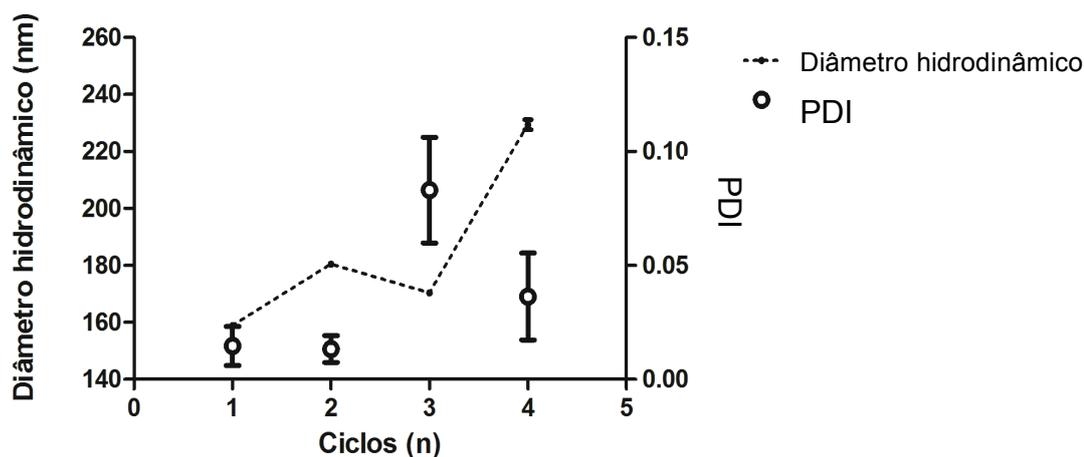


Figura 21. Diâmetro hidrodinâmico médio e índice de polidispersão da NanoA com proporção de óleo de açaí para tensoativo Tween-80 equivalente a 1:4, com até quatro ciclos de inversão de fase.

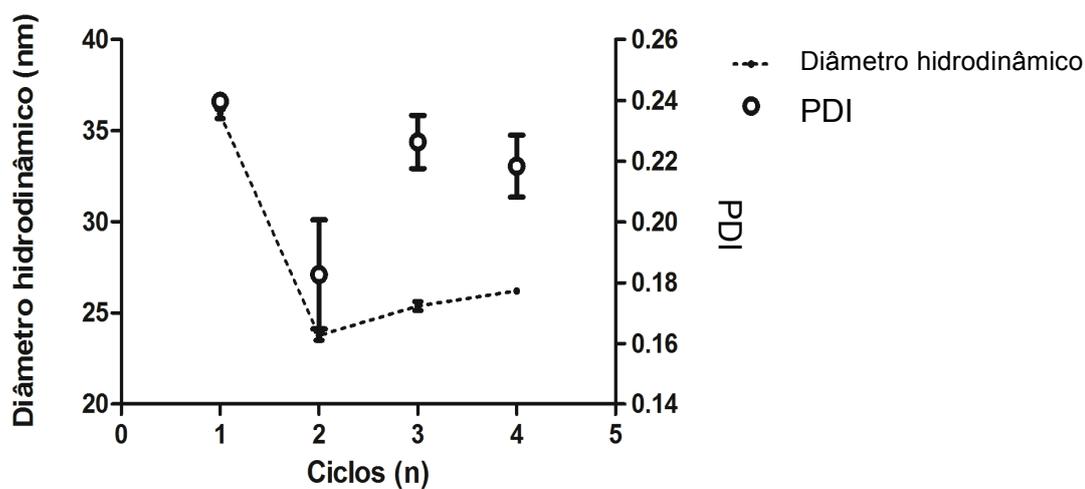


Figura 22. Diâmetro hidrodinâmico médio e índice de polidispersão da NanoA com proporção de óleo de açaí para tensoativo Tween-80 equivalente a 1:5, com até quatro ciclos de inversão de fase.

A proporção de 1:3 foi descartada pois, apesar de ter mostrado valores de PDI dentro do desejado, o diâmetro hidrodinâmico médio teve valores onde as gotículas seriam mais facilmente fagocitadas pelo sistema retículo endotelial. Assim, considerando que a objetivo era a obtenção de nanogotículas com diâmetro

hidrodinâmico médio com valores até 200 nm, ideal para formulações nanofarmacêuticas (Bawarski *et al.*, 2008), e um índice de PDI < 0,1; indicador de uma distribuição mais monodispersa, foi definido que a NanoA seria preparada na proporção de 1 : 4,5 (óleo : surfactante) com um único ciclo de inversão de fase para a formulação final.

6.2.2 Caracterização do óleo de açaí

6.2.2.1 Espectrofotometria

Dados referentes às análises realizadas em espectrofotômetro revelaram que o óleo de açaí apresenta pico de absorção e de emissão de luz na região do vermelho. As Figuras 23 e 24 mostram que o óleo de açaí possui pico de absorção em 666 nm e pico de emissão em 670 nm.

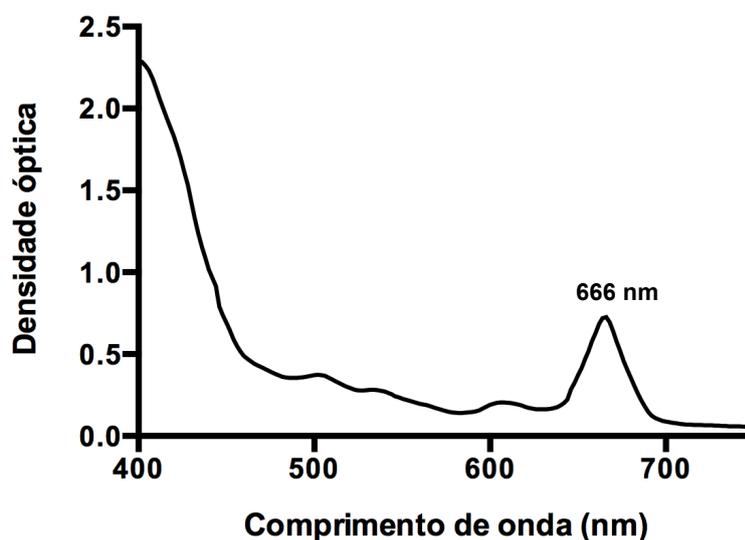


Figura 23. Espectro de absorbância do óleo de açaí, com pico de absorção em 666 nm.

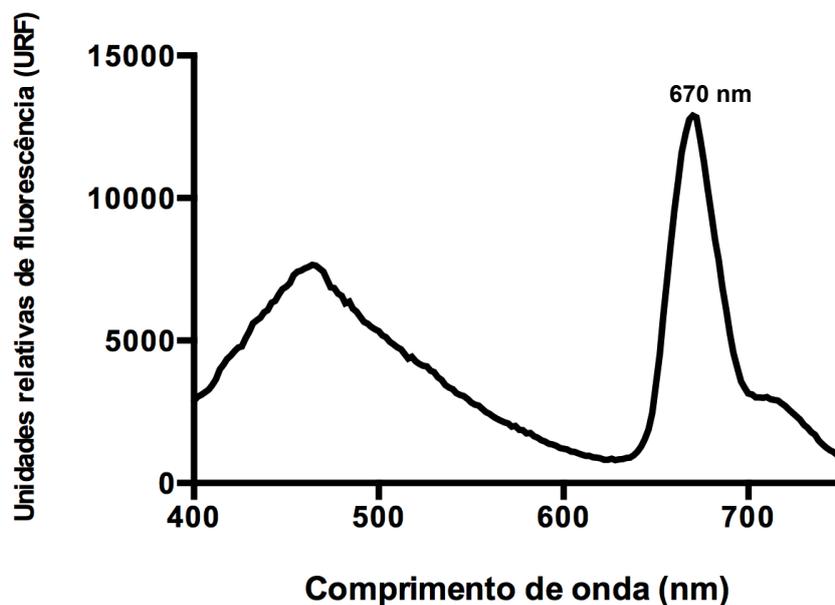


Figura 24. Espectro de fluorescência (excitação em 350 nm) do óleo de açaí com pico de emissão em 670 nm. Resultados expressos como unidades relativas de fluorescência (URF) em função do comprimento de onda de emissão.

6.2.2.2 Geração de espécies reativas de oxigênio

O óleo de açaí mostrou capacidade de geração de espécies reativas de oxigênio, detectado indiretamente pelo decaimento do benzofurano, conforme este se associou irreversivelmente ao oxigênio singleto sendo produzido pela interação entre o óleo, oxigênio molecular e diferentes doses de energia luminosa (Figura 25). Conforme as doses energéticas foram aumentando, a oxirredução do benzofurano foi observada.

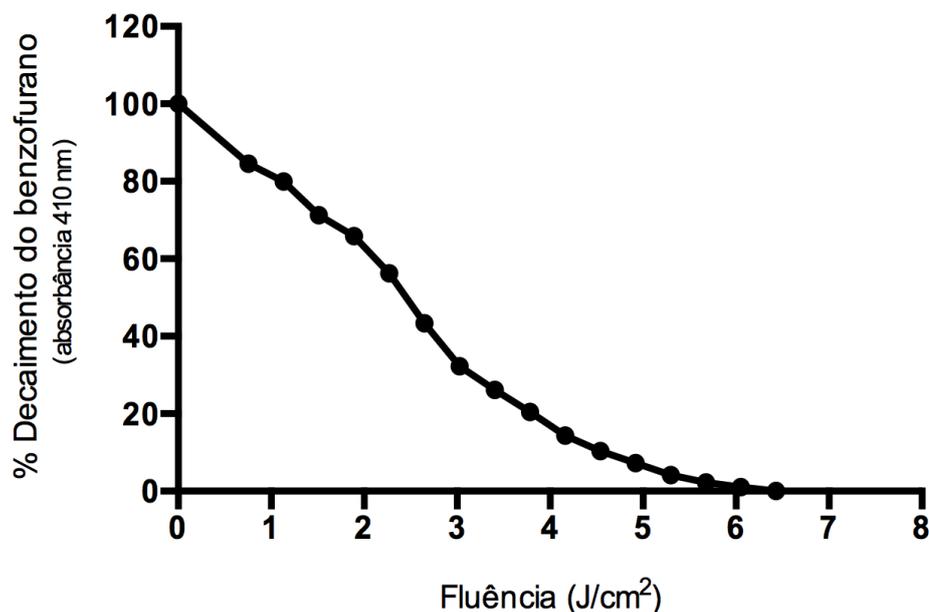


Figura 25. Teste de degradação do benzofurano-¹O₂-dependente para detecção de geração de espécies reativas de oxigênio pelo óleo de açaí ao ser irradiado por fonte diodo emissor de luz ($\lambda = 660 \text{ nm}$) em diferentes doses de energia na presença de oxigênio.

6.2.3 Caracterização da NanoA

6.2.3.1 Variáveis físico-químicas da NanoA

A análise por espalhamento dinâmico de luz da NanoA mostrou que o protocolo de preparação utilizado possibilita a obtenção de nanoemulsões que contêm nanogotículas com diâmetro hidrodinâmico (DH) com média de $117,5 \pm 2,44 \text{ nm}$ (Figura 26), índice de polidispersividade de 0,144 e potencial zeta negativo (-0,536 mV). O baixo valor de PDI encontrado, é refletido neste gráfico que ilustra a distribuição simétrica e unimodal dos valores de DH, representando uma população de nanogotículas com baixa polidispersão. A análise por MET revelou um pico

máximo na curva de Gauss para a frequência de tamanhos equivalente a 74 nm (Figura 27).

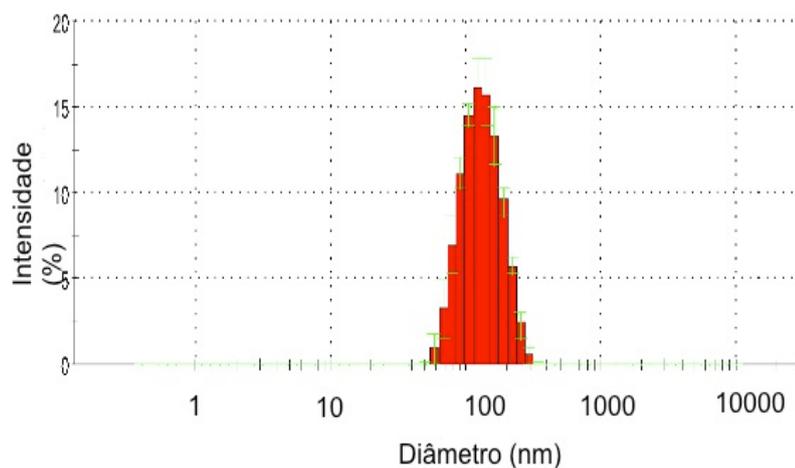


Figura 26. Distribuição de valores de diâmetro hidrodinâmico para a NanoA em concentração de 0,5 mg/mL diluída em solução salina tamponada com fosfato (PBS), pH 7,4. As colunas representam a média \pm desvio padrão para três medidas realizadas em uma mesma amostra.

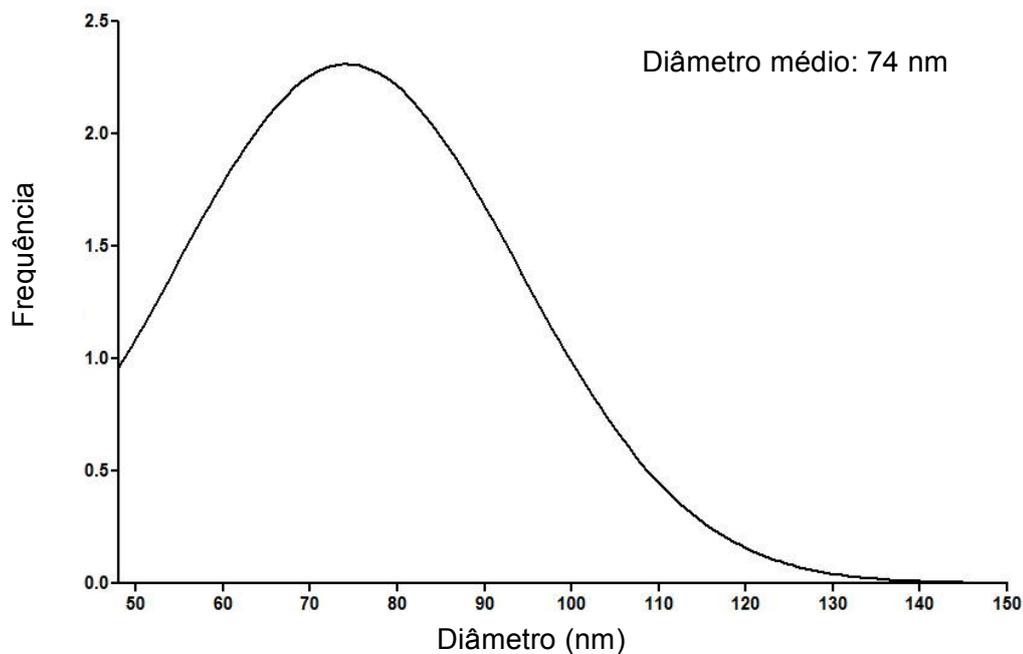


Figura 27. Distribuição gaussiana da frequência com valores de diâmetro da NanoA. Medidas obtidas a partir da morfometria de gotículas registradas em eletromicrografias de microscopia eletrônica de transmissão.

6.2.3.2 Variáveis fotofísicas da NanoA

Os espectros de absorvância (Figura 28) e de fluorescência (Figura 29) mostram que a NanoA apresenta pico de absorção em 666 nm e de emissão em 670 nm, na região do vermelho.

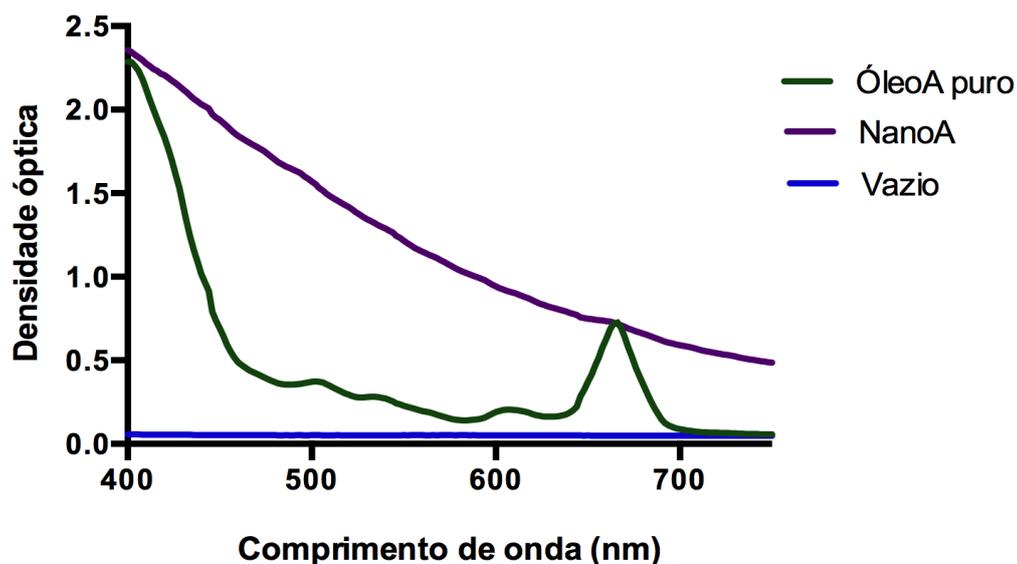


Figura 28. Espectro de absorvância do óleo de açaí associado à NanoA e do óleo de açaí livre com pico de absorção em 666 nm. Vazio: leitura da absorvância de poços

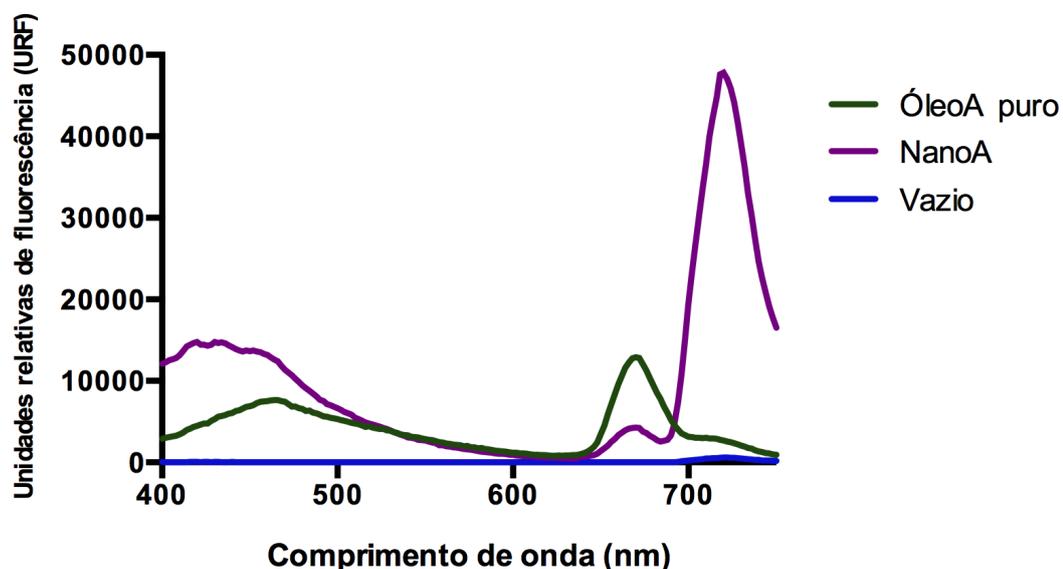


Figura 29. Espectro de fluorescência do óleo de açaí associado à NanoA e do óleo de açaí livre com pico de emissão em 670 nm (λ de excitação em 400 nm). Vazio: leitura da fluorescência de poços vazios.

6.2.3.3 Análise da morfologia da NanoA mediante microscopia eletrônica de transmissão (MET)

A análise da NanoA mediante MET revelou informações importantes para a caracterização da nanoemulsão (Figura 30), fornecendo dados em relação à morfologia e dispersão das nanogotículas de óleo de açaí contidas na nanoemulsão, assim corroborando com os dados obtidos pelo método de espalhamento dinâmico da luz (Figura 26). Em (A) observam-se nanogotículas com tamanhos semelhantes entre si, o que caracteriza uma população com baixa polidispersão. Em (B) observa-se o detalhe da morfologia esférica destas e pouca variabilidade em relação ao seu tamanho.

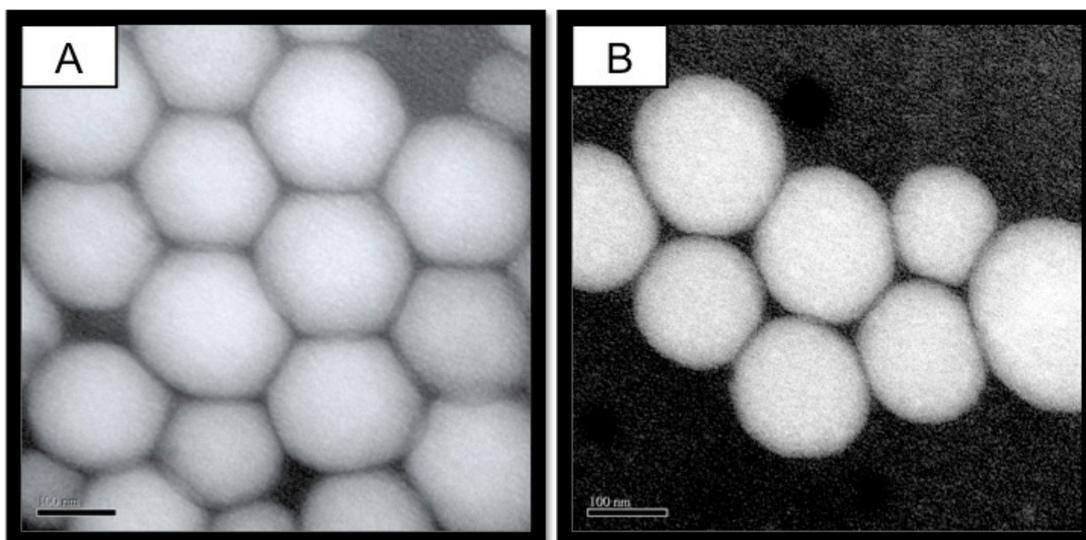


Figura 30. Eletromicrografia de transmissão das nanogotículas de óleo de açaí (esferas em cinza claro) em nanoemulsão (NanoA). (A) População de nanogotículas com baixa polidispersão; (B) Formato esférico de cada nanogotícula. Material fixado e contrastado com ácido fosfotúngstico (PTA) (2%). **Barras de escala:** 100 nm.

6.2.3.4 Capacidade do óleo de açaí associado à nanoemulsão em gerar espécies reativas de oxigênio

A Figura 31 mostra a geração do oxigênio singlete pela NanoA e o tensoativo Tween-80, usado como controle branco. Conforme esperado, o tensoativo, ao não ter

propriedade de geração de oxigênio singlete, permaneceu praticamente inalterado, enquanto que o óleo de açaí contido na nanoemulsão, ao ser fotoirradiado, reagiu com o oxigênio molecular produzindo oxigênio singlete. Assim, o benzofurano reagiu irreversivelmente com o oxigênio singlete produzido, mostrando um declínio na absorbância do benzofurano conforme foi aumentada a fluência de energia.

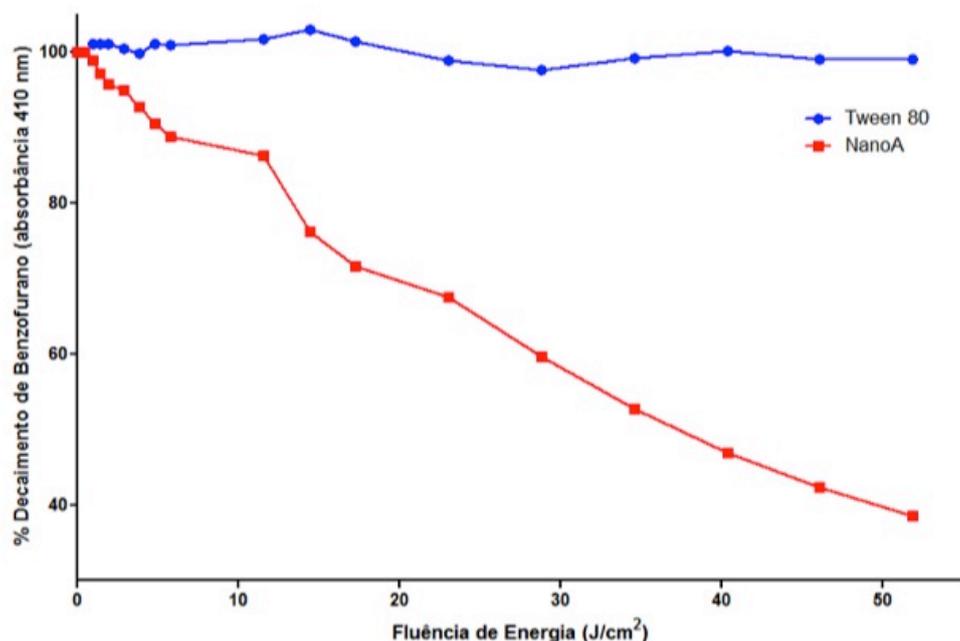


Figura 31. Teste de degradação do benzofurano-¹O₂-dependente para detecção de geração de espécies reativas de oxigênio pelo óleo de açaí associado à NanoA e pelo controle branco, Tween-80, ao serem irradiados por fonte diodo emissor de luz ($\lambda = 660$ nm) em diferentes doses de energia na presença de oxigênio.

6.2.3.5 Determinação da estabilidade coloidal e fotodinâmica da NanoA

A análise das características físico-químicas da NanoA armazenada por 365 dias após preparo, em diversas condições revelou estabilidade somente para as amostras mantidas a 7 °C e à temperatura ambiente, mostrando que o diâmetro hidrodinâmico, o índice de polidispersão (Figura 32) e o potencial zeta não mudaram significativamente. Além disto, foi comprovado que a NanoA ainda possui a capacidade de geração de oxigênio singlete depois de armazenada. Em contrapartida,

os picos de absorvância e fluorescência previamente observados para a amostra fresca não foram mantidos.

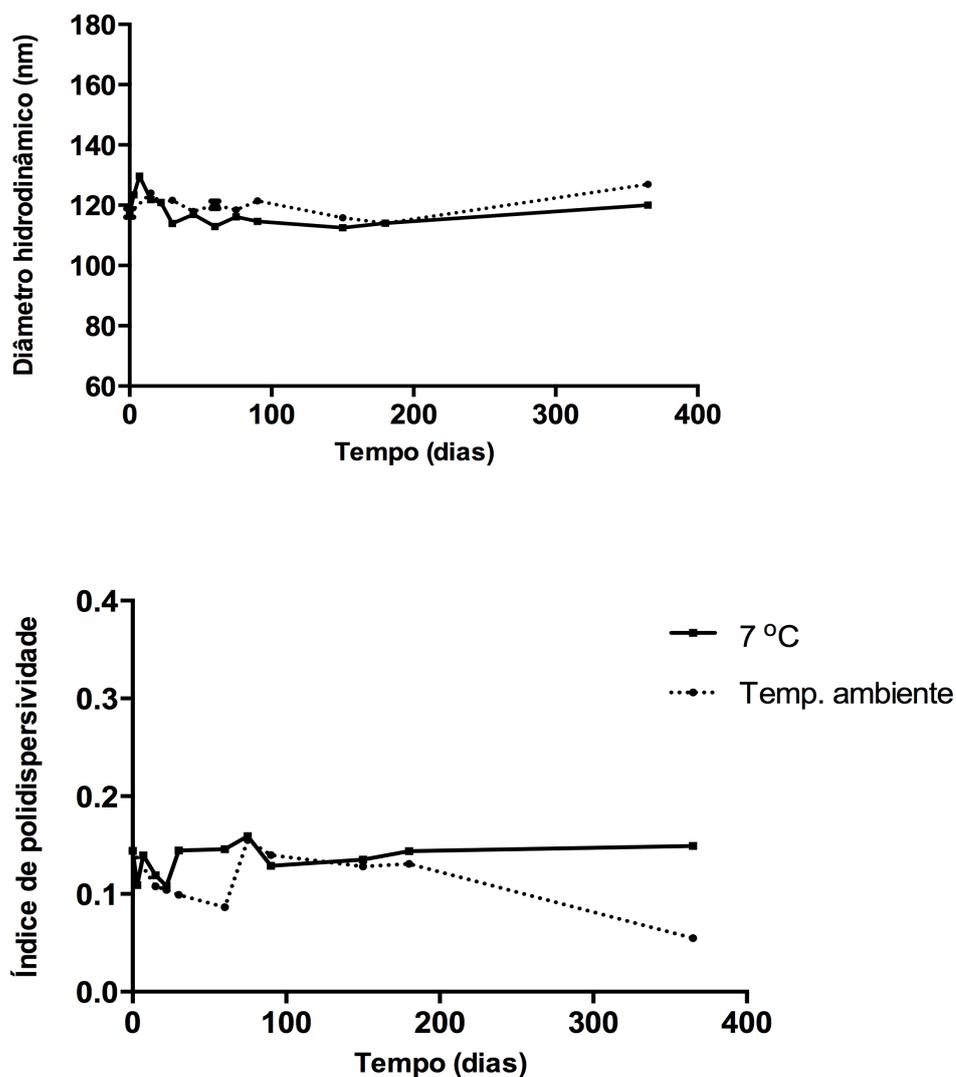


Figura 32. Avaliação da estabilidade do diâmetro hidrodinâmico e do índice de polidispersão de alíquotas de NanoA armazenadas por 0, 3, 7, 15, 22, 30, 45, 60, 90, 180 e 365 dias após preparo e mantidas a 7 °C e à temperatura ambiente.

6.3 EXPERIMENTAÇÃO *IN VITRO*

6.3.1 Citotoxicidade da NanoA nos tempos de exposição de 24 e 48 horas na ausência de irradiação

Nos testes iniciais de citotoxicidade, as linhagens NIH3T3 e B16F10 foram expostas por 24 e 48 horas com diferentes concentrações da NanoA, conforme descrito na metodologia. A Figura 33 mostra os valores calculados para as concentrações citotóxicas (CC) que mantêm uma viabilidade de 90% e 50% (CC10 e CC50), respectivamente.

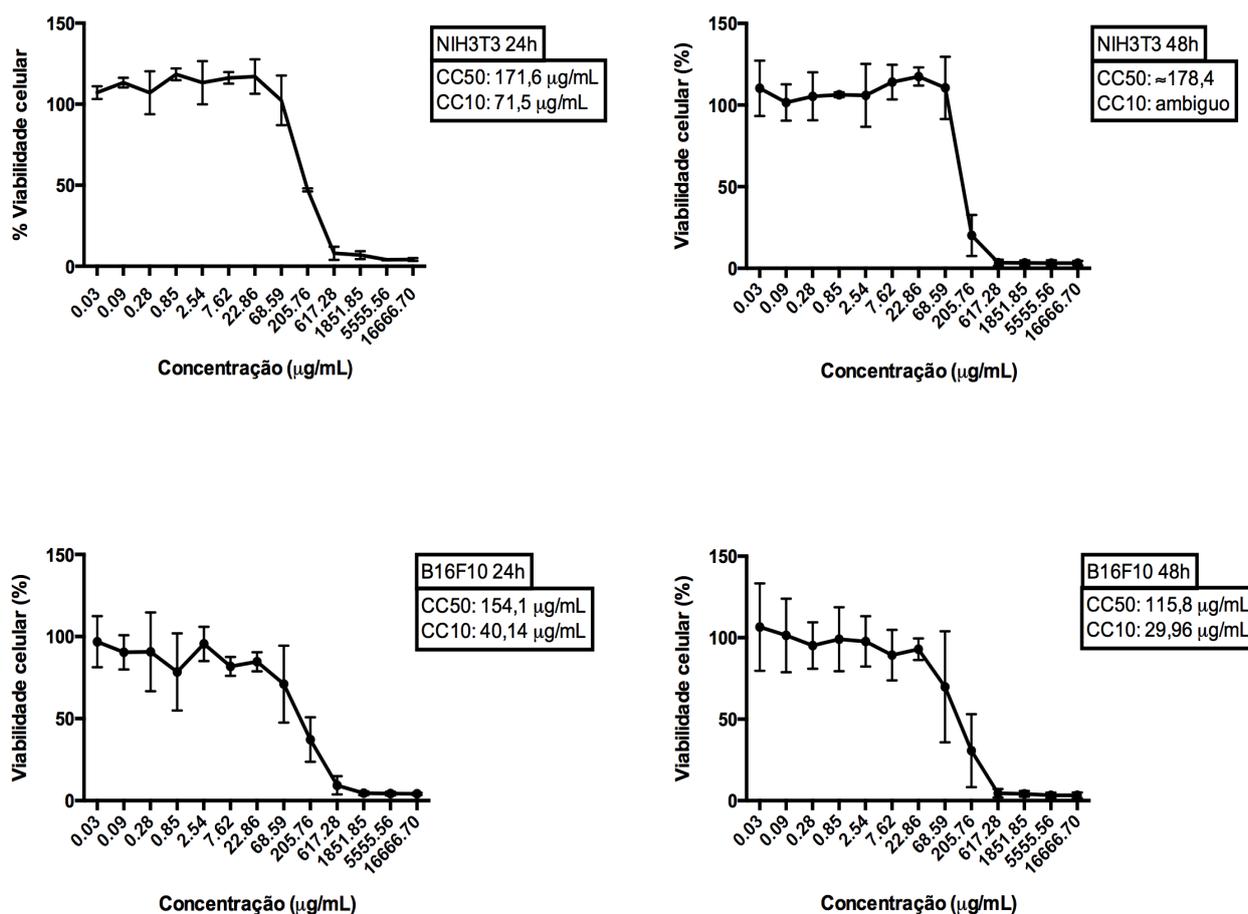


Figura 33. Efeito dose e tempo dependente de diversas concentrações de NanoA na ausência de irradiação em células murinas não tumorais da linhagem NIH/3T3 e células tumorais murinas B16F10 tratadas por 24 e 48 horas. Percentual de viabilidade celular determinado pelo método de MTT (brometo de 3(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil de tetrazólio). Médias calculadas a partir de três experimentos independentes, cada concentração sendo testada em triplicata. Barras indicam desvio padrão.

6.3.2 Citotoxicidade da NanoA na ausência de irradiação no tempo de exposição de 15 minutos

Considerando que o objetivo primordial do experimento de citotoxicidade na ausência de luz é o de selecionar a maior concentração de NanoA que apresenta a menor toxicidade nas células não tumorais, foram calculadas as CC10 e CC50, desta vez referentes à viabilidade celular decorrente do contato das células com a NanoA pelo tempo de 15 minutos (Figura 34).

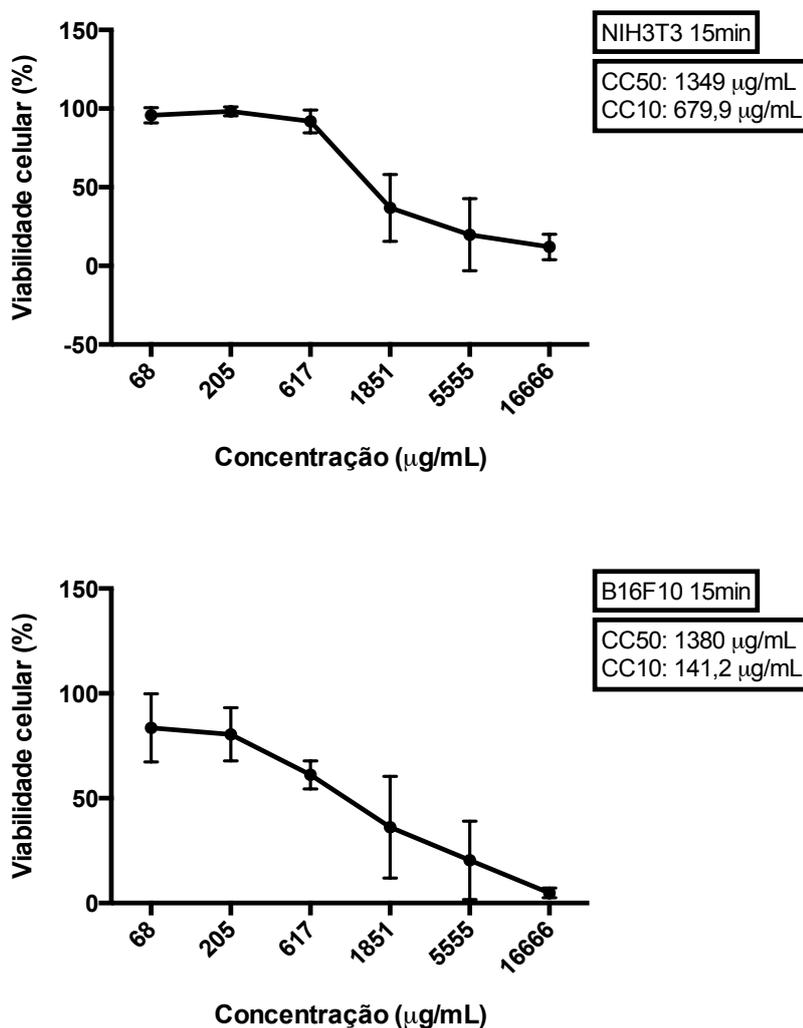


Figura 34. Efeito dose-dependente das concentrações de NanoA variando entre 68,00 e 16.666,00 µg/mL em células murinas não tumorais da linhagem NIH/3T3 e células tumorais murinas B16F10 tratadas por 15 minutos. Percentual de viabilidade celular determinado pelo método de MTT (brometo de 3(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil de tetrazólio). Médias calculadas a partir de três experimentos independentes, cada concentração sendo testada em triplicata. Barras indicam desvio padrão.

Partindo da premissa de que a aplicação de um agente fotossensibilizante para TFD é satisfatória quando este apresenta uma baixa toxicidade no escuro nas células não tumorais, observou-se que para células de NIH/3T3, uma concentração de NanoA de 679,9 $\mu\text{g/mL}$ permite uma viabilidade de 90% (Figura 34). No caso das células de melanoma, uma concentração de somente 141,2 $\mu\text{g/mL}$ foi suficiente para matar 10% das células (Figura 34). Considerando este resultado e as concentrações obtidas por diluição seriada, a concentração mais próxima do valor obtido para a CC10 foi a de 617,00 $\mu\text{g/mL}$, sendo esta concentração a escolhida para ser usada nos próximos testes com Terapia Fotodinâmica.

Os cálculos para a CC50 revelaram que a concentração de NanoA necessária para manter uma viabilidade de 50% tanto para a linhagem celular não tumoral como para a tumoral é semelhante para ambas, com valores de 1349,00 $\mu\text{g/mL}$ e 1380,00 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente (Figura 34).

6.3.3 Efeito da Terapia Fotodinâmica *in vitro*

A avaliação do efeito citotóxico causado pelo tratamento com Terapia Fotodinâmica das células NIH/3T3 demonstrou que a concentração de NanoA [617,00 $\mu\text{g/mL}$] irradiada com as fluências de 12,9 J/cm^2 ; 25,9 J/cm^2 e 51,8 J/cm^2 , apresentou valores de viabilidade celular de 74,3%, 70% e 72,4%, respectivamente. No caso das células tratadas somente com a NanoA [617,00 $\mu\text{g/mL}$], foi observada uma viabilidade celular de 81,7%. As células tratadas somente com LED mostraram valores de viabilidade de 90,5%; 83,1% e 84,7%, em relação às fluências de 12,9 J/cm^2 ; 25,9 J/cm^2 e 51,8 J/cm^2 , respectivamente (Figura 35). Estes resultados indicaram que a exposição das células NIH/3T3 à NanoA, assim como com o uso isolado do LED nas três fluências testadas, e com a TFD não afetaram a viabilidade destas células, portanto, os diversos tratamentos aplicados não apresentaram diferenças significativas.

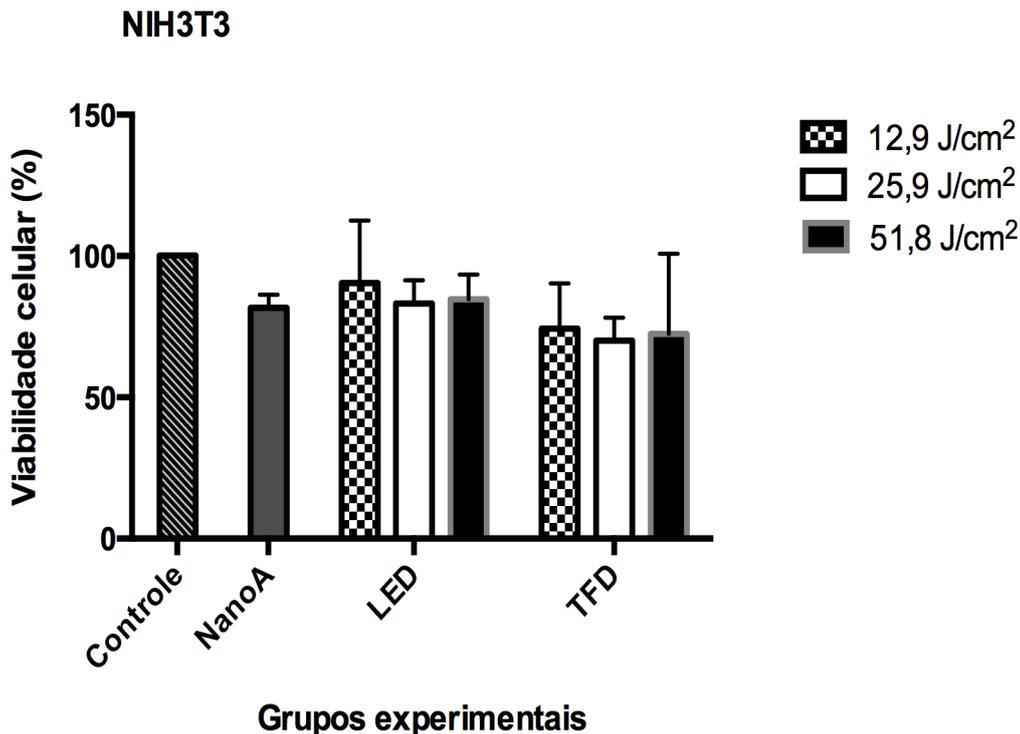


Figura 35. Efeito da Terapia Fotodinâmica em células murinas não tumorais da linhagem NIH/3T3 tratadas com NanoA [617 µg/mL] por 15 minutos e em seguida irradiadas com diferentes fluências. Percentual de viabilidade celular determinado pelo método de MTT (brometo de 3(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil de tetrazólio). TFD: terapia fotodinâmica; LED: diodo emissor de luz; NanoA: nanoemulsão contendo gotículas de óleo de açaí como fotossensibilizante. Valores representados pelas médias e desvio padrão. ($p > 0,05$; ANOVA/Tukey-Kramer).

No caso dos experimentos com as células tumorais B16F10, a Figura 36 mostra que as células controle apresentaram diferenças significativas em relação a todos os demais grupos experimentais, exceto em relação ao grupo submetido ao LED na fluência de 51,8 J/cm². Células tratadas somente com NanoA [617,00 µg/mL] apresentaram diferenças significativas ($p < 0,001$) somente quando comparadas com os tratamentos de TFD 25,9 J/cm² e TFD 51,8 J/cm². O tratamento exclusivo com NanoA mostrou resultados de viabilidade de 66,3%, valor semelhante ao obtido quando as células foram irradiadas apenas com o LED 12,9 J/cm² (66,4%). Quando as células foram irradiadas com LED nas fluências de 25,9 J/cm² e 51,8 J/cm², a porcentagem de viabilidade chegou em 69,7% e 78,8%, respectivamente. Os

resultados das três fluências de LED testadas mostraram diferenças significantes ($p < 0,001$) quando comparados tanto com a TFD 25,9 J/cm² e com TFD 51,8 J/cm². Quando o tratamento fotodinâmico foi aplicado, houve intensa redução da viabilidade celular, especialmente para as fluências de 25,9 J/cm² e 51,8 J/cm², apresentando valores de viabilidade de 15,29% e 14,31%, respectivamente, com significância em relação ao grupo controle ($p < 0,001$). Houve também diferença significativa ($p < 0,01$) quando comparados o tratamento TFD 12,9 J/cm² com o tratamento TFD 25,9 J/cm² e com TFD 51,8 J/cm².

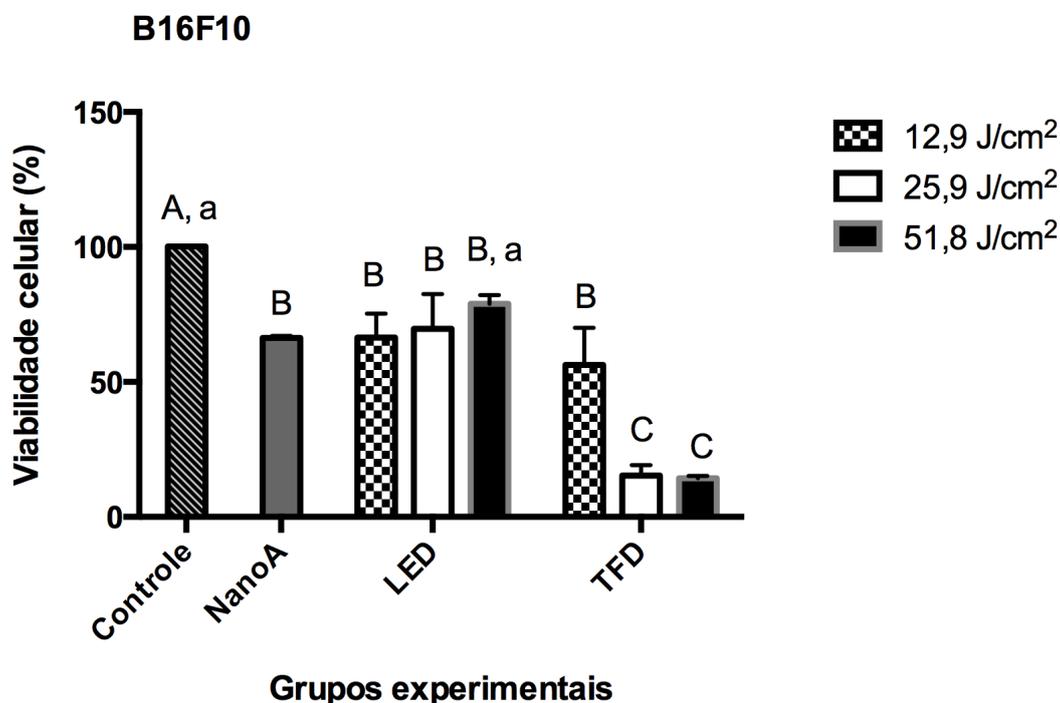


Figura 36. Efeito da Terapia Fotodinâmica em células murinas tumorais da linhagem B16F10 tratadas com NanoA [617 µg/mL] por 15 minutos e irradiadas com diferentes fluências. Percentual de viabilidade celular determinado pelo método de MTT (brometo de 3(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil de tetrazólio). TFD: terapia fotodinâmica; LED: diodo emissor de luz; NanoA: nanoemulsão contendo gotículas de óleo de açaí como fotossensibilizante. Valores representados pelas médias e desvio padrão. Diferenças significantes entre tratamentos indicadas com letras e tamanhos de letra diferentes. ANOVA/Tukey-Kramer com nível de significância considerado $p < 0,05$.

6.3.4 Análise da morfologia celular por microscopia de contraste de fase após tratamento com Terapia Fotodinâmica

A Figura 37 ilustra a morfologia das linhagens NIH/3T3 e B16F10 antes e após tratamento com TFD. Após tratamento, mais acentuadamente no caso das células tumorais, obteve-se notável redução no volume e projeções citoplasmáticas, densidade celular reduzida, perda de adesão celular e presença de debris, todas características típicas de morte celular. Esta análise sustenta os resultados de MTT onde foi observada uma maior redução na viabilidade de células tumorais em comparação com resultados para as células não tumorais.

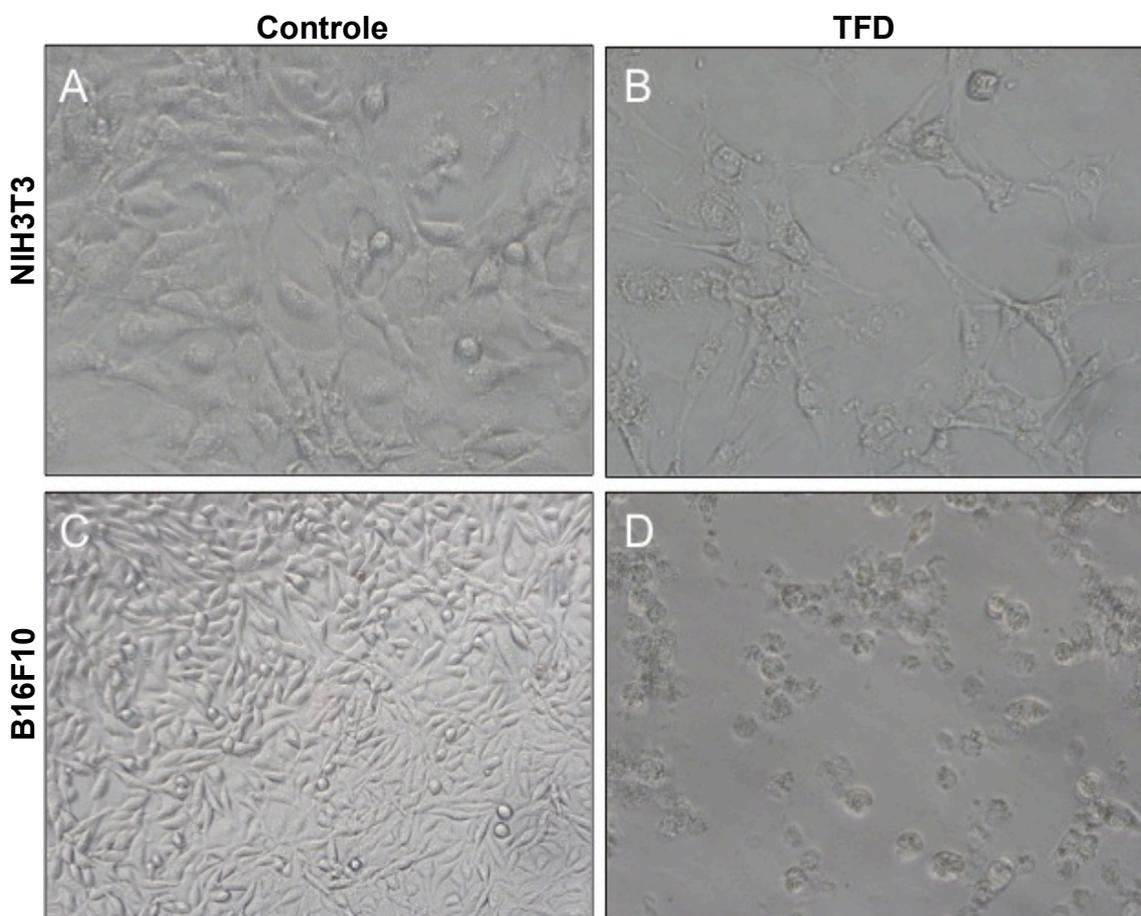


Figura 37. Análise morfológica por microscopia de contraste de fase de células normais e tumorais após tratamento com Terapia Fotodinâmica. **(A e B)** NIH3T3 e **(C e D)** B16F10. **(A)** e **(C)** Células controle não submetidas a nenhum tipo de tratamento, mostrando alta densidade celular e morfologia normal característica. **(B)** e **(D)** Células tratadas com Terapia Fotodinâmica (TFD), mostrando alto índice de morte celular, especialmente nas células B16F10.

6.3.5 Análise da morfologia celular mediante citometria de fluxo

Com a intenção de corroborar os resultados obtidos para a análise da morfologia por microscopia de contraste de fase, as análises por citometria de fluxo de tamanho (FSC) e granulosidade celular (SSC) também foram realizadas. Conforme pode ser visualizado na Figura 38 para a linhagem NIH/3T3, somente o tratamento com meio sem soro fetal bovino (Controle positivo) causou mudanças consideráveis no tamanho e granulosidade das células.

A análise para a linhagem celular B16F10 mostrou que a morfologia para as células tratadas com NanoA e LED teve poucas mudanças, mantendo a maioria da população dentro da região que continha o maior número de eventos (R1) (Figura 39). Em contrapartida, as células tratadas com peróxido de hidrogênio (Controle positivo) e TFD mostraram um deslocamento da população celular com redução significativa no volume celular. Tais achados corroboram a análise morfológica realizada por microscopia de contraste de fase e confirmaram, juntamente com os resultados apresentados para a viabilidade por MTT, a efetividade da TFD na morte celular das células de melanoma murino.

6.3.5 Análise da morfologia celular mediante citometria de fluxo

Com a intenção de corroborar os resultados obtidos para a análise da morfologia por microscopia de contraste de fase, as análises por citometria de fluxo de tamanho (FSC) e granulosidade celular (SSC) também foram realizadas. Conforme pode ser visualizado na Figura 38 para a linhagem NIH/3T3, somente o tratamento com meio sem soro fetal bovino (Controle positivo) causou mudanças consideráveis no tamanho e granulosidade das células.

A análise para a linhagem celular B16F10 mostrou que a morfologia para as células tratadas com NanoA e LED teve poucas mudanças, mantendo a maioria da população dentro da região que continha o maior número de eventos (R1) (Figura 39). Em contrapartida, as células tratadas com peróxido de hidrogênio (Controle positivo) e TFD mostraram um deslocamento da população celular com redução significativa no volume celular. Tais achados corroboram a análise morfológica realizada por microscopia de contraste de fase e confirmaram, juntamente com os resultados apresentados para a viabilidade por MTT, a efetividade da TFD na morte celular das células de melanoma murino.

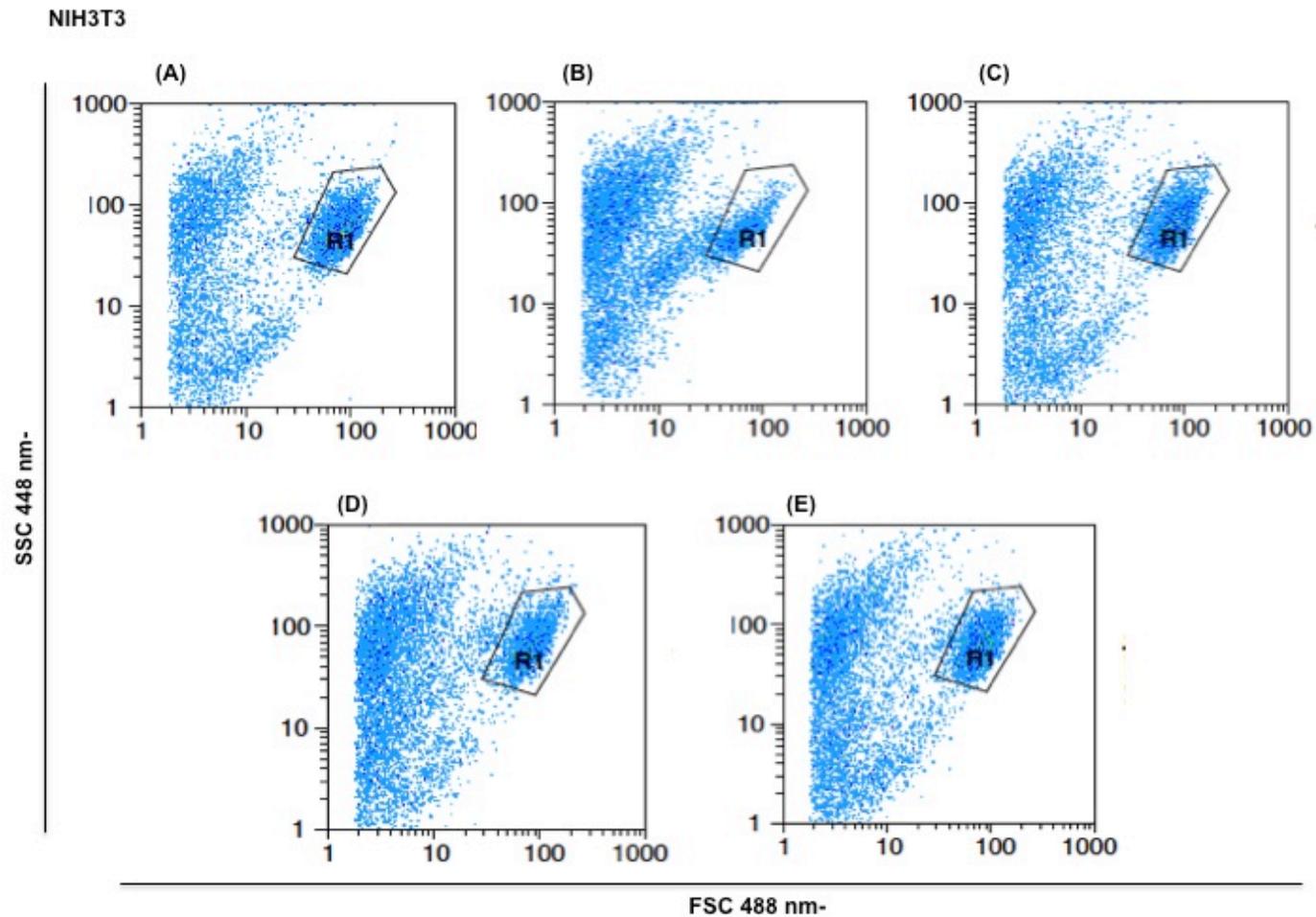


Figura 38. Avaliação por citometria de fluxo do tamanho e granulosidade (FSC e SSC) de células NIH/3T3. (A) controle; e após diferentes tratamentos: (B) tratadas com meio de cultivo sem soro fetal bovino (Controle positivo); (C) tratadas com NanoA [617 µg/mL]; (D) Irradiadas com LED; e (E) TFD. Três experimentos independentes.

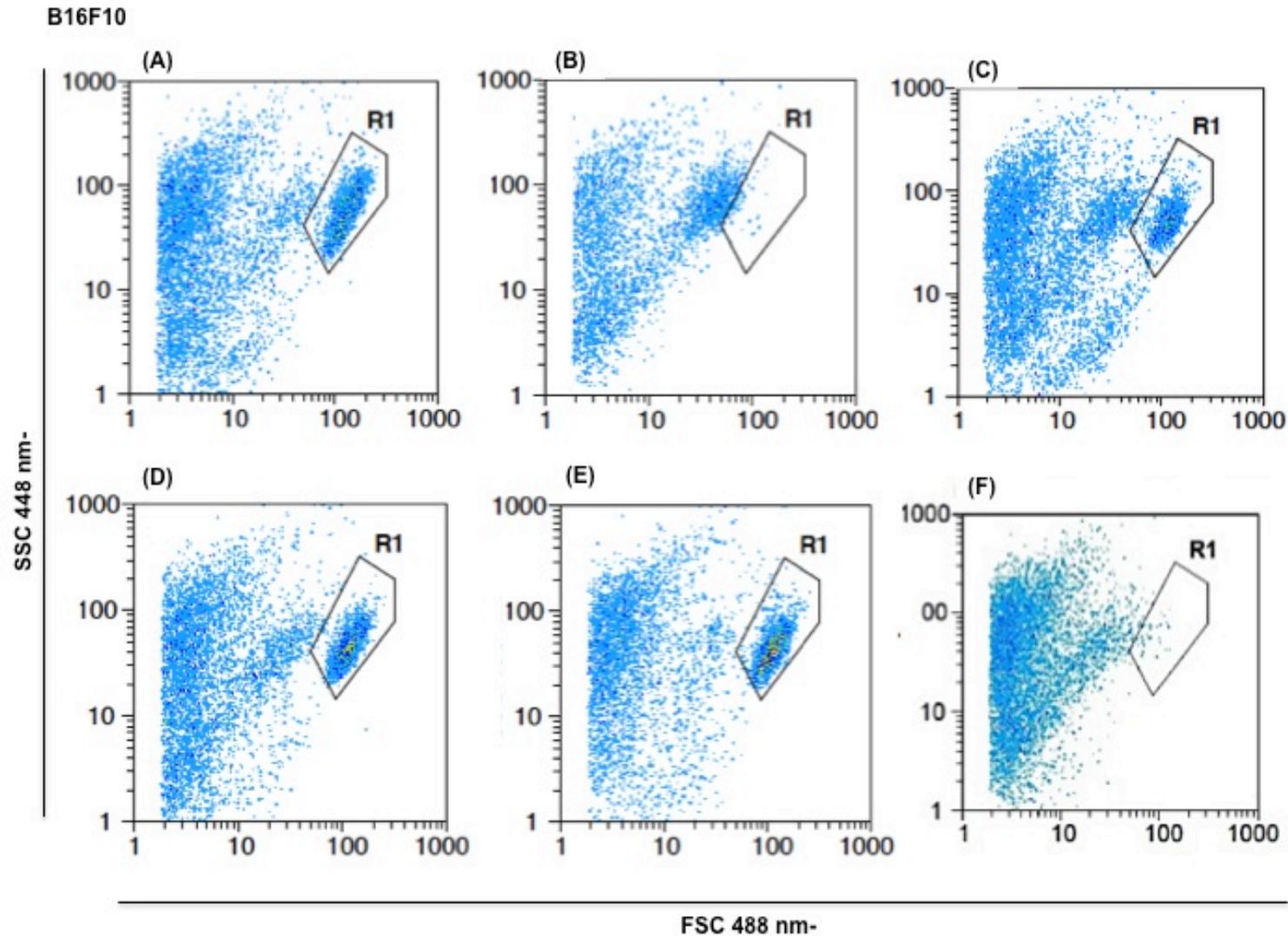


Figura 39. Avaliação por citometria de fluxo do tamanho e granulosidade (FSC e SSC) de células B16F10. (A) controle, e após diferentes tratamentos: (B) tratadas com peróxido de hidrogênio [1 mM] (Controle positivo); (C) tratadas com fluoruracila [4 mg/mL] (Controle positivo); (D) expostas à NanoA [617 µg/mL]; (E) irradiadas com LED e (F) TFD. Três experimentos independentes.

6.3.6 Análise por citometria de fluxo do tipo de morte celular em células tratadas com Terapia Fotodinâmica

Conforme pode ser observado na Figura 40 para a linhagem NIH/3T3, as células tratadas com NanoA, LED e TFD mostraram valores de viabilidade celular bastante semelhantes aos apresentados pelas células do grupo controle, com aproximadamente 95% de células vivas. De forma semelhante, ao analisar as células não viáveis, independentemente do tratamento usado, a maioria dos grupos mostraram células marcadas positivamente com Iodeto de Propídeo, característica de morte celular por necrose, como observado também nas células controle. Conforme esperado, o tratamento com meio de cultivo sem soro (Controle positivo) foi o que apresentou maior porcentagem de morte celular, ocorrendo também por necrose.

A Figura 41 mostra resultados para a linhagem B16F10. Conforme esperado, as células tratadas com peróxido de hidrogênio e fluoruracila (Controles positivos) apresentaram as maiores porcentagens de morte celular. Dentre os tratamentos aplicados, as células tratadas com NanoA apresentaram as menores porcentagens de morte celular (0,76%). Já no caso do tratamento com TFD, as células tiveram uma diminuição de 12,81% na sua viabilidade. Em contrapartida, o tratamento das células com LED mostrou um aumento de 4,32% na viabilidade celular. Em relação ao tipo de morte celular, com exceção das células tratadas com LED, tanto os Controles positivos como as células tratadas com TFD e NanoA mostraram que ao analisar as células não viáveis, a maior parte destas foram duplamente marcadas com (anexina V / IP), indicando morte celular por apoptose tardia/necrose. Todos os dados foram confrontados em relação aos valores obtidos para as células controle.

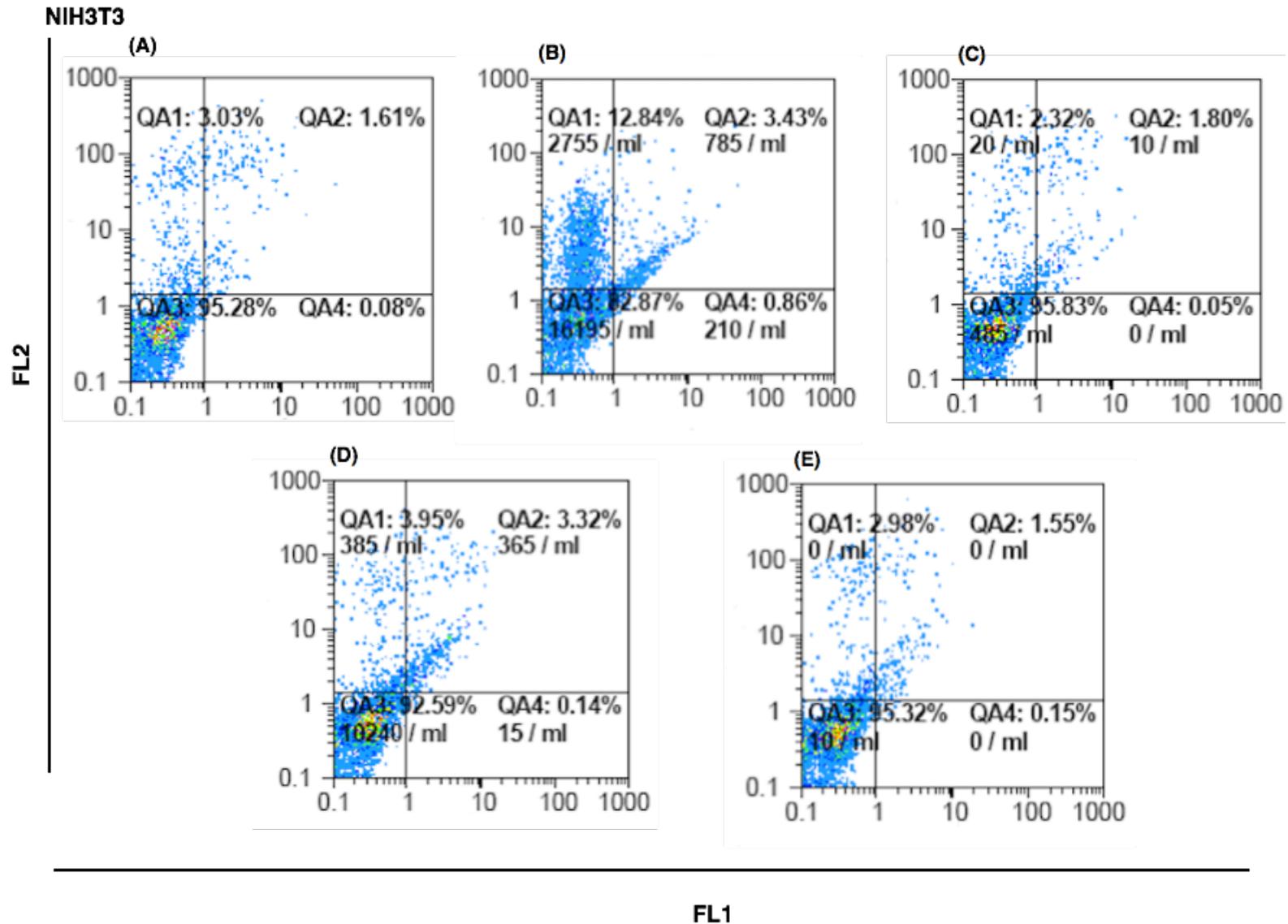


Figura 40. Avaliação da morte celular por citometria de fluxo de células NIH/3T3, após incubação com diferentes amostras. Células foram marcadas com Iodeto de propídeo (FL2) e Anexina V (FL1). **(A)** Controle; **(B)** tratadas com meio de cultivo sem soro fetal bovino (Controle positivo); **(C)** expostas à NanoA; **(D)** irradiadas com LED; **(E)** tratadas com Terapia Fotodinâmica. Três experimentos independentes. (Q3) Células Viáveis; (Q1) + Iodeto; (Q2) + Iodeto e + Anexina V; e (Q4) + Anexina V.

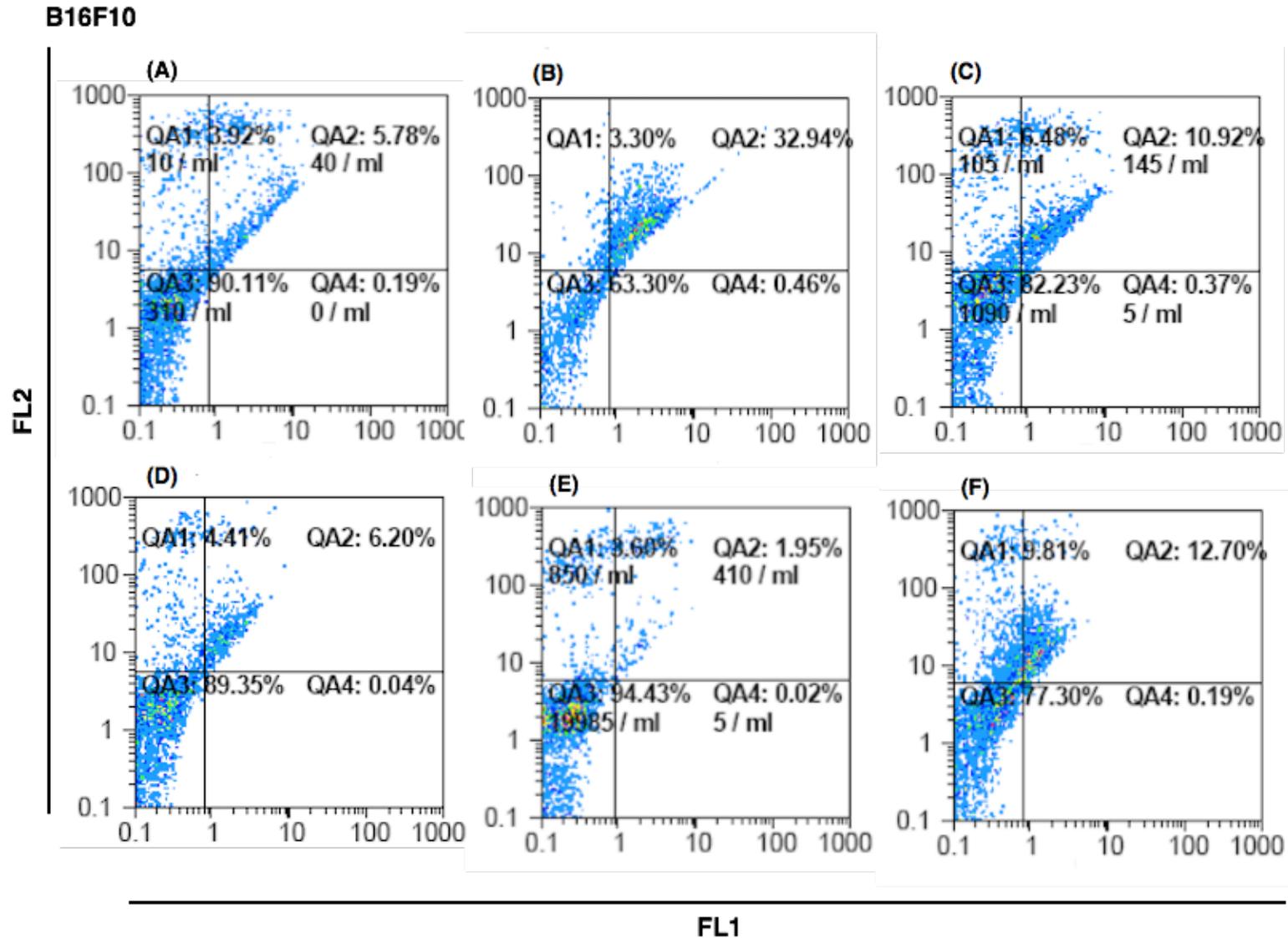


Figura 41. Avaliação da morte celular por citometria de fluxo de células B16F10, após incubação com diferentes amostras. Células marcadas com iodeto de propídeo (FL2) e Anexina V (FL1). **(A)** Controle; **(B)** tratadas com peróxido de hidrogênio; **(C)** tratadas com fluoruracila; **(D)** expostas à NanoA; **(E)** irradiadas com LED; **(F)** tratadas com Terapia Fotodinâmica. Três experimentos independentes. (Q3) Células Viáveis; (Q1) + Iodeto; (Q2) + Iodeto e + Anexina V; e (Q4) + Anexina V.

6.4 EXPERIMENTOS *IN VIVO*

6.4.1 Experimentos piloto para determinação de protocolo de aplicação da Terapia Fotodinâmica

Considerando a importância inicial de definir todos os parâmetros necessários para realizar uma TFD *in vivo* mais eficaz, foram realizados experimentos com o intuito de determinar a concentração de NanoA a ser utilizada, o tempo da acumulação da NanoA no tecido tumoral e o tempo de irradiação.

Assim, na Etapa I, a análise histológica do tecido tumoral indicou que a concentração de NanoA que causa menos áreas de necrose por área tumoral foi a concentração de 25 mg/mL. A seguir, na Etapa II, as lâminas marcadas com DAPI foram observadas em microscópio de fluorescência, revelando que o tempo que permite maior acúmulo da NanoA no tecido tumoral é correspondente a 30 minutos. Conforme pode ser verificado na Figura 42, o acúmulo de NanoA no tecido tumoral é discreto em comparação com os grandes agregados alaranjados/amarelados observados na derme, muitos destes retidos no tecido conjuntivo. Vale a pena ressaltar que não foi possível observar nenhum aglomerado nas lâminas preparadas para os tempos de 45 e 60 minutos.

Finalmente, na última etapa prévia ao experimento piloto com TFD, ao testar três fluências diferentes com a intenção de escolher aquela capaz de causar maiores áreas de necrose em relação à área tumoral, foi determinado o uso da fluência de 25,9 J/cm².

Desta forma, procedeu-se ao experimento piloto com TFD com resultados descritos a continuação.

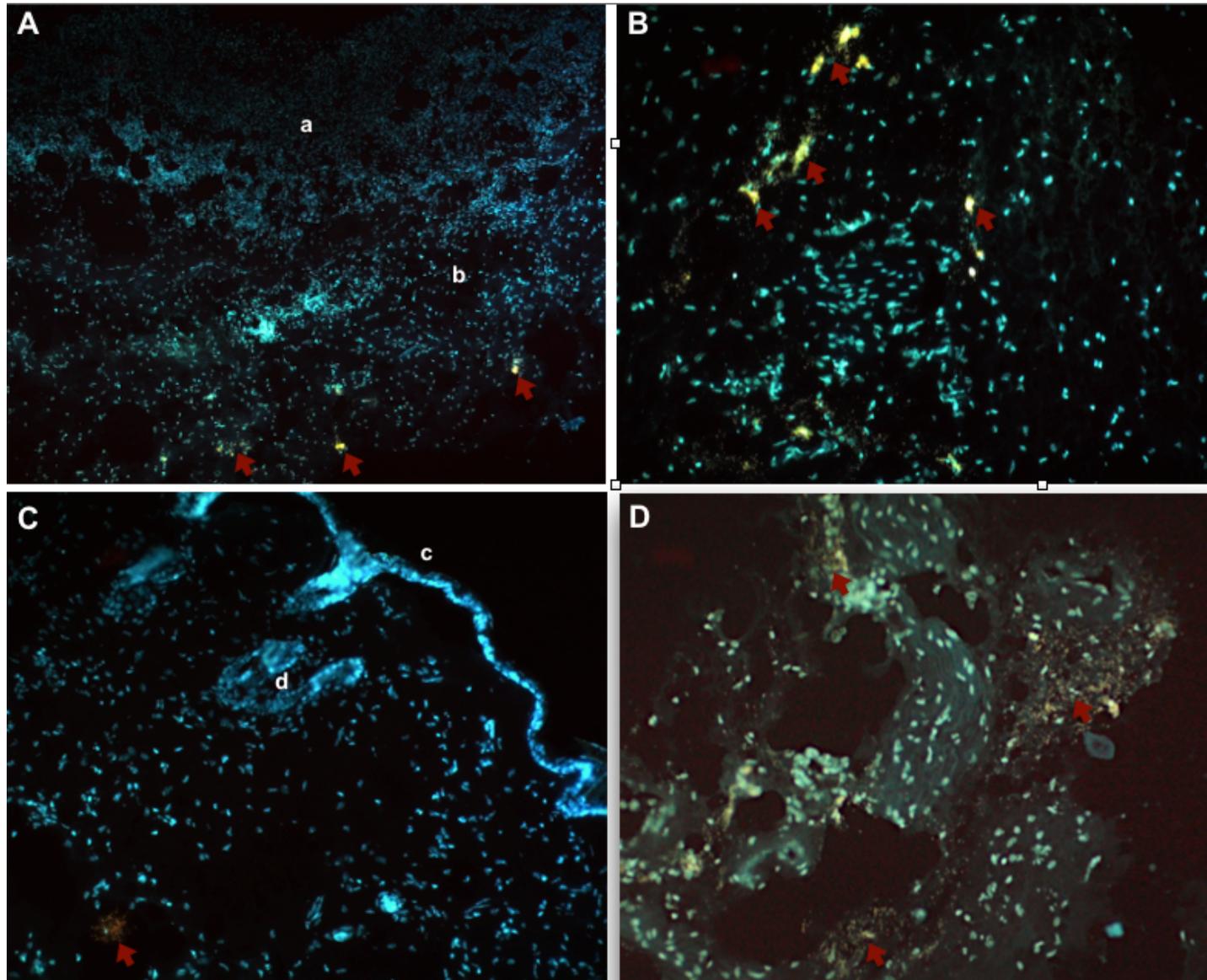


Figura 42. Análise por microscopia de fluorescência da presença de aglomerados de gotículas de óleo de açaí na pele de camundongos, 30 minutos após administração intratumoral. Aglomerados (alaranjados/amarelados) maiores indicados por setas vermelhas. Núcleos celulares marcados com DAPI. (A) Visão panorâmica, mostrando o tecido tumoral (a) e a derme (b) onde há maior acúmulo de gotículas. (B) e (C) Aglomerados na derme. Em (c), epiderme e (d) folículo piloso. (D) Aglomerados concentrados no tecido conjuntivo da derme.

Dentre os parâmetros considerados para a análise clínica dos animais, o peso corpóreo foi observado durante todo o período experimental, mostrando que não houve diferenças significativas entre os grupos experimentais (Figura 43).

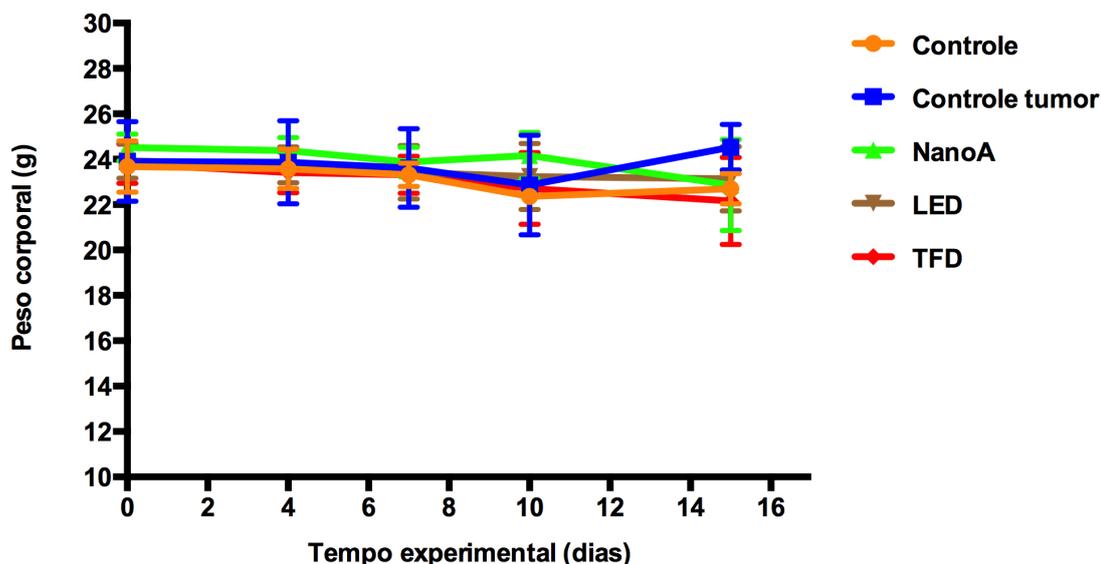


Figura 43. Evolução do peso corporal em função do tempo em camundongos C57BL/6 controle sem tumor (Controle negativo) e portadores de tumor (Controle tumor) submetidos a tratamento com tampão fosfato salino (PBS), NanoA [617 $\mu\text{g}/\text{mL}$], fonte diodo emissor de luz (LED) e Terapia Fotodinâmica (TFD) [NanoA: 617 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e LED: 25,9 J/cm^2]. Valores representados pelas médias e desvio padrão. ($p > 0,05$; ANOVA).

De forma geral, os resultados de volume tumoral *in vivo* mostraram que todos os animais que tiveram transplantação de células tumorais no T0, apresentaram volume tumoral crescente ao longo do período experimental. No dia da eutanásia, conforme esperado, os animais tratados somente com PBS (Controle tumor) apresentaram os maiores volumes, seguidos pelos grupos LED, NanoA e TFD (Figura 44), entretanto, diferenças significativas não foram observadas entre os grupos experimentais ($p > 0,05$; ANOVA).

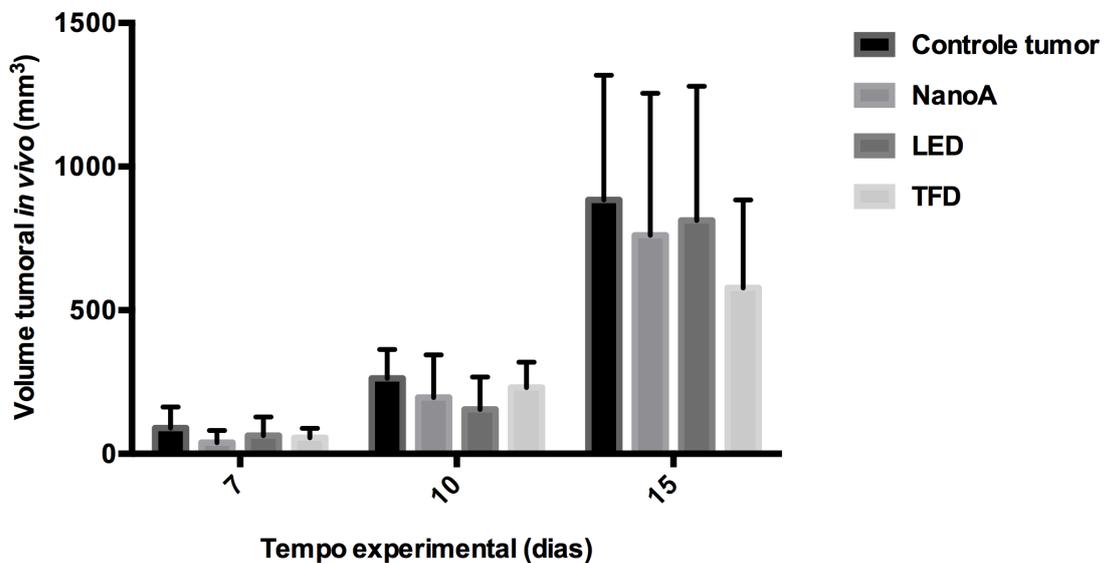


Figura 44. Variação do volume tumoral *in vivo* em camundongos C57BL/6 com melanoma em função do tratamento com Terapia Fotodinâmica (TFD) [NanoA: 617 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e LED: 25,9 J/cm^2]. Animais com tumor foram também tratados com tampão fosfato salino (PBS) (Controle com tumor), NanoA [617 $\mu\text{g}/\text{mL}$] e irradiação exclusiva com fonte diodo emissor de luz (LED) com fluência de 25,9 J/cm^2 . Valores representados pelas médias e desvio padrão. ($p > 0,05$; ANOVA).

Dados referentes ao volume tumoral *ex vivo* (Figura 45) mostraram que o maior volume tumoral foi encontrado nos animais tratados somente com PBS (Controle com tumor), seguido pelos tratados com LED, NanoA e finalmente o grupo tratado com TFD. Não foram observadas diferenças significativas entre tratamentos ($p > 0,05$; ANOVA).

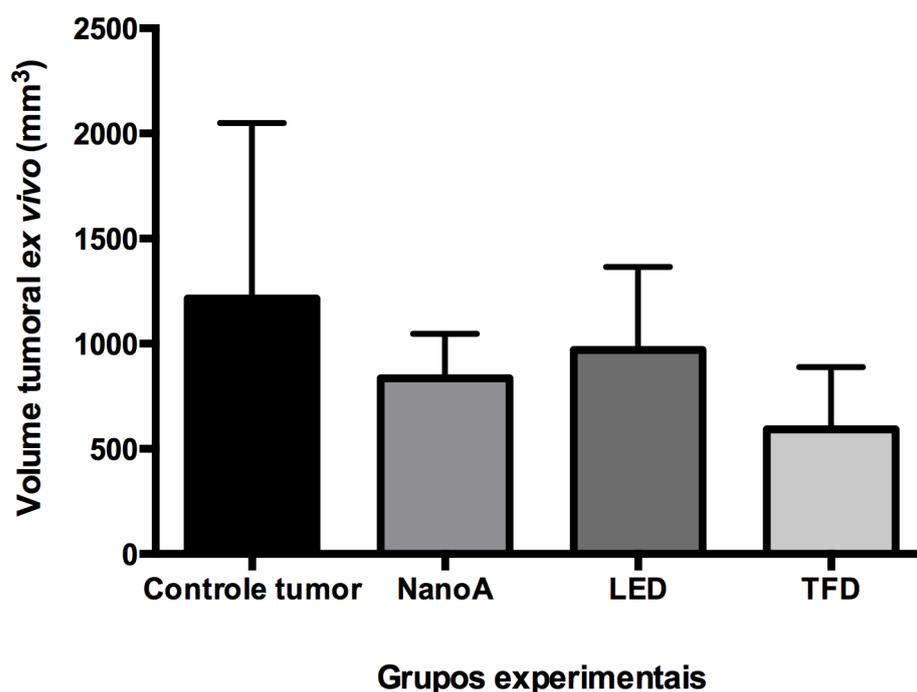


Figura 45. Variação do volume tumoral *ex vivo* em camundongos C57BL/6 com melanoma em função dos tratamentos aplicados segundo o grupo experimental: Controle tumor (tratado com tampão fosfato salino-PBS); NanoA (tratado com nanoemulsão contendo gotículas de óleo de açaí) [617 µg/mL]; LED (tratado com irradiação isolada com LED (fonte diodo emissor de luz) na fluência de 25,9 J/cm²) e TFD (Terapia Fotodinâmica) (tratado com [NanoA: 617 µg/mL e LED: 25,9 J/cm²]). Valores representados pelas médias com desvio padrão. $p > 0,05$ [ANOVA].

Com a intenção de avaliar alterações nos órgãos não alvo (fígado, baço, rim e pulmão) entre os diferentes grupos experimentais, os órgãos foram analisados em relação à ocorrência de alterações macroscópicas, sendo observado um caso de esplenomegalia tanto no grupo Controle tumor, como no tratado com NanoA e o grupo TFD. Além disto, foi observado nos grupos NanoA e TFD um caso de regiões escuras no baço para cada grupo. Adicionalmente, o peso do baço, fígado e rim foi coletado. Na Tabela 10 foram representados os pesos absoluto e relativo do fígado, baço, rim esquerdo e rim direito, os quais não apresentaram diferenças significativas

entre os grupos experimentais ($p > 0,05$). Os tratamentos aplicados não causaram mudanças significativas nos órgãos analisados quando comparados com os dados do controle negativo.

Tabela 10. Peso absoluto e relativo dos órgãos analisados para os animais do grupo controle e animais com tumor submetidos a diversos tratamentos praticados em experimento piloto *in vivo*.

| | Controle | Controle tumor | NanoA | LED | TFD |
|--------------------------|---------------|----------------|---------------|---------------|---------------|
| Peso absoluto (g) | | | | | |
| Fígado | 1,067 ± 0,061 | 1,314 ± 0,048 | 1,071 ± 0,219 | 1,141 ± 0,119 | 1,115 ± 0,093 |
| Baço | 0,072 ± 0,009 | 0,249 ± 0,222 | 0,139 ± 0,042 | 0,163 ± 0,101 | 0,224 ± 0,128 |
| Rim direito | 0,127 ± 0,008 | 0,1445 ± 0,006 | 0,131 ± 0,008 | 0,138 ± 0,016 | 0,131 ± 0,011 |
| Rim esquerdo | 0,121 ± 0,012 | 0,146 ± 0,016 | 0,126 ± 0,009 | 0,125 ± 0,009 | 0,129 ± 0,009 |
| Peso relativo (%) | | | | | |
| Fígado | 4,697 ± 0,234 | 5,355 ± 0,026 | 4,644 ± 0,621 | 4,923 ± 0,283 | 5,032 ± 0,206 |
| Baço | 0,317 ± 0,038 | 0,991 ± 0,856 | 0,622 ± 0,212 | 0,712 ± 0,456 | 1,040 ± 0,648 |
| Rim direito | 0,560 ± 0,036 | 0,590 ± 0,011 | 0,575 ± 0,016 | 0,597 ± 0,059 | 0,592 ± 0,052 |
| Rim esquerdo | 0,533 ± 0,056 | 0,595 ± 0,046 | 0,552 ± 0,009 | 0,539 ± 0,030 | 0,585 ± 0,024 |

Dados representados p
dia experimental de fig
tratados com tampão f
emissor (LED) e Terap
ANOVA).

6.4.2 Terapia Fotodinâmica para o tratamento de melanoma

6.4.2.1 Análise clínica

6.4.2.1.1 Peso corporal

Dentre os dados obtidos para avaliar o estado clínico dos animais, assim como possível toxicidade ocasionada pelos tratamentos, o peso corpóreo foi observado durante todo o período experimental (Figura 46), mostrando diferenças significativas no tempo experimental 4 dias (T4) entre o grupo Controle com tumor e

o tratado com LED ($p < 0,05$); e no tempo experimental 10 dias (T10) entre o grupo Controle e todos os demais grupos experimentais ($p < 0,01$).

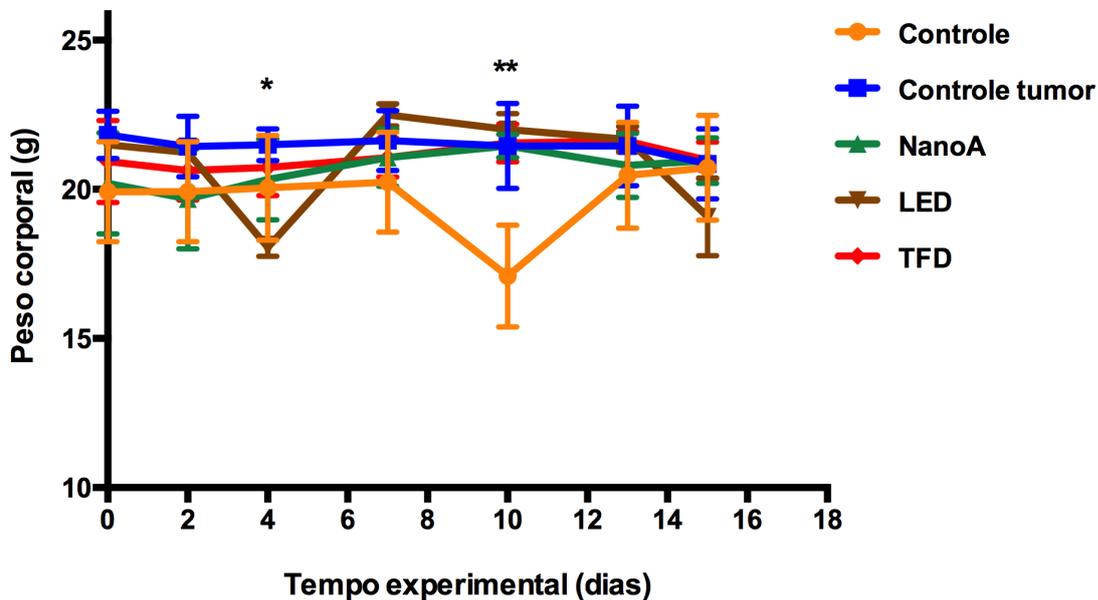


Figura 46. Evolução do peso corporal em função do tempo em camundongos C57BL/6 controle e com tumor após diversos tratamentos. Valores representados pelas médias e desvio padrão. Diferenças significativas: (*) Controle com tumor \neq LED, $p < 0,05$; ** Controle \neq (Controle com tumor, NanoA, LED, TFD), $p < 0,01$; (ANOVA/ Tukey Kramer).

6.4.2.1.2 Volume tumoral

Os resultados de volume tumoral *in vivo* indicaram que todos os animais com melanoma apresentaram volume tumoral crescente ao longo do período experimental. Ao acompanhar o volume tumoral dos animais do T0 até T15, foi observada diferença significativa nos tempos experimentais 4, 7, 10 e 15 dias, entre o grupo Controle tumor e os demais grupos experimentais, sendo NanoA, LED e TFD. Já no tempo experimental T13, houve diferenças somente entre o grupo Controle tumor e LED. No T15, dia da eutanásia, conforme esperado, os animais tratados somente com

PBS (Controle tumor) apresentaram os maiores volumes tumorais, seguidos pelos grupos LED, NanoA e TFD (Figura 47).

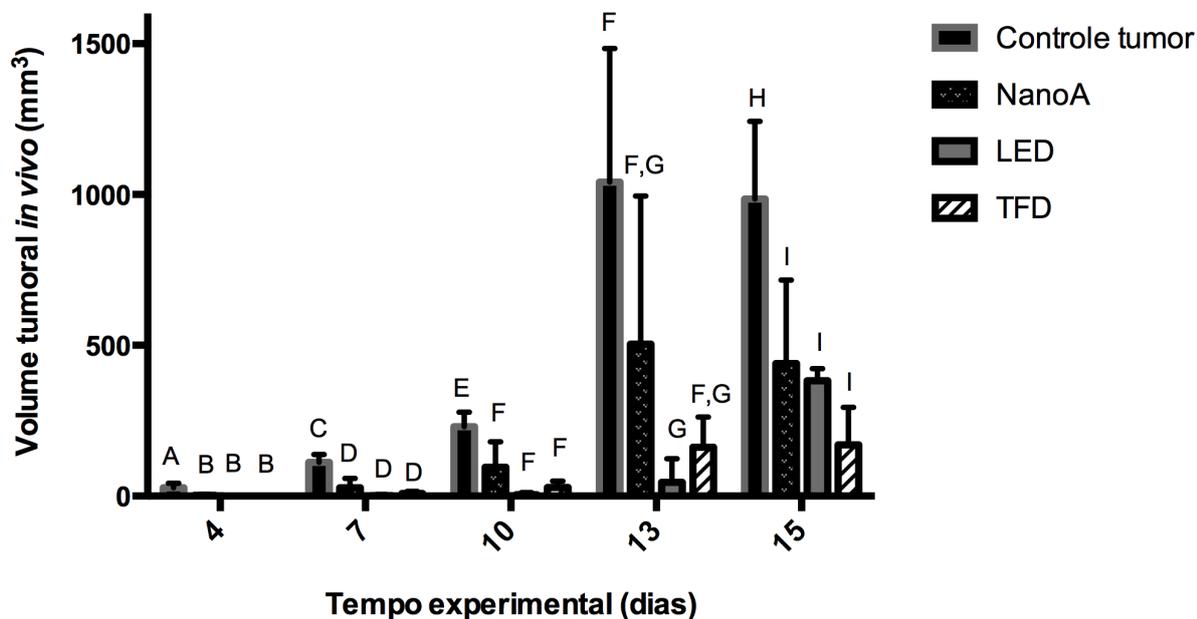


Figura 47. Variação do volume tumoral *in vivo* em camundongos C57BL/6 com melanoma em função de diversos tratamentos. Animais com tumor foram tratados com tampão fosfato salino (PBS) (Controle tumor), NanoA [617 $\mu\text{g}/\text{mL}$] e irradiação isolada com LED na fluência de 25,9 J/cm^2 e com Terapia Fotodinâmica (TFD) [NanoA: 617 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e fluência de 25,9 J/cm^2] mediada pelo óleo de açaí em nanoemulsão. Valores representados pelas médias e desvio padrão. Letras diferentes representam diferenças estatísticas para: Tempo experimental T4: Controle tumor \neq NanoA ($p < 0,05$), LED ($p < 0,01$) e TFD ($p < 0,01$). Tempo experimental T7: Controle tumor \neq NanoA ($p < 0,01$), LED ($p < 0,001$) e TFD ($p < 0,01$). Tempo experimental T10: Controle tumor \neq NanoA ($p < 0,05$), LED ($p < 0,01$) e TFD ($p < 0,01$). Tempo experimental T13: Controle tumor \neq LED ($p < 0,05$). Tempo experimental T15: Controle tumor \neq NanoA ($p < 0,05$), LED ($p < 0,05$), e TFD ($p < 0,01$). [ANOVA].

A Figura 48 ilustra resultados para o volume tumoral *ex vivo*, apontando que o maior volume tumoral foi encontrado nos animais tratados somente com PBS (Controle tumor) e com NanoA, seguido pelos tratados com LED e o grupo TFD

mostrando volumes bastante semelhantes. Foram observadas diferenças significativas entre o Controle tumor e os demais tratamentos.

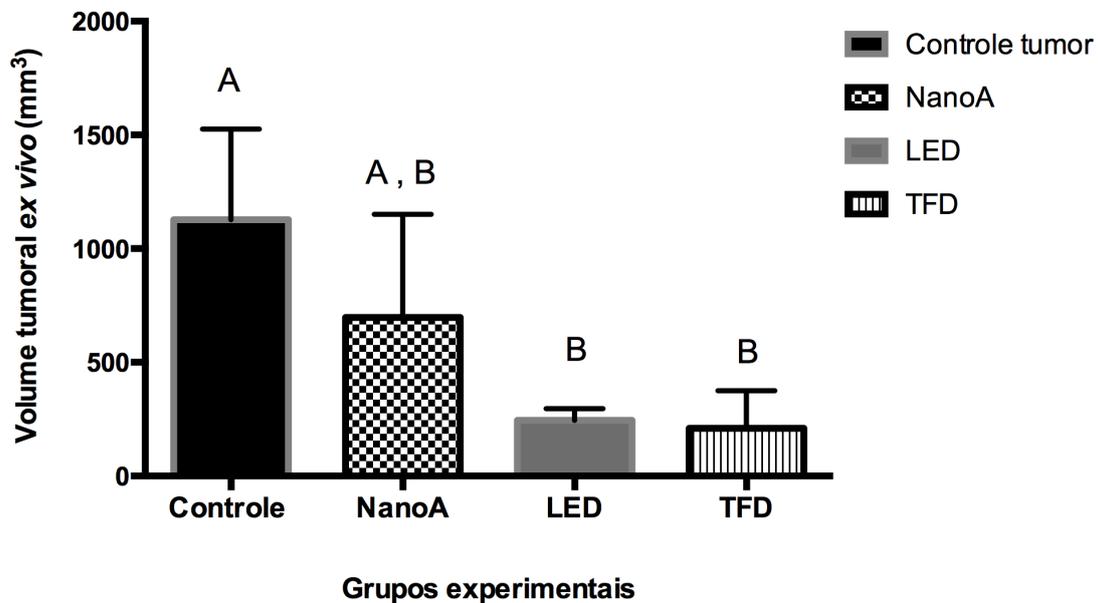


Figura 48. Variação do volume tumoral *ex vivo* em camundongos C57BL/6 com melanoma em função do tratamento com Terapia Fotodinâmica (TFD) [NanoA: 617 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e fluência de 25,9 J/cm^2], tampão fosfato salino (PBS) (Controle tumor), NanoA [617 $\mu\text{g}/\text{mL}$] e irradiação isolada com LED na fluência de 25,9 J/cm^2 . Valores representados pelas médias com desvio padrão. Diferenças significativas indicadas com letras, onde Controle tumor \neq LED ($p < 0,05$) e TFD ($p < 0,05$) [ANOVA].

6.4.2.1.3 Análise dos órgãos sistêmicos

Com o objetivo de avaliar alterações nos órgãos não alvo (fígado, baço, rim, pulmão) dos diferentes grupos, os órgãos foram observados em relação à ocorrência de alterações macroscópicas, tais como esplenomegalia, que ocorreu em todos os animais do grupo Controle tumor, um caso no grupo NanoA e dois casos no grupo tratado com LED. Além disto, foram observadas manchas escuras no baço de um animal do grupo LED.

Adicionalmente, o peso do baço, fígado e rim foi registrado. Na Tabela 11 foram também representados os pesos absolutos dos órgãos mencionados, mostrando diferenças significativas no baço, entre o grupo Controle e o grupo Controle tumor ($p < 0,05$), e entre o grupo Controle tumor e o grupo TFD ($p < 0,05$). Em relação aos pesos relativos houve diferenças significativas no fígado entre o Controle e o grupo TFD ($p < 0,01$), e no baço entre o grupo Controle e o Controle tumor ($p < 0,05$), e o grupo Controle tumor e TFD ($p < 0,05$).

Tabela 11. Peso absoluto e relativo dos órgãos analisados para os animais do grupo controle e animais com tumor submetidos a diversos tratamentos praticados em experimento final *in vivo*.

| | Controle | Controle tumor | NanoA | LED | TFD |
|--------------------------|-------------------------|-------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------|
| Peso absoluto (g) | | | | | |
| Fígado | 1,255 ± 0,134 | 1,150 ± 0,063 | 1,122 ± 0,150 | 1,023 ± 0,132 | 1,004 ± 0,032 |
| Baço | 0,071 ± 0,009 (A, C) | 0,410 ± 0,071 (B) | 0,315 ± 0,225 (A, B, C) | 0,217 ± 0,071 (A, B, C) | 0,094 ± 0,037 (C) |
| Rim direito | 0,125 ± 0,015 | 0,122 ± 0,010 | 0,132 ± 0,008 | 0,123 ± 0,009 | 0,123 ± 0,009 |
| Rim esquerdo | 0,119 ± 0,018 | 0,120 ± 0,009 | 0,127 ± 0,009 | 0,118 ± 0,012 | 0,126 ± 0,007 |
| Peso relativo (%) | | | | | |
| Fígado | 6,049 ± 0,170 (A) | 5,520 ± 0,275 (A, B) | 5,347 ± 0,404 (A, B) | 5,353 ± 0,407 (A, B) | 4,790 ± 0,212 (B) |
| Baço | 0,344 ± 0,016 (A, C) | 1,975 ± 0,409 (B) | 1,516 ± 1,074 (A, B, C) | 1,158 ± 0,439 (A, B, C) | 0,444 ± 0,166 (C) |
| Rim direito | 0,603 ± 0,050 | 0,583 ± 0,017 | 0,632 ± 0,050 | 0,647 ± 0,014 | 0,586 ± 0,040 |
| Rim esquerdo | 0,574 ± 0,040 | 0,576 ± 0,024 | 0,605 ± 0,031 | 0,620 ± 0,056 | 0,602 ± 0,048 |

Dados representados pela média e desvio padrão do peso absoluto e relativo do fígado, baço, rim esquerdo e rim direito do grupo Controle e grupos com tumor, tratados com tampão fosfato salino (PBS) (Controle tumor), NanoA, LED e TFD. ($n = 15$ camundongos). Diferenças significativas estão representadas por letras diferentes. Peso absoluto do baço: Controle \neq Controle tumor ($p < 0,05$); Controle tumor \neq TFD ($p < 0,05$). Peso relativo fígado: Controle \neq TFD ($p < 0,01$). Peso relativo baço: Controle \neq Controle tumor ($p < 0,05$); Controle tumor \neq TFD ($p < 0,05$) [ANOVA].

6.4.2.2 Análise de ensaios hematológicos

Resultados para os exames hematológicos revelaram diferenças significativas para os eritrócitos, hemoglobina, hematócrito e plaquetas (Tabela 12).

Tabela 12. Efeito dos diversos tratamentos nos parâmetros hematológicos em camundongos CL57BL/6, 15 dias após transplantação de células tumorais.

| | Controle | Controle tumor | NanoA | LED | TFD |
|--|---------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|------------------------------------|
| Parâmetro hematológico | | | | | |
| Eritrócito ($\times 10^6/\text{mm}^3$) | 8,6 \pm 1,2 (A, C) | 3,1 \pm 0,06 (B) | 5,2 \pm 2,8 (A, B) | 9,9 \pm 0,38 (C) | 7,5 \pm 1,6 (A, C) |
| Hemoglobina (g/dL) | 13,0 \pm 1,6 (A, C) | 4,9 \pm 0,15 (B) | 8,0 \pm 4,1 (A, B) | 15,4 \pm 4,1 (C) | 11,6 \pm 2,3 (A, C) |
| Hematócrito (%) | 52,0 \pm 9,1 (A, C) | 25,5 \pm 1,8 (B) | 34,5 \pm 9,9 (A, B) | 54,9 \pm 0,6 (C) | 39,9 \pm 6,4 (A, B, C) |
| Plaquetas ($\times 10^3/\text{mm}^3$) | 171 \pm 186,5 (A) | 462,0 \pm 85,1 (B) | 474,3 \pm 36,3 (B) | 616,6 \pm 92,0 (B) | 591,3 \pm 54,6 (B) |
| Leucócitos ($\times 10^3/\text{mm}^3$) | 2,4 \pm 1,7 | 3,7 \pm 0,7 | 2,3 \pm 2,0 | 2,8 \pm 0,2 | 2,8 \pm 0,42 |
| Linfócitos (%) | 57,0 \pm 41,4 | 71,6 \pm 11,9 | 31,6 \pm 47,1 | 88,6 \pm 4,6 | 87,6 \pm 3,2 |
| Monócitos (%) | 3,0 \pm 1,0 | 5,3 \pm 1,5 | 3,6 \pm 2,0 | 2,0 \pm 0,0 | 2,0 \pm 1,0 |

Dados representados pela média e desvio padrão do grupo Controle e grupos com tumor, tratados com tampão fosfato salino (PBS) (Controle tumor), NanoA, LED e TFD. ($n = 15$ camundongos). Diferenças significativas estão representadas por letras diferentes. Eritrócitos: Controle \neq Controle tumor ($p < 0,05$); Controle tumor \neq LED ($p < 0,01$); Controle tumor \neq TFD ($p < 0,05$); NanoA \neq LED ($p < 0,05$); Hemoglobina: Controle \neq Controle tumor ($p < 0,01$); Controle tumor \neq LED ($p < 0,01$); Controle tumor \neq TFD ($p < 0,05$); NanoA \neq LED ($p < 0,05$); Hematócrito: Controle \neq Controle tumor ($p < 0,01$); Controle tumor \neq LED ($p < 0,01$); NanoA \neq LED ($p < 0,05$); Plaquetas: Controle \neq Controle tumor ($p < 0,05$), NanoA ($p < 0,05$), LED ($p < 0,01$), TFD ($p < 0,01$) [ANOVA].

6.4.2.3 Análise histopatológica

6.4.2.3.1 Tumores

Todas as lâminas analisadas apresentaram presença de tecido tumoral, geralmente associado a áreas de necrose, variando em extensão conforme o grupo

experimental. O grupo Controle tumor apresentou o maior número de campos (mm^2) com tumor, seguido pelo grupo tratado com NanoA, LED e finalmente o grupo tratado com TFD. Em relação às áreas de necrose, foi observado que o grupo tratado com TFD apresentou o maior número de campos (mm^2) com necrose, seguido pelo grupo LED, NanoA e por último, o grupo tratado somente com PBS (Controle tumor). As necroses em todas as lâminas analisadas foram em sua maioria classificadas como multifocais. Desta forma, observa-se que a proporção de áreas de necrose por área tumoral no grupo TFD alcançou o maior valor em relação aos demais grupos experimentais, o que sustenta a efetividade do tratamento em questão (Figura 49).

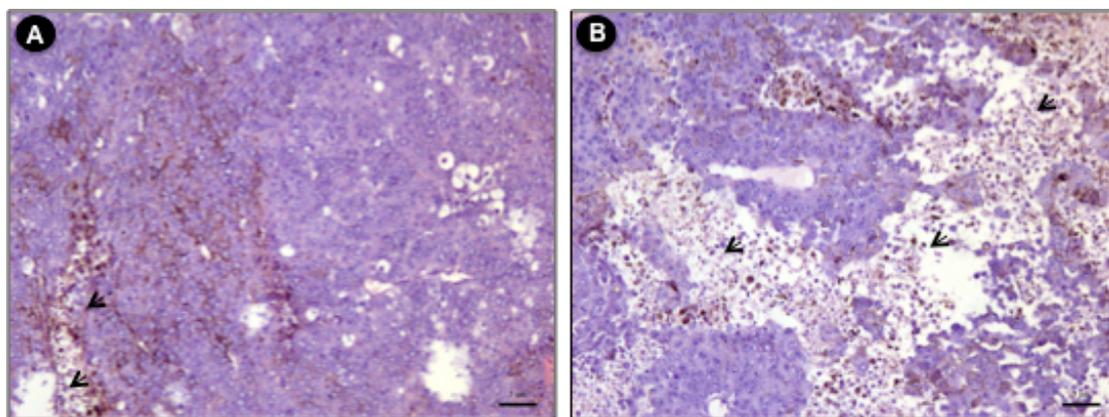


Figura 49. Cortes histológicos de melanoma implantado em camundongos C57BL/6 tratados com tampão fosfato salino (PBS) ou com Terapia Fotodinâmica (TFD). Comparativo de áreas de necrose por área tumoral em camundongos tratados apenas com PBS (A) e com TFD (B). Observa-se em (B) uma grande destruição tumoral, decorrente de necrose. Setas apontam para alguns dos locais com necrose. **Coloração:** H&E. **Barras de escala:** [5 μm].

Além disto, detectou-se a presença de infiltrados inflamatórios na maioria das lâminas, sendo que no grupo Controle tumor, estes foram na sua maioria do tipo crônico, com intensidade discreta. No grupo NanoA, a maioria dos infiltrados inflamatórios foram do tipo misto, com intensidade intensa. O grupo tratado com LED isolado mostrou infiltrados do tipo discreto na maioria das lâminas, e no grupo tratado com TFD foi evidente a presença de infiltrados do tipo misto, com intensidade moderada, na sua maioria.

6.4.2.3.2 Órgãos não alvo

Os pulmões dos animais dos grupos Controle e dos grupos experimentais mostraram a presença de infiltrados inflamatórios do tipo misto com disposição difusa. Geralmente estes infiltrados foram visualizados na região septal e peribrônquica (Figura 50). O septo alveolar mostrou focos de espessamento septal em todos os grupos (Figura 50). A intensidade do infiltrado inflamatório nos grupos Controle, Controle tumor e tratado com NanoA foi discreta, enquanto que nos grupos tratados com LED e TFD foi moderada (Figura 50 B). A estrutura dos brônquios não apresentou alterações dignas de nota em todos os casos analisados.

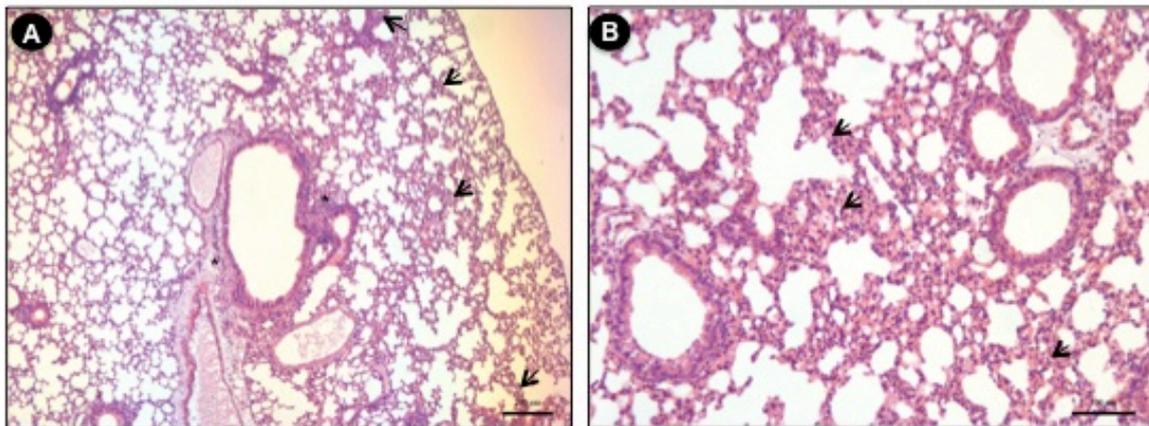


Figura 50. Fotomicrografia de secções histológicas de pulmão de camundongos C57BL/6. Espessamento septal observado em todos os animais. **(A)** Animal do grupo controle sem tumor com áreas com septos normais (à direita) e espessamento septal no lado esquerdo (setas pretas). Infiltrados inflamatórios discretos (asteriscos) próximos a um dos brônquios. **(B)** Animal tratado com NanoA, mostrando infiltrado inflamatório crônico (setas). **Coloração:** H&E. **Barras de escala:** A: [200 μ m]; B: [100 μ m].

No rim, não foram detectadas alterações relacionadas a congestão dos vasos sanguíneos, degeneração tubular, alterações glomerulares, hemorragia e áreas de necrose na maioria dos animais. Apenas no grupo tratado com TFD foi observado um animal com caso de congestão de vasos sanguíneos, degeneração tubular, e presença de um pequeno foco de pielonefrite (Figura 51).

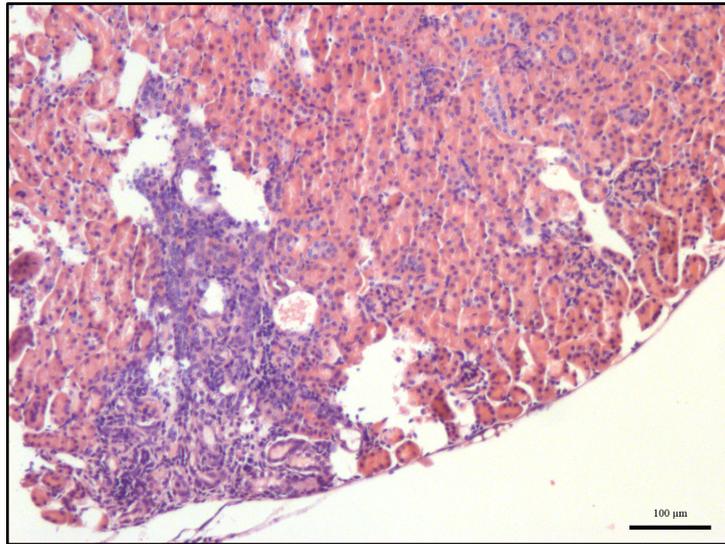


Figura 51. Seção histológica de rim de camundongo C57BL/6 tratado com Terapia Fotodinâmica, mostrando caso de pielonefrite. Área focal de inflamação na cortical renal (área mais acidófila), com destruição de tecido. **Coloração:** H&E. **Barra de escala:** [100 μ m].

No baço, foi observada a presença de congestão de vasos sanguíneos e hiperplasia somente no grupo Controle com tumor. De forma interessante, alguns animais do grupo Controle com tumor apresentaram também esplenomegalia quando analisados macroscopicamente (Figura 52).

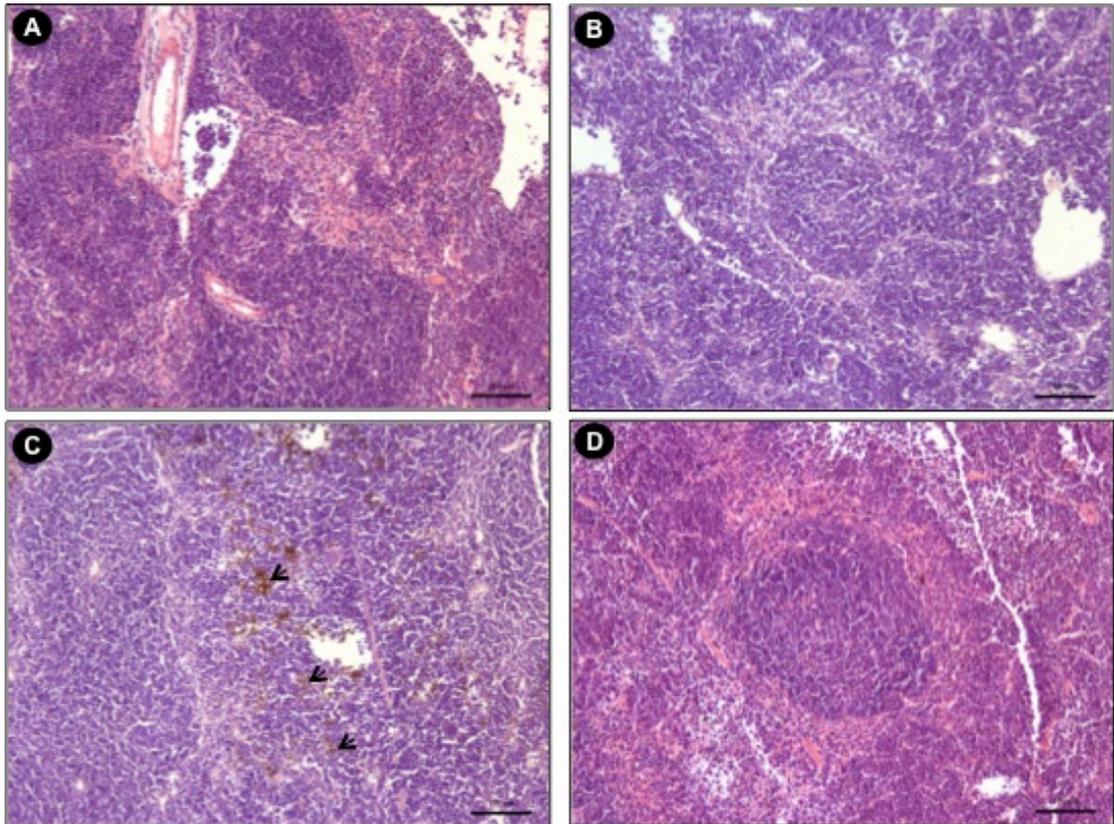


Figura 52. Cortes histológicos de baço de camundongo C57BL/6. Micrografias B, C e D referentes a animal com tumor tratado com tampão fosfato salino (PBS). **(A)** Animal do grupo tratado com LED mostrando tecido esplênico com aparência normal. **(B)** Presença de hiperplasia intensa da polpa branca e congestão (áreas mais basófilas). Animal apresentou esplenomegalia. **(C)** Presença de hemossiderina (corado em marrom) relacionada com área de hemorragia ou congestão de vasos. **(D)** Caso de hiperplasia leve, com polpa vermelha mantida. **Coloração:** H&E. **Barras de escala:** [100 μ m].

Nas lâminas de fígado não foram observados casos de esteatose e necrose em nenhum dos espécimes. O infiltrado inflamatório observado em muitos dos espécimes mostrou um padrão semelhante e, portanto, não foi considerado como indicador de toxicidade. A degeneração hidrópica com padrão difuso foi evidente em todos os grupos, tendo intensidade moderada no grupo Controle e discreta nos demais grupos. Todos os grupos, exceto o tratado com TFD, mostraram focos de sinusóides dilatados (Figura 53).

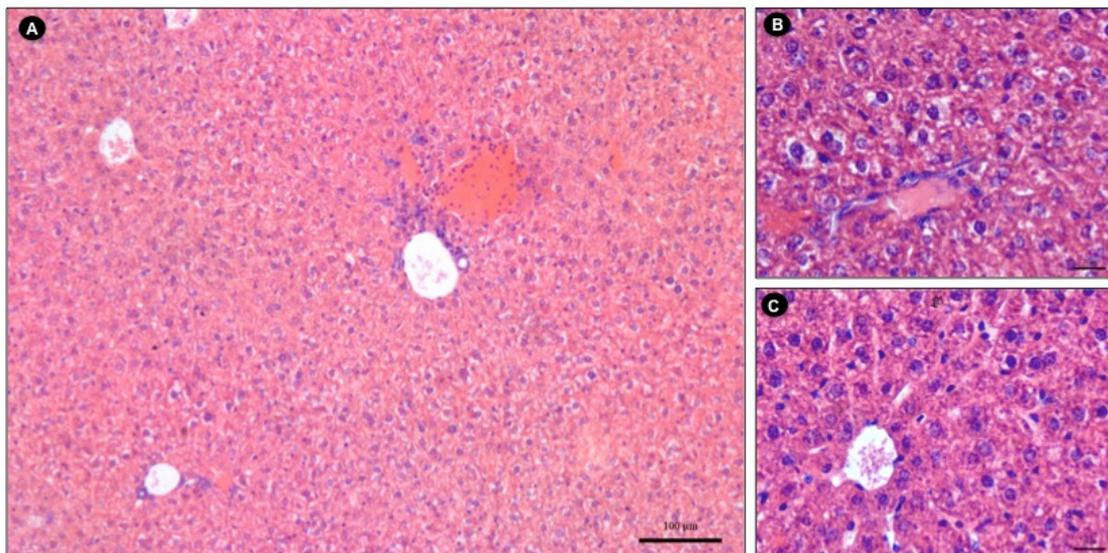


Figura 53. Micrografias de fígado de camundongos C57BL/6. Degeneração hidrópica presente em todos os animais estudados. (A) Amostra de animal controle (sem tumor) mostrando boa parte do tecido hepático com denervação hidrópica e sinusoides dilatados com congestão de vasos sanguíneos associada. (B) e (C) ambos de animal do grupo Controle com tumor, mostrando comparativo entre hepatócitos hidróticos (B), e hepatócitos com aspecto normal (C). **Coloração:** H&E. **Barras de escala:** A: [100 μm]; B e C: [20 μm].

7. DISCUSSÃO

Nos últimos anos, a polpa do açaí tem recebido crescente atenção internacional devido a seu amplo ramo de benefícios terapêuticos e nutricionais (Schauss *et al.*, 2006; Kang *et al.*, 2011). Por exemplo, estudos *in vitro* têm reportado a atividade farmacológica do açaí, mostrando sua ação antiproliferativa, anti-inflamatória e cardioprotetora (Heinrich *et al.*, 2011). Considerando todas essas propriedades benéficas do uso do açaí, nosso grupo de pesquisa se propôs a investigar, de forma inovadora, o potencial fotossensibilizante do óleo de açaí. A caracterização fotoquímica realizada no presente estudo confirmou a capacidade de geração de oxigênio singlete, evento essencial para a aplicação de biomoléculas na TFD, justificando a sua aplicação como fotossensibilizante. Outros trabalhos têm proposto também o uso de diversos produtos naturais como potenciais fotossensibilizantes para a destruição fotodinâmica de células tumorais e outras aplicações farmacêuticas (Ebermann *et al.*, 1996; Ong *et al.*, 2009; Jong *et al.*, 2013).

Acredita-se que a capacidade de geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) pelo açaí se deva à presença de polifenóis, os quais quando em concentrações mais baixas apresentam propriedades de geração de ERO, enquanto que em concentrações mais altas, apresentam propriedades antioxidantes (Pacheco-Palencia *et al.*, 2008). Considerando que as amostras de óleo de açaí testadas tiveram geração de oxigênio singlete, é possível que o óleo de açaí utilizado na presente pesquisa continha uma baixa concentração de polifenóis, agindo, possivelmente, como catalisadores capazes de ser reutilizados nas reações químicas geradoras de oxigênio singlete. Futuros estudos devem ser realizados para comprovar esta relação.

De forma antagonista, o óleo de açaí também apresenta uma alta capacidade antioxidante (Bonomo *et al.*, 2014; Chin *et al.*, 2008), atribuída aos compostos polifenólicos, principalmente as antocianinas (revisado por Ferrari e Rocha Filho, 2011), eliminando as espécies reativas de oxigênio produzidas durante o estresse foto-oxidativo (Zhang *et al.*, 2010). Esses polifenóis (antocianinas, proantocianidinas, outros flavonoides e lignanas) com atividade antioxidante são geralmente encontrados em frutas e vegetais (Gallori *et al.*, 2004; Schauss *et al.*, 2006). Porém, a concentração de antocianinas e proantocianidinas no açaí são relativamente baixas (Schauss *et al.*,

2006, Kang *et al.*, 2011), contribuindo somente com 10% na capacidade antioxidante total do açaí (Lichtenthäler *et al.*, 2005), o que explica as propriedades foto-oxidativas claramente observadas neste estudo. Além disto, vale a pena salientar que essa dualidade do óleo de açaí como oxidante e antioxidante depende se o óleo está sendo ou não ativado pela luz.

Pensando em ampliar as aplicações terapêuticas do óleo de açaí diante das propriedades benéficas já bem descritas na literatura, a sua incorporação em um sistema nanoestruturado alterou positivamente algumas das suas características, melhorando a sua administração, proporcionando melhor dispersão, biocompatibilidade e seletividade, características desejadas para aumentar a eficácia de fármacos e fotossensibilizantes. Inclusive, o tipo de nanoestrutura na qual o óleo de açaí foi inserido não impediu a difusão do oxigênio que participa dos processos fotoquímicos geradores de oxigênio singlete durante a TFD (Bechet *et al.*, 2008).

A Terapia Fotodinâmica envolve a administração sequencial de um fotossensibilizante e luz para o tratamento de tumores malignos (Haddad *et al.*, 1998). A avaliação dos componentes empregados para realizar a TFD, mostrou que tanto o LED como a NanoA utilizados neste trabalho apresentam características apropriadas para o seu uso neste tipo de terapia. No caso do LED, o fato deste emitir fótons dentro da faixa do vermelho visível favorece a eficácia do tratamento mediante TFD já que a luz nesse comprimento de onda apresenta maior capacidade de penetração ativando o FS com o mínimo de desvio óptico (Agostinis *et al.*, 2011). O pico máximo de emissão do LED teve valor muito próximo ao mostrado pela absorbância máxima do FS empregado neste trabalho, o que indica a capacidade do LED de fotoativar a NanoA (Dougherty *et al.*, 1998). Além disto, a potência utilizada (122 mW) se encontra bem abaixo do valor limite de 500 mW, evitando assim qualquer tipo de efeito térmico (Huang *et al.*, 2009), que pudesse impedir a avaliação do efeito da TFD isolada.

Em relação à NanoA, o fato desta absorver fótons dentro da janela óptica dos tecidos biológicos, contribui na eficácia do tratamento na medida em que não compete com a maioria dos cromóforos teciduais que poderiam absorver a energia do LED e assim evitar que o FS fosse fotoativado (Huang *et al.*, 2009). Mesmo assim, o pico de absorção da NanoA se encontra dentro do espectro de absorção da melanina

(Borisova *et al.*, 2011), inevitavelmente diminuindo em certo grau a eficácia da TFD.

No processo de desenvolvimento do protocolo de síntese da NanoA, foi observado que o aumento na proporção de tensoativo na formulação da nanoemulsão, reduziu o valor do diâmetro hidrodinâmico das nanogotículas. Concentrações altas de tensoativo na fase contínua reduzem a tensão superficial e aumentam a estabilidade das gotículas, proporcionando também gotículas de tamanhos menores (Fryd e Mason, 2012), conforme observado no presente estudo. Esperava-se que conforme aumentasse o número de ciclos (inversões de fase pelo método PIT), as nanogotículas passariam por um processo de formação de gotículas com diâmetros menores, porém, esta relação não foi observada. As proporções de tensoativo e o número de ciclos definidos para a síntese da NanoA permitiram o preparo de partículas com características físico-químicas favoráveis, segundo as indicações gerais sugeridas para a aplicação de nanomateriais em sistemas biológicos (Sahay *et al.*, 2010).

O controle das características físico-químicas das nanogotículas, especialmente a média do raio de cada gotícula e a dispersão são ambos aspectos de importância vital no preparo de nanoemulsões (Fryd e Mason, 2012). Por este motivo, dependendo do tamanho das nanogotículas e da uniformidade desejada para a sua população, pode ser usado um método de síntese que permita a formulação de nanoemulsões com características diferentes. Recentemente, tem surgido um crescente interesse pelos métodos de síntese de emulsões utilizando baixa energia, tal como o PIT (Anton *et al.*, 2009), pois permite a síntese de emulsões com gotículas pequenas e com baixa polidispersão (Solè *et al.*, 2012), propósito do presente trabalho. De fato, este método permitiu a síntese de nanogotículas com diâmetro médio de 74 nm (MET), diâmetro hidrodinâmico médio de 117,5 nm e valor médio de PDI de 0,144 que mostra precisamente que a NanoA foi composta por nanogotículas com baixa polidispersão, garantindo uma nanoemulsão mais homogênea. Isto foi comprovado também pela análise no MET, onde foi visto que as gotículas apresentaram formato esférico e populações com baixa polidispersão. Os espectros de absorvância e de fluorescência tanto do óleo de açaí como da NanoA mostraram que o método de preparo da NanoA que incorpora o óleo de açaí nas nanogotículas, não interfere nas propriedades fotofísicas do óleo, sustentando assim a entrega do FS via nanossistemas, tais como as nanoemulsões.

Os resultados referentes à estabilidade da NanoA mostraram a manutenção das suas propriedades coloidais (em temperatura ambiente ou refrigeradas na temperatura de 7 °C) por até um ano. A estabilidade nestas duas temperaturas resulta sumamente interessante ao se pensar nas formas mais comuns de estocagem de produtos farmacológicos. As nanoemulsões apresentam a capacidade de manter a sua estabilidade cinética pelo período de meses (revisado por Anton *et al.*, 2009;) e até anos (revisado por Gutiérrez *et al.*, 2008). Esta estabilidade pode ser atribuída ao pequeno tamanho das gotículas e à polidispersão, aspectos que previnem que ocorra envelhecimento de Ostwald, sedimentação e cremagem. A estabilidade cinética pode também ser atribuída ao uso do tensoativo, o qual inibe a coalescência entre gotículas, evitando a fusão destas (Fry e Mason, 2012). Precisamente é esta estabilidade cinética que tem aumentado o interesse no uso de nanoemulsões devido a seu potencial no campo dos cosméticos, agroquímicos, indústria química e farmacêutica para a entrega de fármacos (Solè *et al.*, 2010).

Outros dados sobre a estabilidade mostram que até o período de 365 dias após preparo, a NanoA apresentou uma perda das suas características fotofísicas (absorbância e fluorescência), mas a sua atividade fotoquímica foi mantida pois continuou ativa na geração de oxigênio singlete. Isto indica que existe uma diferença entre as moléculas do fluoróforo e do componente no óleo de açaí (possivelmente os polifenóis) capaz de gerar oxigênio singlete. Em relação a isto, vale a pena lembrar que o óleo de açaí é composto por uma série de frações diferentes, as quais nem todas foram caracterizadas até o momento (Pacheco-Palencia *et al.*, 2008; Rosso *et al.*, 2008; Favacho *et al.*, 2011). Em estudo conduzido por Rodríguez-Delgado (2001), muitos dos compostos fenólicos e flavonóides do vinho, também achados no óleo de açaí, foram separados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e analisados em relação aos seus comprimentos de onda de excitação e emissão. Porém todos apresentaram valores de comprimento de onda de emissão menores (em torno dos 300 nm) aos observados no presente estudo. Por outro lado, a avaliação da composição fitoquímica e da estabilidade do pigmento do açaí, indicou que as antocianinas, um dos componentes do pigmento, apresentam comprimento de onda máximo de absorção em 515 nm (Pozo-Insfran *et al.*, 2004). Observa-se a necessidade de que futuros estudos sejam centralizados na caracterização detalhada dos componentes do açaí e nos seus efeitos, para melhor entender o papel de cada um

deles e sua relação com as atividades do açaí já descritas.

Uma vez confirmada a estabilidade, caracterização morfológica e capacidade de geração de oxigênio singleto da nanoemulsão sintetizada, foram testados os efeitos desta em modelos *in vitro*.

Dentre as características desejadas para um FS ideal, encontra-se que este não deve produzir toxicidade no escuro, ou caso a produza mesmo não estando ativado, deveria ser em níveis mínimos (Bechet *et al.*, 2008, Agostinis *et al.*, 2011). Partindo desta premissa básica da TFD, os primeiros estudos realizados aqui procuraram investigar os efeitos citotóxicos da NanoA no seu estado inativo, tanto em células de melanoma como em células não tumorais, calculando as concentrações que causam 10% da morte destas células (CC10). De maneira interessante, nota-se que a CC10 para a célula tumoral é aproximadamente 56% menor do que a CC10 determinada para a célula não tumoral, mostrando que as células tumorais apresentam uma tendência de maior retenção da NanoA. Este ponto torna-se bastante atrativo ao se pensar na aplicação *in vivo* e clínica da NanoA, pois este tipo de comportamento do FS diminui a possibilidade de efeitos adversos nos tecidos e células não tumorais (Paszko *et al.*, 2011).

A maior sensibilidade à nanoemulsão contendo óleo de açaí observada nas células tumorais B16F10 em comparação com as células não tumorais NIH/3T3, pode ser atribuída também à interação das células alvo com as características físico-químicas da NanoA (tamanho, forma, carga, hidrofobicidade, etc.) (Sahay *et al.*, 2010) e à própria composição da NanoA. A rápida proliferação observada na carcinogênese requer alta demanda energética que, entre outros processos, pode também ser suprida pela ávida captura de lipídeos exógenos, processo conhecido como lipolítico, com o objetivo de obter ácidos graxos (revisado por Zaidi *et al.*, 2013). Além disto, é possível que as células tumorais possuam quantidade maior de receptores de lipídeos na sua membrana plástica, em comparação com as células não tumorais (revisado por Zaidi *et al.*, 2013), sustentando a maior adsorção da NanoA pelas células B16F10. Conforme mencionado anteriormente (Nascimento *et al.*, 2008), 70% da composição do óleo de açaí é de ácidos graxos, que por sua vez cumprem seu papel em facilitar a incorporação do NanoA especialmente nas células tumorais estudadas.

De forma a explicar a toxicidade preferencialmente observada nas células tumorais, ressalta-se que o óleo de açaí possui compostos polifenólicos que mostram propriedades de inibição da proliferação celular, induzem apoptose, alteram a cinética do ciclo celular e interferem com a transdução de sinais intracelulares em vários modelos celulares de câncer (Robards *et al.*, 1999; Elattar e Viriji, 1999; Briviba *et al.*, 2002; Mertens-Talcott *et al.*, 2006). Por exemplo, Pacheco-Palencia e colaboradores (2008) demonstraram que os polifenóis presentes no óleo de açaí inibiram em 90,7% a proliferação celular de células HT-29 de adenocarcinoma de cólon humano, acompanhado por um aumento de duas vezes na produção de ERO. Em outro estudo, realizado por Del Pozo-Insfran *et al.* (2004), foi elucidada a indução da atividade antiproliferativa e pró-apoptótica dos compostos polifenólicos do açaí contra células HL-60 causadoras de leucemia.

Ao analisar os resultados referentes à citotoxicidade no escuro para o tempo de incorporação de 15 minutos, observa-se que da mesma forma que foi observado para os experimentos de citotoxicidade para 24 e 48 horas, a concentração necessária para manter 90% das células de melanoma viáveis foi 4,6 vezes menor em comparação com a CC10 para NIH/3T3. Esta relação entre o efeito tóxico da concentração de fotossensibilizante de acordo com o tipo de linhagem celular (tumoral ou não tumoral) também foi detectada em outros trabalhos (Zhao *et al.*, 2009; Maduray *et al.*, 2012). Sustentando a maior sensibilidade observada nas células tumorais, vale a pena enfatizar que a concentração de 617,00 µg/mL escolhida (CC10 para NIH/3T3) para ser usada posteriormente nos experimentos com TFD causou de fato um efeito maior nas células de melanoma, mostrando 33% de morte celular em relação às células controle (100%).

Vale a pena também fazer um paralelo entre todos os tempos de incorporação (15 minutos, 24h e 48h) e os valores obtidos para as suas respectivas CC10, notando que para as células tumorais foi necessária uma concentração 3,5 maior (em relação ao tempo de 24 horas) e 4,7 vezes maior (em relação ao tempo de 48h) para comprometer a viabilidade de 10% das células. Já no caso das células não tumorais, a CC10 para 15 minutos foi 9,5 vezes maior em comparação com a CC10 para 24 horas. Portanto, de forma geral observa-se que quanto menor foi o tempo de

incorporação, concentrações de NanoA bem maiores foram necessárias para poder alcançar a mesma toxicidade observada nos tempos de incorporação maiores.

Uma vez que foi determinada a concentração que afeta minimamente a viabilidade das células não tumorais no tempo de incorporação de 15 minutos, foram realizados os testes de Terapia Fotodinâmica. A TFD é um processo fotoquímico que mostra interações complexas entre a fluência, a taxa de fluência, a concentração do FS e a concentração de oxigênio molecular na célula ou no tecido (Langmack *et al.*, 2001). A taxa de fluência na entrega de luz na TFD tem sido identificada como um importante modulador da oxigenação tissular e resultados do tratamento. Além do mais, sabe-se que há uma correlação direta entre o dano celular e tecidual com a quantidade de oxigênio singlete sendo produzido pela TFD. Por este motivo, é sumamente importante arquitetar um tratamento que vise a utilização de valores de fluência adequados e concentrações de FS que permitam um processo mais efetivo.

A avaliação do efeito citotóxico causado pelo tratamento com TFD nas células NIH/3T3 demonstrou que independentemente do tipo de tratamento praticado, mudanças na viabilidade celular não foram significativas. O panorama foi bem diferente para as células de melanoma, que ao serem tratadas com TFD nas diferentes doses de fluência, especialmente com os valores de fluência de 25,9 J/cm² e 51,8 J/cm², tiveram efeitos citotóxicos, mostrando viabilidade celular próxima ao valor de 15% para ambos valores de fluência. O experimento subsequente foi realizado com TFD na fluência de 25,9 J/cm², por ser mais eficiente com as células tumorais (mantendo uma viabilidade de 15%) e ainda permitir a viabilidade de 70% nas células não tumorais. Na mesma linha, Carvalho (2013) investigou o potencial fotossensibilizante do extrato de cajurú *Arrabidaea chica* em nanoemulsão, pelo tempo de incorporação de 15 minutos e posterior ativação com várias doses de energia utilizando células de adenocarcinoma mamário murino (4T1) e células não tumorais NIH/3T3. Ao considerar o efeito da dose de 25,7 J/cm² aplicada nas células 4T1, foi observada uma viabilidade de 12%, enquanto que nas células não tumorais (NIH/3T3) foi de somente 25%, o que indica pouca seletividade de captura pelas células tumorais.

Outros trabalhos que utilizaram valores de fluência semelhantes com TFD mediada por outros FS observaram resultados parecidos em células de melanoma. Por

exemplo, Zhao e colaboradores (2009) trabalharam com várias concentrações de silicone ftalocianina (Pc4) livre e encapsulada em partículas de sílica. As partículas carregadas foram administradas e seguidamente irradiadas na fluência de $22,5 \text{ J/cm}^2$, semelhante à fluência usada no presente trabalho, mostrando uma viabilidade celular de aproximadamente 20%. Trabalhos com fluências menores (Maduray *et al.*, 2011) descreveram a aplicação da tetra-sulftalocianinas de alumínio para o tratamento de células de fibroblastos e melanoma. A fluência de $4,5 \text{ J/cm}^2$ mostrou viabilidade de 48% para as células de melanoma e 78% para os fibroblastos. De forma comum em todos estes trabalhos apresentados, observa-se que a toxicidade nas células tumorais foi um evento dependente tanto da concentração de FS utilizada como também da dose energética sendo aplicada (Kolarova *et al.*, 2007; Kastle *et al.*, 2011).

O papel principal da TFD é induzir a morte de células não desejadas. Este processo ocorre mediante três vias principais: 1) via direta que leva à apoptose ou necrose; 2) via indireta que causa o recrutamento de células inflamatórias (neutrófilos, macrófagos, etc.) e a ativação não específica do sistema imunitário; e 3) oclusão de vasos sanguíneos e isquemia tumoral. O balanço entre estas vias é monitorado por vários parâmetros, entre eles a localização intracelular do FS, taxa de fluência, propriedades físico-químicas do FS, a concentração de oxigênio e o tipo celular. A via direta geralmente é desencadeada por TFD de alta dose, ou seja, sem limitação de fluência, e/ou FS e concentração de oxigênio. A TFD de alta dose utiliza concentrações de FS e valores de fluência que permitem somente a viabilidade de 10% das células tumorais tratadas (Piette *et al.*, 2003). O resultado obtido no presente trabalho mostrou exatamente isso, valor de viabilidade das células de melanoma próximo de 15%, o que confirmou que o tipo de TFD usada foi a de alta dose.

A determinação e quantificação do tipo de morte celular induzida por TFD mediada por NanoA foi feita mediante citometria de fluxo utilizando o iodeto de propídeo (IP) e a anexina V como marcadores que permitem discriminar entre necrose, apoptose e apoptose tardia (Piette *et al.*, 2003). A apoptose inicial é caracterizada por uma reorganização da membrana plasmática e é detectada pela marcação positiva pela anexina V e marcação negativa pelo iodeto de propídeo, enquanto que a apoptose tardia ou necrose indica danos ao DNA e é indicada pela marcação positiva tanto da anexina V como do IP. A necrose foi determinada pelo

percentual de células marcadas somente com IP (Zhao *et al.*, 2009). Os resultados aqui encontrados revelaram que as células tumorais tratadas via TFD morreram na sua maioria via apoptose tardia/necrose.

A apoptose induzida pela TFD nas células de melanoma aqui apresentada provavelmente ocorreu devido a danos fotoinduzidos nas mitocôndrias (Kessel e Luo, 1998; Varnes *et al.*, 1999; Vantirghem *et al.*, 2001). De fato, as mitocôndrias apresentam um papel crítico na cascata apoptótica, mediante o controle da liberação de fatores cruciais envolvidos nesse processo, tal como o citocromo *c*. Durante a apoptose, o citocromo *c* é liberado da mitocôndria para o citosol, sendo este processo controlado pelas proteínas da família Bcl-2. No citosol, o citocromo *c* ativa as caspases, uma família de proteases que participam na morte celular, pela formação de um complexo com Apaf-1 (protease apoptótica ativadora do fator-1), procaspase-9 e ATP (revisado por Mroz *et al.*, 2011).

Após confirmada a efetividade da NanoA *in vitro*, passou-se aos testes *in vivo*.

Conforme foi discutido anteriormente, a fotoatividade *in vitro* depende principalmente das propriedades fotoquímicas e de penetração nas células do FS carregado em nanossistemas, enquanto que a atividade *in vivo* é determinada por uma série de fatores, entre eles, a farmacocinética e distribuição dos nanossistemas no tecido, afetados adicionalmente pela interação com o plasma e componentes teciduais (Bechet *et al.*, 2008). Assim, considerando a maior complexidade encontrada nos modelos experimentais *in vivo*, a mesma eficácia terapêutica da TFD mediada pela NanoA que foi comprovada nos experimentos *in vitro* com células B16F10 não seria esperada no sistema *in vivo*. Porém, resultados interessantes foram obtidos.

Os resultados observados para o experimento piloto mostraram, estatisticamente, que todos os tratamentos aplicados tiveram o mesmo efeito nos animais. No entanto, biologicamente, foi observado que o tratamento com TFD, seguido pelo tratamento com NanoA foram mais eficazes para diminuir o volume tumoral dos animais com melanoma. Neste experimento, aparentemente, o LED teve um efeito de estimulação da proliferação celular, semelhante ao observado em lasers de baixa potência (Vinck *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2009). Estes resultados foram de extrema importância pois indicaram que adaptações tais como aumento no número de

tratamentos e dose de NanoA administrada seriam necessários para que o tratamento com TFD fosse mais eficaz.

No experimento final, a avaliação do volume tumoral para os tratamentos com NanoA, LED e TFD, quando confrontados com o tratamento com PBS, mostrou que houve uma diminuição significativa no crescimento tumoral, sendo mais acentuada para TFD. Estes dados foram confirmados histologicamente pela análise dos tumores, onde foi observado que, para o grupo TFD, a área tumoral foi menor e a razão entre área necrótica por área tumoral foi maior. A necrose observada nos tecidos tumorais pode ser atribuída a três processos diferentes: i) o próprio desenvolvimento fisiológico do melanoma que apresenta altas taxas de proliferação faz com que áreas mais centrais no tumor sejam necrosadas, principalmente por hipóxia; ii) a fototoxicidade do próprio tratamento; e iii) a própria TFD pode induzir hipóxia pela rápida depleção do estoque de oxigênio local (Huang *et al.*, 2008). Portanto, as áreas de necrose observadas no tumor sem tratamento podem estar associadas ao rápido crescimento tumoral. No caso dos grupos NanoA e LED, a presença de necrose pode estar correlacionada de uma forma menos importante com a proliferação celular. No entanto, no caso do grupo NanoA é possível que a necrose se deva à toxicidade no escuro da nanoemulsão, enquanto que no grupo LED a presença das áreas de necrose pode estar relacionada com hipóxia tecidual. Ao trabalhar com LED com taxa de fluência de 55 mW/cm^2 , sabe-se que o feito não está relacionado a danos hipertérmicos (taxa de fluência maior do que 150 mW/cm^2) e sim ao fato de que taxas de fluência maiores do que 50 mW/cm^2 podem afetar a disponibilidade de oxigênio (Morton *et al.*, 2002).

O comportamento terapêutico observado neste trabalho pode estar associado a uma série de fatores, dentre os quais podem ser citados: i) a seletividade do FS pelo tecido tumoral; ii) duração da aplicação do FS; iii) distribuição e concentração do FS; iv) habilidade da luz em penetrar o alvo desejado e duração da exposição à luz; v) estado de oxigenação das células alvo durante irradiação; vi) sensibilidade intrínseca do tecido alvo às ERO (Zhao *et al.*, 2010; Huang *et al.*, 2008). Traçando um paralelo com os resultados *in vitro* apresentados neste trabalho, as células B16F10 transplantadas nos camundongos podem ter maior seletividade de captura da NanoA, fato que também pode ter ocorrido nos animais tratados somente com NanoA, porém

ao não ter sido fotoativada, o mesmo efeito terapêutico não foi observado. Além disto, o fato de termos administrado a NanoA diretamente no tumor garantiu uma distribuição mais homogênea do FS no tumor e uma maior concentração do FS no alvo, evitando perdas sistêmicas, assim aumentando o efeito do FS na produção de oxigênio singlete durante a TFD de alta fluência utilizada (Henderson *et al.*, 2006). O fato de termos aumentado a concentração de NanoA usada e o número de tratamentos, em relação aos utilizados no experimento piloto, aumentou a eficácia da TFD, mostrando volumes tumorais menores no fim do período experimental.

Além da seletividade observada nas células B16, o acúmulo de partículas em tecidos tumorais é um evento tamanho dependente. Ao utilizar nanopartículas de tamanho adequado, é possível aumentar a concentração do FS contido nelas no tecido tumoral, enquanto é reduzida a sua concentração nos tecidos não tumorais (Bechet *et al.*, 2008; Camerin *et al.*, 2010; Kano *et al.*, 2013; Master *et al.*, 2012). Portanto, considerando não só a questão do tamanho, mas também as demais características físico-químicas apresentadas pela NanoA, observam-se propriedades favoráveis para sua aplicação em sistemas *in vivo*. Assim, é possível que a NanoA represente um tipo de sistema de entrega capaz de se acumular passivamente em tumores devido ao efeito de aumento de permeação e retenção vascular (EPR), resultante do aumento na permeabilidade dos vasos sanguíneos presentes na área tumoral e drenagem linfática defeituosa, possibilitando o maior acúmulo macromolecular de fármacos nos tecidos tumorais em comparação com os tecidos sadios (Matsumura *et al.*, 1986). Além disto, a NanoA proporcionou melhor dispersão ao óleo de açaí, possibilitando o uso da sua atividade fotodinâmica em sistemas biológicos. Resultados de microscopia de fluorescência mostraram que o tempo de aplicação do FS foi suficiente para a NanoA se acumular no tecido, porém, outros tempos menores podem ser futuramente explorados para garantir maior acúmulo da NanoA no tecido tumoral.

Apesar das células B16F10 serem altamente metastáticas, especialmente para o pulmão (Martínez *et al.*, 2005), a análise histológica não revelou nenhum indício de metástase nos órgãos analisados. Porém, algumas alterações foram observadas. No rim de um dos animais tratados com TFD, foi observada uma área focal de inflamação na cortical renal e destruição do tecido (pielonefrite). Toxinas e drogas podem produzir lesão renal desencadeando uma reação imunológica (Kumar *et al.*, 2005). No

entanto, por representar um caso isolado, é provável que o achado não esteja relacionado ao tratamento. No caso do baço, a hiperplasia intensa na polpa branca detectada somente nos animais com tumor sem tratamento, indicou que houve maior atividade relacionada à defesa do animal perante a agressão causada pelas características do tumor. Este resultado foi corroborado pelo teste de hemograma onde houve um aumento na porcentagem de leucócitos, apontando que os tratamentos aplicados têm efeito terapêutico, em maior ou menor grau, pois evitaram uma resposta de defesa considerável, sendo que o tratamento com TFD teve um maior efeito ao considerar também os resultados de peso absoluto do baço.

Conforme mencionado anteriormente, o fato de que o melanoma aqui tratado apresentou um alto conteúdo de melanina é um fator que complica o tratamento com TFD, principalmente por ter usado um sistema que é fotoativado em um comprimento de onda dentro da faixa de absorção da melanina. Assim, a habilidade da luz em penetrar o tumor para ativar a NanoA pode ter sido parcialmente diminuída devido ao alto conteúdo de melanina presente das células B16F10. Além disto, a melanina possui um efeito antioxidante (Davids e Kleeman, 2011) que atua como mais um mecanismo de resistência à TFD. Mesmo considerando este desafio, foi de extrema importância ter realizado os experimentos neste modelo de melanoma, considerando que a maioria dos melanomas são melanóticos, contendo diferentes graus e tipos de pigmentação. Apesar de não termos observado remissão completa dos tumores, a acentuada redução no volume tumoral (82%) observada para os animais tratados com TFD contribuiu como um dado interessante para a aplicação da TFD como terapia adjuvante a procedimentos cirúrgicos, sendo seletiva ao tecido tumoral.

8. CONCLUSÕES

Baseado nos resultados obtidos no presente trabalho pode-se chegar às seguintes conclusões:

- O óleo de açaí livre apresenta espectros de absorvância e fluorescência dentro da janela óptica dos tecidos biológicos (600 a 1000 nm) e produz oxigênio singlete quando submetido ao teste de decaimento do benzofurano, mostrando propriedades aptas para seu uso como fotossensibilizante;
- A nanoemulsão desenvolvida, do tipo óleo/água, é capaz de encapsular, proteger e entregar o óleo de açaí; sendo a formulação estável à temperatura ambiente e temperaturas de 7 °C, com população com baixa polidispersão e carga de superfície negativa;
- A nanoemulsão formulada apresenta características físico-químicas favoráveis para sua aplicação em sistemas biológicos, entre elas diâmetro médio de 74 nm e diâmetro hidrodinâmico médio de 117,5 nm para cada nanogotícula, índice de polidispersão de 0,144 e potencial zeta de -0,536 mV;
- A associação do óleo de açaí com o nanossistema permite a compatibilidade deste com meios aquosos mantendo as propriedades fotoquímicas e fotofísicas do óleo livre.
- Ensaio de citotoxicidade na ausência de irradiação mostra uma relação concentração e tempo dependente e seletividade de captura da nanoemulsão pelas células tumorais B16F10;
- A nanoemulsão com óleo de açaí é tóxica para 10% das células NIH/3T3 na concentração de 617,00 µg/mL pelo tempo de exposição de 15 minutos submetidas a testes sem irradiação;
- A nanoemulsão com extrato de óleo de açaí é tóxica na concentração de 617,00 µg/mL com exposição por 15 minutos para ambas as linhagens quando submetidas a testes com irradiação com fonte diodo emissora (LED) na fluência de 25,9 J/cm²,

mostrando resultados de viabilidade de 15% para a linhagem celular tumoral (B16F10) e 70% para as células não tumorais de fibroblasto murino (NIH/3T3)

- A nanoemulsão com óleo de açaí produz morte celular por apoptose tardia/necrose;
- Experimentos *in vivo* mostram que a Terapia Fotodinâmica aplicada cinco vezes nos tempos experimentais de 2, 4, 7, 10 e 13 dias, com concentração de NanoA de 50 mg/mL administrada intratumoralmente pelo tempo de exposição de 30 minutos e em seguida irradiada na fluência de 25,9 J/cm² tem uma acentuada redução (82%) no volume tumoral dos animais, mostrando extensas áreas de necrose no tecido tumoral.
- Diante do exposto, os dados mostrados para os experimentos *in vitro* e *in vivo* para o tratamento do melanoma com Terapia Fotodinâmica mediada pela nanoemulsão com óleo de açaí contribui com resultados que apoiam a aplicação deste tipo de tratamento como terapia adjuvante a procedimentos cirúrgicos, sendo seletiva ao tecido tumoral.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGOSTINIS P., BERG K., CENGEL K.A., FOSTER T.H., GIROTTI A.W. ET AL. Photodynamic therapy of cancer: an update. **CA Cancer J, Clin.** v. 61, p. 250-81, 2011.

ALBINO A.P., LE STRANGE R., OLIFF A.I., FURTH M.E., e OLD L.J. Transforming ras genes from human melanoma: a manifestation of tumour heterogeneity? **Nature**, v. 308, p. 69–72, 1984.

ALBINO A.P., NANUS D.M., MENTLE I.R., CORDON-CARDO C., MCNUTT N.S., BRESSLER J., e ANDREEFF M. Analysis of ras onc- ogenes in malignant melanoma and precursor lesions: correlation of point mutations with differentiation phenotype. **Oncogene** v. 4, p. 1363–1374, 1989.

ALLISON R.R., CUENCA R.E., DOWIE G.H., CAMNITZ P., BRODISH B., ET AL. Clinical photodynamic therapy of head and neck cancers—A review of applications and outcomes. **Photodiagn. Photodyn. Ther.** v. 2005; p. 205-22, 2005.

ALLISON R.R., SHENG C., CUENCA R., BAGNATO V.S., AUSTERLITZ C., ET AL. Photodynamic therapy for anal cancer. **Photodiagn Photodyn Ther.** v. 7, p. 115-19, 2010.

ALMEIDA S.S., AMARAL D.D., SILVA A.S.L. Análise florística e estrutura de

AMERICAN CANCER SOCIETY. Cancer Facts & Figures 2013. Atlanta: American Cancer Society; 2013.

ANTON N., VANDAMME T.F. The universality of low-energy nano-emulsification. **Int. J. Pharm.** v. 377, p. 142–147, 2009.

ARMSTRONG B.K., KICKER A. Cutaneous melanoma. **Cancer Survey.** v. 19, p. 219-40. 1994.

ATALLAH E., FLAHERTY L. Treatment of metastatic malignant melanoma. **Curr. Treat. Options Oncol.** v. 6, p. 185-93, 2005.

AZEVEDO R.B., MUEHLMANN L.A., LONGO J.P.F., FARIA F. S. E. D. V., DEKTEREV I.A. Composição à base de óleo vegetal para aplicação em terapia fotodinâmica. 2012, Brasil. Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: PI1020120210436, data de depósito: 22/08/2012, título: "Composição à base de óleo vegetal para aplicação em terapia fotodinâmica", Instituição de registro:INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

BAJETTA E., DEL VECCHIO M., BERNARD-MARTY C., VITALI M., BUZZONI R. Metastatic melanoma: Chemotherapy. **Semin. Oncol.** v. 29, p. 427- 45, 2002.

BALDEA I., FILIP A.G. Photodynamic Therapy In Melanoma - An Update. **J. Physiol. Pharmacol.** v. 63, p. 109-118, 2012.

BALDELLI F.B., WEBSTER C.A., MONCRIEFF M., SHERWOOD V. The scope of nanoparticle therapies for future metastatic melanoma treatment. **Lancet Oncol.** v.15, p. e22- e32, 2014.

BECHET D., COULEAUD P., FROCHOT C., VIRIOT M.L., GUILLEMIN F., BARBERI-HEYOB M. Nanoparticles as vehicles for delivery of photodynamic therapy agents. **Trends Biotechnol.** v. 26, n.11, p. 612-621, 2008.

BICALHO L.S., LONGO J.P.F., CAVALCANTI C.E.O., SIMIONI A.R., BOCCA A.L., ET AL. Photodynamic Therapy Leads to Complete Remission of Tongue Tumors and Inhibits Metastases to Regional Lymph Nodes. **J. Biomed. Nanotechnol.** v. 9, p. 811-818, 2013.

BONOMO L.F., SILVA D.N., BOASQUIVIS P.F., PAIVA F.A., GUERRA J.F.C., MARTINS T.A.F., ET AL. Açai (Euterpe oleracea Mart.) Modulates Oxidative Stress Resistance in Caenorhabditis elegans by Direct and Indirect Mechanisms. **PLoS ONE.** v. 9, p. e89933, 2014.

BORISOVA E., BLIZNAKOVA I., MANTAREVA V., ANGELOV I., AVRAMOV L. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy of Cutaneous Melanoma, Current Management of Malignant Melanoma. In: Ming Y. Cao (Ed.), **InTech**, Chapter 7; p. 141-56, 2011.

BOYLE G.M. Therapy for metastatic melanoma: an overview and update. **Expert Rev. Anticancer Ther.** v. 11, p. 725-37, 2011.

BRANNON-PEPPAS L, BLANCHETTE J.O. Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy. **Adv Drug Deliver Rev.** v. 56, p. 1649-59, 2004.

BRASSEUR F., COUVREUR P., KANTE B., DECKERS-PASSAU L., ROLAND M., ET AL. Actinomycin D adsorbed on polymethylcyanoacrylate nanoparticles: Increased efficiency against an experimental tumor. **Eur. J. Cancer.** v. 16, p. 1441-45, 1980.

BRIVIBA K., PAN L., RECHKEMMER G. Red wine polyphenols inhibit the growth of colon carcinoma cells and modulate the activation pattern of mitogen-activated protein kinases. **J. Nutr.** v. 132, p. 2814–2818, 2002.

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

BRUNET A, ROUX D, LENORMAND P. Nuclear translocation of p42/p44 mitogen-activated protein kinase is required for growth factor-induced gene expression and cell cycle entry. **Embo. J.** v. 18, p. 664–74, 1999.

BUGAJ A.M. Targeted photodynamic therapy -a promising strategy of tumor treatment. **Photochem. Photobiol. Sci.** v. 10 p. 1097-109, 2011.

Bulletin World Health Organization. v. 87, p. 574–577, 2009.

BURDA C., CHEN X., NARAYANAN R., EL-SAYED M.A. Chemistry and properties of nanocrystals of different shapes. **Chem. Rev.** v. 105, p. 1025-1102, 2005.

CAMERIN M., MAGARAGGIA M., SONCIN M., JORI G., MIGUEL MORENO M., ET AL. The in vivo efficacy of phthalocyanine–nanoparticle conjugates for the photodynamic therapy of amelanotic melanoma. **Eur. J. Cancer.** v. 46, p. 1910-18, 2010.

CARLSON J.A., ROSS J.S., SLOMINSKI A. Molecular diagnostics in melanoma. **J. Am. Acad. Dermatol.** v. 52, p. 743–75, 2005.

CARVALHO R.S. **Fototoxicidade de Nanoemulsões de Extrato de Crajiru (Arrabidaea chica) em Linhagem de Células de Adenocarcinoma Mamário murino (4T1).** 105f. Tese (Doutorado em Biologia Animal)- Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília.

CASTANO A.P., DEMIDOVA T.N., HAMBLIN M.R. Mechanisms in photodynamic therapy: Part three – Photosensitizer pharmacokinetics, biodistribution, tumor localization and modes of tumor destruction. **Photodiag. Photodyn. Ther.** v. 2, p. 91-106, 2005.

CHAMMAS R. Biologia do Câncer: uma breve introdução. In: P. M. G. Hoff; A. Katz; R. Chammas; V.Odone-Filho; Y.S. Novis. (Org.). Tratado de Oncologia. 1ed.São Paulo: Editora Atheneu. v. 1, p. 3-8, 2013.

CHAN W., MARSHALL J.F., LAM G.Y., HART I.R. Tissue uptake, distribution, and potency of the photoactivatable dye chloroaluminum sulfonated phthalocyanine in mice bearing transplantable tumors. **Cancer Res.** v. 48, p. 3040-4, 1988.

CHAN W., MARSHALL J.F., SVENSEN R., BEDWELL J., HART I.R. Effect of sulfonation on the cell and tissue distribution of the photosensitizer aluminum phthalocyanine. **Cancer Res.** v. 50; p. 4533-8, 1990.

CHATTERJEE D.K., ZHANG Y. Upconverting nanoparticles as nanotransducers for photodynamic therapy in cancer cells. **Nanomedicine.** p.73-82, 2008.

CHATTERJEE D.K., FONG L.S., ZHANG Y. Nanoparticles in photodynamic therapy: An emerging paradigm. **Adv. Drug Delivery Rev.** v. 60, p. 1627–1637, 2008.

CHEN J., SHAO R., ZHANG X.D., CHEN C. Applications of nanotechnology for melanoma treatment, diagnosis, and theranostics. **Int. J. Nanomedicine.** v. 8, p. 2677- 88, 2013.

CHEN K.G., LEAPMAN R.D., ZHANG G., LAI B., VALENCIA J.C. Influence of melanosome dynamics on melanoma drug sensitivity. **J. Natl. Cancer Inst.** v. 101, p. 1259-71, 2009.

CHEON J., LEE J.H. Synergistically integrated nanoparticles as multimodal probes for nanobiotechnology. **Acc Chem Res.** v. 41, p. 1630 – 1640, 2008.

CHIN Y.W., CHAI H.B., KELLER W.J., KINGHORN D. Lignans and Other Constituents of the Fruits of *Euterpe oleracea* (Açaí) with Antioxidant and Cytoprotective Activities. **J. Agric. Food Chem.** v. 56, p. 7759–7764, 2008.

CLARK W.H., ELDER D.E., GUERRY D. A study of tumor progression: the precursor lesions of superficial spreading and nodular melanoma. **Hum Pathol.** v. 15, p.1147–65, 1984.

COLDITZ G.A., WOLIN K.Y., GEHLERT S. Applying What We Know to Accelerate Cancer Prevention. **Sci. Transl. Med.** v. 4, 127rv4, P. 1-9, 2012.

COUVREUR P., GRISLAIN L., LENAERTS V., BRASSEUR F., GUIOT P. Polymeric Nanoparticles and Microspheres. CRC Press, Boca Raton, Florida, 1986.

CRNOLATAC I., HUYGENS A., AGOSTINIS P., KAMUHABWA A.R., MAES J., ET AL. In vitro accumulation and permeation of hypericin and lipophilic analogues in 2-D and 3-D cellular systems. **Int. J. Oncol.** v. 30, p. 319-24, 2007.

CUMMINS D.L., CUMMINS J.M., PANTLE H., SILVERMAN M.A., LEONARD A.L., ET AL. Cutaneous malignant melanoma. **Mayo Clin. Proc.** v. 81, n. 4, p. 500-507, 2006.

DABROWSKI J.M., KRZYKAWSKA M., ARNAUT L.G., PEREIRA M.M., MONTEIRO C.J., ET AL. Tissue uptake study and photodynamic therapy of melanoma-bearing mice with a nontoxic, effective chlorin. **Chem. Med. Chem.** v. 6, p. 1715-1726, 2011.

DAVIDS L.M., KLEEMANN B. The Menace of Melanoma: A Photodynamic Approach to Adjunctive Cancer Therapy. Chapter 22. **InTech.** 2013.

DAVIDS L.M., KLEEMANN B. Combating melanoma: The use of photodynamic therapy as a novel, adjuvant therapeutic tool. **Cancer Treat. Rev.** v. 37, p. 465–475, 2011.

DAVIES H., BIGNELL G.R., COX C., STEPHENS P., EDKINS S., ET AL. Mutations of the BRAF gene in human cancer. **Nature.** v. 417, p. 949–954, 2002.

DEMIERRE, M.F. Epidemiology and Prevention of Cutaneous Melanoma. **Curr. Treat. Options Oncol.** v. 7, p. 181-86, 2006.

DOUGHERTY T.J., GOMER C.J., HENDERSON B.W. Photodynamic therapy. **J. Natl. Cancer Inst.** v. 90, p. 889–905, 1998.

DOUGHERTY, T.J. A brief history of clinical photodynamic therapy development at Roswell Park. **Laser Med.** v.14, p. 219–221, 1996.

EBERMANN R., ALTH G., KREITNER M., KUBIN A. Natural products derived from plants as potential drugs for the photodynamic destruction of tumor cells. **J. Photoch. Photobio. B: Biology.** v. 36, p. 295–97, 1996.

- ELATTAR T.M., VIRIJI A.S. The effect of red wine and its components on growth and proliferation of human oral squamous carcinoma cells. **Anticancer Res.** v. 19, p. 5407–5414, 1999.
- ENGELAND M., NIELAND L.J.W., RAMAEKERS F.C.S., SCHUTTE B.; REUTELINGSPERGER C.P.M. Annexin V-Affinity assay: A review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. **Cytometry.** v. 31, p. 1–9, 1998.
- ESCOBAR P, HERNÁNDEZ IP, RUEDA CM, MARTÍNEZ F, PÁEZ E. Photodynamic activity of aluminium (III) and zinc (II) phthalocyanines in Leishmania promastigotes. **Biomedica.** v. 26, p. 49-56, 2006.
- FAVACHO H.A.S, OLIVEIRA B.R., SANTOS K.C., MEDEIROS B.J.L., SOUSA P.J.C., PERAZZO F.F., CARVALHO J.C.T. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of Euterpe oleracea oil. **Braz. J. Pharmacog.** v. 2, n. 1, p. 105-114, 2011.
- FERNANDEZ P., ANDRÉ V., RIEGER J., KUHNLE A. Nano-emulsion formation by emulsion phase inversion. **Colloids Surf. A: Physiochem. Eng. Aspects** v. 251, p. 53-58, 2004.
- FERRARI M., ROCHA-FILHO P.A. Multiple emulsions containing amazon oil: açai oil (Euterpe oleracea). **Braz. J. Pharmacog.** v. 21, 2011.
- FIDLER I., NICOLSON G.L. Organ selectivity for implantation survival an growth of B16 melanoma variant tumor lines. **J. Natl. Cancer Ins.** v. 57, p. 1199-1202, 1976.
- FORGIARINI A., ESQUENA J., GONZALEZ C., SOLANS C. Formation of nano-emulsions by low-energy emulsification methods at constant temperature. **Langmuir.** v. 17, p. 2076 – 2083, 2001.
- FORMAN S.B., FERRINGER T.C., PECKHAM S.J., DALTON SR., SASAKI GT. Is superficial spreading melanoma still the most common form of malignant melanoma? **J. Am. Acad. Dermatol.** v. 58: p. 1013-20, 2008.
- FRITSCH C., LANG K., NEUSE W., RUZICKA T., LEHMANN P.. Photodynamic diagnosis and therapy in dermatology. **Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.** v. 11, p. 358-73, 1998.
- FRYD M.M., MASON T.G. Advanced Nanoemulsions. **Annu. Rev. Phys. Chem.** v. 63, p. 493–518, 2012.
- GALLORI S., BILIA A. R., BERGONZI M. C., BARBOSA W.L.R., VINCIERI F.F. Polyphenolic constituents of fruit pulp of Euterpe oleracea Mart. (acai palm). **Chromatographia.** v. 59, p. 739–743, 2004.
- GHOLAM P., WEBERSCHOCK T., DENK K., ENK A. Treatment with 5-Aminolaevulinic Acid Methylester Is Less Painful than Treatment with 5-Aminolaevulinic Acid Nanoemulsion in Topical Photodynamic Therapy for Actinic Keratosis. **Dermatology.** v. 222, p. 358 – 62, 2011.

GIBSON S.L., HAVENS J.J., NGUYEN M.L., HILF R. Amino-levulinic acid-induced photodynamic therapy inhibits protoporphyrin IX biosynthesis and reduces subsequent treatment efficacy in vitro. **Br. J. Cancer.** v. 80, p. 998–1004, 1999.

Globocan 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. World Health Organization. Disponível em: http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx Acessado em: 15 Janeiro, 2014.

GRAY J., FULLARTON G. The current role of photodynamic therapy in oesophageal dysplasia and cancer. **Photodiagn. Photodyn. Ther.** v. 4, p. 151-9, 2007.

GRAY-SCHOPFER V., WELLBROCK C., MARAIS R. Melanoma Biology and new targeted therapy. **Nature.** v. 445, p. 851-857, 2007.

GUTIÉRREZ J.M., GONZÁLEZ C., MAESTRO A., SOLÈ I., PEY C.M., NOLLA J. Nano-emulsions: New applications and optimization of their preparation. **Curr. Opin. Colloid Interface Sci.** v. 13 p. 245–251, 2008.

GUYON L., ASCENCIO M., COLLINET P., MORDON S. Photodiagnosis and photodynamic therapy of peritoneal metastasis of ovarian cancer. **Photodiagn. Photodyn. Ther.** v. 9, p. 16-31, 2012.

HADDAD R., BLUMENFELD A., SIEGAL A. In vitro and in vivo effects of photodynamic therapy on murine malignant melanoma. **Ann. Surg. Oncol.** v. 5, p. 241-247, 1998.

HEINRICH M., DHANJI T., CASSELMAN I. Açai (EuterpeoleraceaMart.)-A phytochemical and pharmacological assessment of the species' health claims. **Phytochem. Lett.** v. 4 p. 10–21, 2011.

HENDERSON B.W., BUSCH T.M., SNYDER J.W. Fluence Rate as a Modulator of PDT Mechanisms. **Lasers Surg. Med.** v. 38, p. 489–493, 2006.

HERNÁNDEZ I.P., MONTANARI J., VALDIVIESO W., MORILLA M.J., ROMERO E.L., ESCOBAR P. In vitro phototoxicity of ultradeformable liposomes containing chloroaluminum phthalocyanine against New World Leishmania species. **J. Photochem. Photobiol. B.** v. 117, p. 157-63, 2012.

HEUKERS R., HENEGOUWEN P.M.P.B., OLIVEIRA S. Nanobody–photosensitizer conjugates for targeted photodynamic therapy. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine.** In Press, Uncorrected Proof, 2014.

HO YF., WU M.H., CHENG B.H., CHEN Y.W., SHIH M.C. Lipid-mediated preferential localization of hypericin in lipid membranes. **Biochim. Biophys Acta.** v. 1788, p. 1287 – 95, 2009.

HU L.; WU X.; SONG Y.; YOUNG L.H.; GRAGOUDAS E.S. Photodynamic therapy of pigmented choroidal melanomas in rabbits. **Zhonghua Yan Ke Za Zhi,** v. 38, p. 491-494, 2002.

HUANG P., XU C., LIN J., WANG C., WANG X., ET AL. Folic Acid-conjugated Graphene Oxide loaded with Photosensitizers for Targeting Photodynamic Therapy. **Theranostics** v. 1, p. 240–250, 2011.

HUANG Z., XU H., MEYERS D.A., MUSANI A.I., WANG L., ET AL. Photodynamic therapy for treatment of solid tumors – potential and technical challenges. **Technol Cancer Res Treat.** v. 7, p. 309–320, 2008.

HUANG Y.Y., CHEN A.C.H., CARROLL J.D., HAMBLIN M.R. Biphasic dose response in low level light therapy. **Formerly Nonlinearity in Biology, Toxicology, and Medicine**, v. 7, p. 358–383, 2009.

IKRAMA M., KHANB R.U., FIRDOUS S., ATIF M., NAWAZC M. Photodynamic Therapy of Non Melanoma Skin Cancers. **Laser Physics.** v. 21, n. 2, p. 427–433, 2011.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER José Alencar Gomes da Silva (INCA). Estimativa 2014: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro (2014).

IZQUIERDO P., ESQUENA J., DEDEREN C., GARCIA- CELMA M.J., AZEMAR N. Formation and stability of nano-emulsions prepared using the phase inversion temperature method. **Langmuir.** v. 18, p. 26–30, 2002.

JAMES W.D., BERGER T.G, ELSTON D.M. Andrew's Diseases of the Skin, Clinical Dermatology. Chapter 30. Melanocytic Nevi and Neoplasms. 11^a Edição. China: Elsevier, Inc., 2011.

JHAPPAN C., NOONAN FP., MERLINO G. Ultraviolet radiation and cutaneous malignant melanoma. **Oncogene.** v. 22, p. 3099–3112, 2003.

JIA X.; JIA L. Nanoparticles Improve Biological Functions of Phthalocyanine Photosensitizers Used for Photodynamic Therapy. **Curr. Drug Metab.** v. 13, p. 1119–22, 2012.

JONG W.W.; TAN P.J.; KAMARULZAMAN F.A.; MEJIN M.; LIM D.; ANG I.; NAMING M.; YEO T.C.; HO A.S.H.; TEO S.H.; LEE A.B. Photodynamic Activity of Plant Extracts from Sarawak, Borneo. **Chemistry & Biodiversity.** v. 10, p.1475–1486, 2013.

JORI G. Tumour photosensitizers: approaches to enhance the selectivity and efficiency of photodynamic **J. Photochem. Photobiol. B: Biol.** v. 36, p. 87 – 93, 1996.

JUARRANZ A., JAEN P., SANZ-RODRIGUEZ F. Photodynamic therapy of cancer. Basic principles and applications. **Clin. Transl. Oncol.** v. 10, p.148–54, 2008.

KANG J., XIE C., LI Z., NAGARAJAN S., SCHAUSS A.G., ET AL. Flavonoids from acai (*Euterpe oleracea* Mart.) pulp and their antioxidant and anti-inflammatory activities. **Food Chem.**, v. 128, p. 152–157, 2011.

KANO A, TANIWAKI Y, NAKAMURA I, SHIMADA N, KENJI MORIYAMA K,

ET AL. Tumor delivery of Photofrin® by PLL-g-PEG for photodynamic therapy. **J. Control. Release.** v. 167, p. 315-21, 2013.

PASSOS S.K., SOUZA P.E.N., SOARES P.K.P., EID D.R.M., PRIMO F.L., ET AL. Quantitative approach to skin field cancerization using a nanoencapsulated photodynamic therapy agent: a pilot study. **Clin. Cosmet. Investig. Dermatol.** v. 6, p. 51-59, 2013.

KÄSTLE M., GRIMM S., NAGEL R., BREUSING N., GRUNE T. Combination of PDT and inhibitor treatment affects melanoma cells and spares keratinocytes. **Free Radic. Biol. Med.** v. 50, p. 305-12. 2011.

KATIPAMULA R., MARKOVIC S.N. Emerging therapies for melanoma. **Expert Rev. Anticancer Ther.** v. 8, p. 553-60, 2008.

KATO H., HARADA M., ICHINOSE S., USUDA J., TSUCHIDA T., ET AL. Photodynamic therapy (PDT) of lung cancer: experience of the Tokyo Medical University. **Photodiagn. Photodyn. Ther.** v. 1, p. 49-55, 2004.

KAWCZYK-KRUPKA A., BUGAJ A.M., LATOS W., ZAREMBA K., SIERÓN A. Photodynamic therapy in treatment of cutaneous and choroidal melanoma. **Photodiagnosis Photodyn Ther.** v. 10, p. 503-09, 2013.

KESSEL D., LUO Y. Mitochondrial photodamage and PDT-induced apoptosis. **J. Photochem. Photobiol. B: Biol.** v. 42, p. 89-95, 1998.

KIM S.A., LEE K.S., CHO J.W. Photodynamic therapy combined with cryotherapy for the treatment of nodular basal cell carcinoma. **Oncol Lett.** v. 6, p. 939-41, 2013.

KOCH S.E., LANGE J.R. Amelanotic melanoma: The great masquerader. **J. Am. Acad. Dermatol.** v. 42: p. 731-4, 2000.

KOLAROVA H., NEVRELOVA P., BAJGAR R.; JIROVA D., KEJLOVA K.; STRNAD, M. In vitro photodynamic therapy on melanoma cell lines with phthalocyanine. **Toxicol. in Vitro.** v. 21, n. 2, p. 249-253, 2007.

KONAN Y.N., GURNY R., ALLÉMANN E. State of the art in the delivery of photosensitizers for photodynamic therapy. **J. Photochem. Photobiol. B: Biol.** v. 66, n. 2, p. 89-106, 2002.

KREUTER J. Nanoparticles - a historical perspective. **Int. J. Pharm.** v. 331, p. 1-10, 2007.

LANGMACK K., MEHTA R., TWYMAN P., NORRIS P. Topical photodynamic therapy at low fluence rates--theory and practice. **J. Photochem. Photobiol. B: Biol.** v. 60, p. 37-43 2001.

LICHTENTHÄLER R.; RODRIGUES R. B.; MAIA J. G.; PAPAGIANNPOULOS M.; FABRICIUS, H.; MARX F. Total oxidant scavenging capacities of Euterpe oleracea Mart. (Açaí) fruits. **Int. J. Food Sci. Nutr.** v. 56, p. 53-64, 2005.

LIMA A.M., PIZZOL C.D., MONTEIRO F.B.F., CRECZYNSKI-PASA T.B.,

ANDRADE G.P., ET AL. Hypericin encapsulated in solid lipid nanoparticles: Phototoxicity and photodynamic efficiency. **J. Photochem. Photobiol. B: Biol.** v. 125, p. 146-154, 2013.

LIN A.W., BARRADAS M., STONE J.C. Premature senescence involving p53 and p16 is activated in response to constitutive MEK/MAPK mitogenic signaling. **Genes Dev.** v. 12, p. 3008–19, 1998.

LONGO J.P.F., LOZZI S.P., SIMIONI A.R., MORAIS P.C., TEDESCO A.C., ET AL. Photodynamic therapy with aluminum-chloro-phthalocyanine induces necrosis and vascular damage in mice tongue tumors. **J. Photochem. Photobiol. B: Biol.** v. 94, p.143-6, 2009.

MA L.W., NIELSEN K.P., IANI V., MOAN J. A New Method for Photodynamic Therapy of Melanotic Melanoma-Effects of Depigmentation with Violet Light Photodynamic Therapy. **J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.** v. 26, p. 165-72, 2007.

MACHADO, A.C. **Desenvolvimento e avaliação da incorporação e liberação de óleo de açaí em hidrogéis de poli (N-vinil-2-pirrolidona)**. 125f. Dissertação (Mestrado em Ciências na Area de Tecnologia Nuclear-Materiais). Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo.

MADURAY K., ODHAV B., NYOKONG T. In vitro photodynamic effect of aluminum tetrasulfophthalocyanines on melanoma skin cancer and healthy normal skin cells. **Photodiagn. Photodyn. Ther.** v. 9, n. 1, p. 32–39, 2012.

MADURAY K., KARSTEN A., ODHAV, B., NYOKONG T. In vitro toxicity testing of zinc tetrasulfophthalocyanines in fibroblast and keratinocyte cells for the treatment of melanoma cancer by photodynamic therapy. **J. Photochem. Photobiol. B: Biol.** v. 103, n. 2, p. 98–104, 2011.

MAMOON A.M., GAMAL–ELDEEN A.M., RUPPEL M.E., SMITH R.J., TSANG T., MILLER L.M. In vitro efficiency and mechanistic role of indocyanine green as photodynamic therapy agent for human melanoma. **Photodiagn. Photodyn. Ther.** v. 6, n. 2, p. 105–116, 2009.

MANG T.S. Dosimetric concepts for PDT. **Photodiagn. Photodyn. Ther.** v. 5, p. 217-223, 2008.

MARTÍNEZ C.C., ORTEGA V.V., GASCÓN M.J., ALCARAZ B.M., BENAVENTE-GARCÍA O., ET AL. Treatment of metastatic melanoma B16F10 by the flavonoids tangeretin, rutin, and diosmin. **J. Agric. Food. Chem.** v. 53, p. 6791-7, 2005.

MASTER A.M., QI Y., OLEINICK N.L., GUPTA A.S. EGFR-mediated intracellular delivery of Pc 4 nanoformulation for targeted photodynamic therapy of cancer: in vitro studies. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine.** v. 8, p. 655-64, 2012.

MATSUMURA Y., MAEDA H.A. New concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: Mechanisms of tumoritropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. **Cancer Res.** v. 46, p. 6387-6392, 1986.

- MCCLEMENTS D.J. Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences, and similarities. **Soft Matter**. v. 8, p. 1719-1729, 2012.
- MERTENS-TALCOTT S.U., LEE J., PERCIVAL S.S., TALCOTT S.T. 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.** v. 54, p. 5336–5343, 2006.
- MIHAJLOVIC M., VLAJKOVIC S., JOVANOVIC P., STEFANOVIC V. Primary mucosal melanomas: a comprehensive review. **Int. J. Clin. Exp. Pathol.** v. 5, p. 739–53, 2012.
- MILLER A.J. e MIHM M.C. Melanoma. **N. Engl. J. Med.** v. 355, p. 51-65, 2006.
- MITRA A., STABLES GI. Topical photodynamic therapy for non-cancerous skin conditions. **Photodiagn. Photodyn. Ther.** v. 3, p. 116-27, 2006.
- MONGE-FUENTES V., GARCIA M.P., TAVARES M.C., VALOIS C.R., LIMA E.C., ET AL. Biodistribution and biocompatibility of DMSA-stabilized maghemite magnetic nanoparticles in nonhuman primates (*Cebus spp.*). **Nanomedicine**. v. 6, p. 1529-44, 2011.
- MORTON C.A., BROWN S.B., COLLINS S., IBBOTSON S., JENKINSON H., ET AL. Guidelines for topical photodynamic therapy: report of a workshop of the British Photodermatology Group. **Br. J. Dermatol.** v. 146, p. 552–567, 2002.
- MOSMANN T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods**. v. 65, p. 55-63, 1983.
- MOUAWAD R., SEBERT M., MICHELS J., BLOCH J., SPANO J.P., ET AL. Treatment for metastatic malignant melanoma: Old drugs and new strategies. **Crit. Rev. Oncol. Hematol.** v. 74, p. 27–39, 2010.
- MROZ P., YAROSLAVSKY A., KHARKWAL G.B., HAMBLIN M.R. Cell Death Pathways in Photodynamic Therapy of Cancer. **Cancers**. v. 3, p. 2516-2539, 2011.
- MUEHLMANN L.A., MA B.C., LONGO J.P.F., ALMEIDA SANTOS M.F.M., AZEVEDO R.B. Aluminum–phthalocyanine chloride associated to poly(methyl vinyl ether-co-maleic anhydride) nanoparticles as a new third-generation photosensitizer for anticancer photodynamic therapy. **Int. J. Nanomedicine**. v. 9, p. 1199 – 1213, 2014.
- MUN S., DECKER E.A., MCCLEMENTS D.J. Influence of Droplet Characteristics on the Formation of Oil-in-Water Emulsions Stabilized by Surfactant-Chitosan Layers. **Langmuir**. v. 21, 6228-6234, 2005.
- MUTHUSAMY V., DURAISAMY S., BRADBURY M.C., HOBBS C., CURLEY D.P., ET AL. Epigenetic Silencing of Novel Tumor Suppressors in Malignant Melanoma. **Cancer Res**. v. 66, p. 11187, 2006.
- NASCIMENTO R.J.S., COURI S., FANTONIASSI R., FRETAS S.P. Composição em ácidos graxos do óleo da polpa de açaí extraído com enzimas e com hexano. **Rev. Bras. Frutic.** v. 30, 2008.

NEUBERGER T., SCHÖPF B., HOFMANN H., HOFMANN M., RECHENBER B. Superparamagnetic nanoparticles for biomedical applications: possibilities and limitations of a new drug delivery system. **J. Magn. Magn. Mater.** v. 293, p. 483-96, 2005.

NICHOLL M.B., ELASHOFF D., DAVE S.B., HOON D.S.B. Molecular Upstaging Based on Paraffin-embedded Sentinel Lymph Nodes Ten-Year Follow-up Confirms Prognostic Utility in Melanoma Patients. **Ann. Surg.** v. 253, p. 116–122, 2011.

NIGHSWANDER-REMPEL S.P., RIESZ J., GILMORE J., BOTHMA J.P., MEREDITH P. Quantitative Fluorescence Excitation Spectra of Synthetic Eumelanin. **J. Phys. Chem. B.** v. 109, p. 20629–35, 2005.

ONG C.Y., LING S.K., ALI R.M., CHEE C.F., SAMAH Z.A., HO A.S.H.H., TEO H.S., LEE H.B. Systematic analysis of in vitro photo-cytotoxic activity in extracts from terrestrial plants in Peninsula Malaysia for photodynamic therapy. **J. Photochem. Photobiol. B: Biol.** v. 96, p. 216-222, 2009.

OZLER S.A., NELSON J.S., LIGGETT P.E., de QUEIROZ J.M. JR., BERNS M.W. Photodynamic therapy of experimental subchoroidal melanoma using chloroaluminum sulfonated phthalocyanine. **Arch. Ophthalmol.** v. 110, p. 555-561, 1992.

PACHECO-PALENCIA L.A., TALCOTT S.T., SAFE S., MERTENS-TALCOTT S. Absorption and Biological Activity of Phytochemical-Rich Extracts from Açai (Euterpe oleracea Mart.) Pulp and Oil in Vitro. **J. Agric. Food Chem.** v. 56, p. 3593–3600, 2008.

PACHECO-PALENCIA L.A., HAWKEN P., TALCOTT S.T. Phytochemical oxidant and pigment stability of açai (Euterpe oleracea Mart.) as affected by clarification, ascorbic acid fortification and storage. **Food Res. Int.** v. 40, p. 620-628, 2007.

PANAGOPOULOS J.A., SVITRA P.P., PULIAFITO C.A., GRAGOUDAS E.S. Photodynamic therapy for experimental intraocular melanoma using chloroaluminum sulfonated phthalocyanine. **Arch. Ophthalmol.** v.107, p. 886-890, 1989.

PASS H.I. Photodynamic therapy in oncology: mechanisms and clinical use. **J. Natl. Cancer Inst.** v. 85, p. 443–456, 1993.

PASZKO E.; EHRHARDT C.; SENGE MO.; KELLEHER DP.; REYNOLDS JV.; Nanodrug applications in photodynamic therapy. **Photodiagn Photodyn Ther.** v. 8, p. 14-29, 2011.

PEEVA M., SHOPOVA M., STOICHKOVA N., MICHAILOV N., WOEHRLE D., ET AL. Comparative photodynamic therapy of B16 pigmented melanoma with different generations of sensitizers. **J. Porphyr. Phthalocyanines.** v. 3: p. 380-7, 1999.

PFAFFEL-SCHUBART G., RÜCK A., SCALFI-HAPP C. Modulation of cellular Ca²⁺-signaling during hypericin-induced photodynamic therapy (PDT). **Medical Laser Application.** v. 21, p. 61-66, 2005.

PIETTE J., VOLANTI C., VANTIEGHEM A., MATROULE J.Y., HABRAKEN Y., AGOSTINIS P. Cell death and growth arrest in response to photodynamic therapy with membrane-bound photosensitizers. **Biochem. Pharmacol.** v. 66, p. 1651–1659, 2003.

PLAETZER K., KRAMMER B., BERLANDA J., BERR F., KIESSLICH T. Photophysics and photochemistry of photodynamic therapy: fundamental aspects. **Laser Med. Sci.** v. 24, p. 259-268, 2009.

Portal de Cancer. ORGANIZACIÓN PANAMERICANA PARA LA SALUD. Disponível em http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=category&id=1866&layout=blog&Itemid=3855&lang=es. Acessado em: 22 Janeiro, 2014.

POZO-INSFRAN D., BRENES C.H., TALCOTT S.T. Phytochemical Composition and Pigment Stability of Açai (*Euterpe oleracea* Mart.). **J. Agric. Food Chem.** v. 52, 1539–1545, 2004.

PRIMO F.L., MACAROFF P.P., LACAVALA Z.G.M., AZEVEDO R.B., MORAIS P.C., ET AL. Binding and photophysical studies of biocompatible magnetic fluid in biological medium and development of magnetic nanoemulsion: A new candidate for cancer treatment. **J. Magn. Magn. Mater.** v. 310: p. 2838-40, 2007.

PRIMO F.L., RODRIGUES M.M.A., SIMIONI A.R., LACAVALA Z.G.M., MORAIS P.C., ET AL. Photosensitizer-Loaded Magnetic Nanoemulsion for Use in Synergic Photodynamic and Magnetohyperthermia Therapies of Neoplastic Cells. **J. Nanosci. Nanotechnol.** v. 8, p. 5873-7, 2008.

ROBARDS K., PRENZLER P.D., TUCKER G., SWATSITANG P., GLOVER W. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. **Food Chem.** v. 66, p. 401–436, 1999.

RODRIGUES R., LICHTENTHÄLER, R., ZIMMERMANN B.; PAPAGIANNOPOULOS M., FABRICIUS H., ET AL. Total oxidant scavenging capacity of *Euterpe oleracea* Mart. (açai) seeds and identification of their polyphenolic compounds. **J. Agric. Food Chem.** v. 54, p. 4162-4167, 2006.

RODRÍGUEZ-DELGADO M.A., MALOVANA S., PEREZA J.P., BORGESA T., MONTELONGO F.J.G. Separation of phenolic compounds by high-performance liquid chromatography with absorbance and fluorimetric detection. **J. Chromatogr. A.** v. 912, p. 249–257, 2001.

ROOZEBOOM M.H., AARDOOM M.A., NELEMANS P.J., THISSEN M.R., KELLENNERS-SMEETS ET AL. Fractionated 5-aminolevulinic acid photodynamic therapy after partial debulking versus surgical excision for nodular basal cell carcinoma: a randomized controlled trial with at least 5-year follow-up. **J. Am. Acad Dermatol.** v. 69, p. 280-7, 2013.

ROSA, F.S.; BENTLEY, V.L.B. Photodynamic Therapy of Skin Cancers: Sensitizers, Clinical Studies and Future Directives. **Pharmaceutical Research.** V. 17, n. 12, p. 1447-1455, 2000.

ROSSO V.V., HILLEBRAND S., MONTILLA E.C., BOBBIO F.O., WINTERHALTER P., MERCADANTE A.Z. Determination of anthocyanins from acerola (*Malpighia emarginata* DC.) and açai (*Euterpe oleracea* Mart.) by HPLC-PDA-MS/MS. **J. Food Compos. Anal.** v. 21, p. 291–299, 2008.

RUDDON R. Cancer Biology. 4th Ed. New York: Oxford University Press. 530 p. 2007.

SAHAY G., ALAKHOVA D.Y., KABANOV A.V. Endocytosis of nanomedicines. **J. Control. Release.** v.145, p. 182–195, 2010.

SALDANHA G., POTTER L., DAFORNO P. Cutaneous melanoma subtypes show different BRAF and NRAS mutation frequencies. **Clin. Cancer Res.** v. 12, p. 4499–505, 2006.

SCHADENDORF, D. Gene-based therapy of malignant melanoma. **Semin. Oncol.** v. 29, n. 5, p. 503–512, 2002.

SCHAUSS A.G., WU X., PRIOR R.L., OU B., PATEL D., ET AL. Phytochemical and nutrient composition of the freeze-dried amazonian palm berry, *Euterpe oleracea* Mart. (acai). **J. Agric. Food Chem.** v. 54, p. 8598–8603, 2006.

SCHUH J.C.L. Trials, Tribulations, and Trends in Tumor Modeling in Mice. **Toxicol. Pathol.** v. 32, p. 53–66, 2004.

SHAH P., BHALODIA D., SHELAT P. Nanoemulsions: A pharmaceutical review. **Syst. Rev. Pharm.** v. 1, p. 24–32, 2010.

SHAH J., PARK S., AGLYAMOV S., LARSON T., MA L., ET AL. Photoacoustic imaging and temperature measurement for photothermal cancer therapy. **J. Biomed. Opt.** v.13, p. 034024–034024–9, 2008.

SHARMA K.V., BOWERS N., DAVIDS L.M. Photodynamic therapy-induced killing is enhanced in depigmented metastatic melanoma cells. **Cell Biol. Int.** v. 35, p. 939–44, 2011.

SHARMA K.V., DAVIDS L.M. Depigmentation in melanomas increases the efficacy of hypericin-mediated photodynamic-induced cell death. **Photodiagn. Photodyn. Ther.** v. 9, p. 156–163, 2012.

SHARMAN W.M., ALLEN C.M., VAN LIER J.E. Photodynamic therapeutics: basic principles and clinical applications. **Drug Discov. Today.** v. 4, p. 507–517, 1999.

SHAW B.L., BATTLE H.I. The gross and microscopic anatomy of the digestive tract of the oyster. **Can. J. Zool.** v. 35, p. 325–347, 1957.

SHINODA K., SAITO H. The stability of O/W type emulsions as functions of temperature and the HLB of emulsifiers: the emulsification by PIT-method. **J. Colloid. Interface Sci.** v. 30, p. 258–63, 1969.

SHOKROLLAHI K., JAVED M., AEUYUNG K., GHATTAURA A., WHITAKER IS., ET AL. Combined Carbon Dioxide Laser with Photodynamic Therapy for

Nodular and Superficial Basal Cell Carcinoma: Almost Scarless Cure With Minimal Recurrence. **Ann. Plast. Surg.** 2013 [Epub ahead of print].

SIEGEL R., MA J., ZOU Z., JEMAL A. Cancer Statistics 2014. **CA Cancer J. Clin.** v. 64, p. 9-29, 2014.

SINGH A.D., DAMATO B.E., PEER J., MURPHREE A.L., PERRY J.D. Clinical Ophthalmic Oncology. Chapter 35. Uveal Malignant Melanoma: Epidemiologic Aspects. Elsevier, 2007.

SINGH R, LILLARD JW. Nanoparticle-based targeted drug delivery. **Exp. Mol. Pathol.** v. 86, p. 215-23, 2009.

Skin cancers. World Health Organization. Disponível em URL: <http://www.who.int/uv/faq/skincancer/en/index1.html>. Acessado em: 15 Janeiro, 2014.

SLOMINSKI A., TOBIN D.J., SHIBAHARA S., WORSTMAN J. Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation. **Physiol. Rev.** v. 84, p. 1155-1228, 2004.

SOARES M.V., OLIVEIRA M.R., SANTOS E.P., GITIRANA L.B., BARBOSA G.M., QUARESMA C.H., RICCI-JÚNIOR E. Nanostructured delivery system for zinc phthalocyanine: preparation, characterization, and phototoxicity study against human lung adenocarcinoma A549 cells. **Int. J. Nanomedicine.** v. 6, p. 227-238, 2011.

SOLÈ I., SOLANS C., MAESTRO A., GONZALEZ C., GUTIERREZ JM. Study of nano-emulsion formation by dilution of microemulsions. **J. Colloid Interface Sci.** v. 376, p. 133–139, 2012.

SOLÈ I., PEY C.M., MAESTRO A., GONZÁLEZ C., PORRAS M., SOLANS C., GUTIÉRREZ JM. Nano-emulsions prepared by the phase inversion composition method: Preparation variables and scale up. **J. Colloid Interface Sci.** v. 344, p. 417–423, 2010.

SONNEVILLE-AUBRUN O., SIMONNET T., L'ALLORET F. Nanoemulsions: a new vehicle for skincare products. **Adv. Colloid Interface Sci.** v. 108–109, p. 145–149, 2004.

SOUZA C.S., FELICIO L.B., FERREIRA J., KURACHI C., BENTLEY M.V., ET AL. Long-term follow-up of topical 5-aminolaevulinic acid photodynamic therapy diode laser single session for non-melanoma skin cancer. **Photodiagn. Photodyn. Ther.** v. 6, p. 207-13, 2009.

SPILLER W., KLIESCH H., WOHRLE D., HACKBARTH S., RODER B., ET AL. Singlet oxygen quantum yields of different photo-sensitizers in polar solvents and micellar solutions. **J. Phorphyr. Phtalocya.** v. 2, p. 145-158, 1998.

SZEIMIES R.M. e KARRER, S.A. Photodynamic therapy with topical application of 5-aminolevulinic acid in the treatment of actinic keratoses: an initial clinical study. **Dermatology.** v. 192, p. 246– 251, 1996.

TAMMELA T., SAARISTO A., HOLOPAINEN T., YLÄ-HERTTUALA S., ANDERSSON L.C., ET AL. Photodynamic Ablation of Lymphatic Vessels and Intralymphatic Cancer Cells Prevents Metastasis. **Sci. Transl. Med.** v. 3, p. 69ra11, 2011.

TAPAJÓS E.C.C., LONGO J.P., SIMIONI A.R., LACAVA Z.G.M., SANTOS M.F.M.A. In vitro photodynamic therapy on human oral keratinocytes using chloroaluminum-phthalocyanine. **Oral Oncol.** v. 44, p. 1073-1079, 2008.

TAQUET J.P., FROCHOT C., MANNEVILLE V.; BARBERI-HEYOB M. Phthalocyanines covalently bound to biomolecules for a targeted photodynamic therapy. **Curr. Med. Chem.** v.14, p. 1673-87, 2007.

THEODOSSIOU T.A., HOTHERSALL J.S., DE WITTE P.A., PANTOS A., AGOSTINIS P. The multifaceted photocytotoxic profile of hypericin. **Mol. Pharm.** v. 6, p. 1775 – 89, 2009.

THIERRY B. Drug Nanocarriers and Functional Nanoparticles: Applications in Cancer Therapy. **Curr. Drug Deliv.** v. 6, p. 391-403, 2009.

TOMIC, T., BOTTON, T.; CEREZO, M.; ROBERT, G.; LUCIANO, F.; ET AL. Metformin inhibits melanoma development through autophagy and apoptosis mechanisms. **Cell Death Dis.** v. 2, p. e199, 2011.

TORCHILIN V.P. Targeted Pharmaceutical Nanocarriers for Cancer Therapy and Imaging. **AAPS J.** v. 92, p. E128–E147. 2007.

Transplantation mouse models. National Institutes of Health (NIH) [citado em: 24 de abril, 2014 19:31 h]. Disponível em URL: <http://emice.nci.nih.gov/aam/mouse/transplantation-mouse-models-1>

TUCKER M.A., GOLDSTEIN A.M. Melanoma etiology: where are we? **Oncogene.** v.22, p. 3042-3052, 2003.

UMEDA M., TSUNO A., OKAGAMI Y., TSUCHIYA F., IZUMI Y., ET AL. Bactericidal effects of a high-power, red light-emitting diode on two periodontopathic bacteria in antimicrobial photodynamic therapy in vitro. **J. Investig. Clin. Dent.** v. 2, p. 268–274, 2011.

VANTIRGHEM A., XU Y., DECLERCQ W., VANDENABEELE P., DENECKER G., ET AL. Different pathways mediate cytochrome c release after photodynamic therapy with Hypericin. **Photochem. Photobiol.** v. 74, p. 133-142, 2001.

VARNES M.E., CHIU S.M., XUE L.Y., OLEINICK N.L. Photodynamic therapy induced apoptosis in lymphoma cells: Translocation of cytochrome c causes inhibition of respiration as well as caspase activation. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v. 255, p. 673-679, 1999.

VERMES I., HAANEN C., STEFFENS-NAKKEN H., REUTELINGSPERGER C.A. novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labeled annexin V. **J. Immunol. Methods.** v. 184, p. 39–51, 1995.

VINCK E.M., CAGNIE B.J., CORNELISSEN M.J., DECLERCQ H.A., CAMBIER D.C. Increased fibroblast proliferation induced by light emitting diode and low power laser irradiation. **Lasers Med. Sci.** v. 18, p. 95-99, 2003.

WHITEMAN D.C., PAVAN W., BASTIAN B.C. The melanomas: a synthesis of epidemiological, clinical, histopathological, genetic, and biological aspects, supporting distinct subtypes, causal pathways, and cells of origin. **Pigm. Cell Melanoma R.** v. 24, p. 879–897, 2011.

WILSON B.C., PATTERSON M.S., BURNS D.M. Effect of photosensitizer concentration in tissue on the penetration depth of photoactivating light. **Lasers Med. Sci.** v. 1, p. 235-244, 1986.

WISEMAN H., HALLIWELL B. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species : role in inflammatory disease and progression to cancer. **Biochem. J.** v. 313, p. 17 -29, 1996.

YANO S., HIROHARA S., OBATA M., HAGIYA, Y., OGURA S., ET AL. Current states and future views in photodynamic therapy. **J. Photochem. Photobio. C: Photochem. Rev.** v. 12, p. 46-67, 2011.

YOON H.Y., KOO H., CHOI K.Y., LEE S.J., KIM K., ET AL. Tumor-targeting hyaluronic acid nanoparticles for photodynamic imaging and therapy. **Biomaterials.** v. 33, p. 3980-9, 2012.

ZAIDI N., LUPIEN L., KUEMMERLE N.B., KINLAW W.B., SWINNEN J.V., SMANS K. Lipogenesis and lipolysis: The pathways exploited by the cancer cells to acquire fatty acids. **Prog. Lipid Res.** v. 52, p. 585–589, 2013.

ZBYTEK B., CARLSON J.A., GRANESE J. Current concepts of metastasis in melanoma. **Expert Rev Dermatol.** v. 3, p. 569–85, 2008.

ZHANG K.M., YU H.J., SHI K., ZHOU Y.H., YU J.Q., XIA J. Photoprotective roles of anthocyanins in *Bergonia semperflorens*. **Plant Sci.** v. 179, p. 202-208, 2010.

ZHANG L., XING D., GAO X., WU S. Low-power laser irradiation promotes cell proliferation by activating PI3K/Akt pathway. **J. Cell Physiol.** v. 219, p. 553-562, 2009.

ZHAO B., YIN J.J., BILSKI P.J., CHIGNELL C.F., ROBERTS J.E., ET AL. Enhanced photodynamic efficacy towards melanoma cells by encapsulation of Pc4 in silica nanoparticles. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** v. 24, p. 163-72, 2009.

ZHAO B., HE Y.Y. Recent advances in the prevention and treatment of skin cancer using photodynamic therapy. **Expert Rev. Anticancer Ther.** v. 10, p. 1797–1809, 2010.

10. ANEXO

Declaração do Comitê de Ética no uso Animal (CEUA)



Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Comitê de Ética no Uso Animal

Brasília, 21 de junho de 2013.



DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado **"TERAPIA FOTODINÂMICA MEDIADA POR FOTOSSENSIBILIZANTE À BASE DE EXTRATOS NATURAIS EM NANOEMULSÃO PARA O TRATAMENTO DE MELANOMA IN VITRO E IN VIVO."**, UnBDOC n.º 66314/2013, sob responsabilidade do Professor Ricardo Bentes de Azevedo foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.



Prof. Fernando Pacheco Rodrigues
Coordenador da CEUA