



**INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE TECNOLOGIA,
INFRAESTRUTURA E TERRITÓRIO**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
INTERDISCIPLINAR EM ENERGIA E
SUSTENTABILIDADE**

**BACTERIOCLORINA ENCAPSULADA EM LIPOSSOMA:
Inativação de células tumorais utilizando Terapia Fotodinâmica**

PRISCILA ROMERO MAZZINI PEREIRA

Foz do Iguaçu
2025



**INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE
TECNOLOGIA, INFRAESTRUTURA E
TERRITÓRIO**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
INTERDISCIPLINAR EM ENERGIA E
SUSTENTABILIDADE**

**BACTERIOCLORINA ENCAPSULADA EM LIPOSSOMA:
Inativação de células tumorais utilizando Terapia Fotodinâmica**

PRISCILA ROMERO MAZZINI PEREIRA

Tese de Doutorado apresentado ao Programa de Pós-Graduação Interdisciplinar em Energia e Sustentabilidade da Universidade Federal da Integração Latino-Americana.

Orientador: Prof^a Dr^a Marciana Pierina Uliana Machado
Coorientador: Prof^o Dr^o Jorge Luis María Ruiz

Foz do Iguaçu
2025

Catálogo elaborado pelo Setor de Tratamento da Informação
Catálogo de Publicação na Fonte. UNILA - BIBLIOTECA LATINO-AMERICANA - CENTRAL

P436

Pereira, Priscila Romero Mazzini.

Bacterioclorina encapsulada em lipossoma: inativação de células tumorais utilizando terapia fotodinâmica / Priscila Romero Mazzini Pereira. - Foz do Iguaçu, 2025.

77 f.: il.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal da Integração Latino-Americana. Instituto Latino-Americano de Tecnologia, Infraestrutura e Território. Programa de Pós-Graduação Interdisciplinar em Energia e Sustentabilidade. Foz do Iguaçu-PR, 2025.

Orientador: Marciana Pierina Uliana Machado.

Coorientador: Jorge Luis María Ruiz.


1. Lipossomas. 2. fotossintetizantes. 3. Fotoquimioterapia. 4. Câncer. 5. Morte celular. I. Machado, Marciana Pierina Uliana. II. Ruiz, Jorge Luis María. III. Título.

CDU 615.285

BACTERIOCLORINA ENCAPSULADA EM LIPOSSOMA: Inativação de células tumorais utilizando Terapia Fotodinâmica


Tese de Doutorado apresentado ao Programa de Pós-Graduação Interdisciplinar em Energia e Sustentabilidade do Instituto Latino-Americano de Tecnologia, Infraestrutura e Território da Universidade Federal da Integração Latino-Americana, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Energia e Sustentabilidade.

BANCA EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente
 **MARCIANA PIERINA ULIANA MACHADO**
Data: 24/04/2025 11:24:10-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>


Orientador(a): Prof^a Dr^a Marciana Pierina Uliana Machado

UNILA

Documento assinado digitalmente
 **MICHEL RODRIGO ZAMBRANO PASSARINI**
Data: 24/04/2025 15:17:11-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>


Prof^o Dr^o Michel Rodrigo Zambrano Passarini

UNILA

Documento assinado digitalmente
 **JEAN FRANCESCO VETTORAZZI**
Data: 07/05/2025 08:49:19-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>


Prof^o Dr^o Jean Franciesco Vettorazzi

UNILA

Documento assinado digitalmente
 **CLOVIS WESLEY OLIVEIRA DE SOUZA**
Data: 25/04/2025 11:44:41-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof^o Dr^o Clóvis Wesley Oliveira de Souza

UFSCar

Documento assinado digitalmente
 **SEBASTIAO PRATAVIEIRA**
Data: 25/04/2025 17:57:42-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof^o Dr^o Sebastião Pratavieira

IFSC-USP

Foz do Iguaçu, 13 de março de 2025

“Ó admirável e incompreensível dependência de um Deus,
de que nos foi dado a conhecer o preço e a glória infinita,
pois o Espírito Santo não a pôde passar em silêncio no Evangelho,
como incógnitas nos ficaram quase todas as coisas maravilhosas
que fez a Sabedoria encarnada durante sua vida oculta.
Jesus Cristo deu mais glória a Deus, submetendo-se a Maria durante trinta anos,
do que se tivesse convertido toda a terra
pela realização dos mais estupendos milagres.”

São Luís Maria Grignon de Montfort

AGRADECIMENTOS

Concluir mais esta etapa da caminhada foi possível graças à presença de bons guias. A realização deste sonho está alicerçada não apenas no esforço humano, mas também no amparo Divino, que transformou esta tese em realidade, sendo fruto de uma busca constante por harmonia entre esses dois mundos.

Ao compartilhar minha gratidão àqueles que caminharam comigo, minha alegria transcende o que conheço e toca o Eterno. Em Deus coloquei minha confiança; Ele me guia e a Ele sou grata por cada pessoa que esteve comigo nesta jornada:

À Professora Dra. Marciana P. Uliana Machado por me orientar nessa etapa, por toda disposição, paciência e ensinamentos. Foi uma honra ser sua aluna, te admiro pela sua inteligência e sua capacidade em lidar com as pessoas de forma tão generosa.

Ao Professor Dr. Jorge Ruiz, meu coorientador, que possibilitou o teste em linhagens celulares, disponibilizou seu laboratório e fez-se sempre presente nas discussões de resultados, com diversos ensinamentos sobre estatística.

Ao Prof. Dr. Francisney P. Nascimento, que me escolheu como bolsista DTI junto ao seu laboratório de pesquisas clínicas, onde aprendi muito. Serei sempre grata, pois foi o que me possibilitou cumprir essa etapa do doutorado.

Ao meu esposo Júnior, por todo amor, apoio e conselhos nesse processo longo do doutorado.

Aos meus pais Decio e Claudia que sempre me apoiaram, me ouviram e sempre me incentivaram.

Às amigas que floresceram nas dificuldades do processo como da Juliana Bilha, Andrés Mojoli, Maria Gabriela, Diana Linares.

Ao Prof. Dr. Clovis Wesley Oliveira de Souza (UFScar) por gentilmente fornecer a cepa da bactéria púrpura *Rhodopseudomonas faecalis*.

Ao Prof. Dr. Antônio Claudio Tedesco (USP) e à doutoranda Nayara Rezende pela colaboração na caracterização dos lipossomas e revisão do artigo.

Ao Prof. Dr. Rodrigo Araldi Pinheiro (Instituto Butantan) por fornecer a linhagem de célula tumoral de mama (MCF-7) e pela disciplina ministrada sobre câncer que foi muito proveitosa.

Ao Prof. Dr. Jean Vettorazzi e Profa. Dra. Maria Cláudia Gross (UNILA) por permitir a realização de parte dessa tese no laboratório de ciências médicas.

Aos Professores participantes da banca de qualificação, Dr. Clovis, Dr. Sebastião e Dra. Caroline que fizeram considerações e contribuições muito importantes para este trabalho.

À agência do governo federal de fomento à pesquisa, CNPq, processo nº 140159/2024-0 junto a orientadora Profa. Dra. Marciana P. Uliana Machado e processo nº 382503/2022-1 junto ao Prof. Dr. Francisney P. Nascimento.

À UNILA – Universidade Federal da Integração Latino-Americana – pela oportunidade para desenvolver esta tese.

PEREIRA, Priscila. Bacterioclorina Encapsulada em Lipossoma: Inativação de Células Tumerais Utilizando Terapia Fotodinâmica. 13 março de 2025. 77 folhas. Tese (Doutorado em Energia e Sustentabilidade) - Universidade Federal da Integração Latino-Americana, Foz do Iguaçu.

RESUMO

A Terapia Fotodinâmica (TFD) existe há mais de 100 anos, mas somente em 2023, foi incorporada no SUS (Sistema Único de Saúde), como uma alternativa para câncer de pele, por ser um método eficiente para reduzir efeitos colaterais sistêmicos da terapia utilizada atualmente para tratamento do câncer. A TFD envolve luz e componentes não tóxicos como o fotossensibilizador (FS) e oxigênio que quando combinados induzem efeitos celulares e teciduais. O FS é uma molécula fotossensível que, ao atingir a célula-alvo ou tecido, é ativado por uma fonte de luz com comprimento de onda específico, que irá excitar o FS, gerando espécies reativas de oxigênio que causam danos às células cancerosas, induzindo à morte celular. O uso de FS que absorve em comprimento de onda mais longo, como a bacterioclorina (Bcl), tem potencial para atingir maiores profundidades no tecido, ampliando o espectro de tratamento da TFD. Para potencializar a ação desta Bcl foi realizada uma formulação lipossomal (FL). Essa FL possui vantagens como a capacidade de melhorar a solubilidade, a estabilidade e a biodisponibilidade de princípios ativos, como FS, além de permitir a liberação controlada e direcionada dos fármacos no corpo. Com objetivo de desenvolver uma formulação de nanopartícula capaz de otimizar a utilização da Bcl, reduzindo a quantidade necessária para induzir a morte celular, foi realizada a comparação entre a atividade fotodinâmica da bacterioclorina na sua forma livre e em formulação lipossomal, avaliando sua eficiência e seu potencial terapêutico *in vitro*. Assim, a bactéria que contém o precursor da Bcl foi cultivada, centrifugada e depois, foi realizada a extração e transesterificação para obter a Bcl, o qual foi caracterizada e comparada à literatura. Foi desenvolvida uma FL por hidratação de filme. Os dados de absorbância, de sobrevivência celular, obtidos por MTT, foram normalizados e os tratamentos foram analisados pelo teste ANOVA, pelo programa GraphPad Prism, com intervalo de confiança de 95%, seguido de teste de Tukey para comparar as variáveis. Conclui-se que a FL superou a forma livre da Bcl em eficiência em todas as linhagens testadas. Comparando MRC-5 e MIA PaCa-2, a potência lipossomal do FS foi 392 vezes maior em MIA PaCa-2, com IC₅₀ de 2 nM, e 34 vezes maior em MRC-5, com IC₅₀ de 1 nM, em relação ao FS livre. Além disso, a FL demonstrou proteger a Bcl da fotodegradação, contribuindo para seu desempenho superior. Contudo, A TFD já é uma alternativa viável às terapias convencionais e está em processo de consolidação na prática clínica, destacando-se pela baixa toxicidade sistêmica a longo prazo e pela ausência de resistência medicamentosa. Esse estudo mostra-se como um avanço na questão sustentável no Brasil e no mundo, pois contempla os objetivos 3 e 12 dos ODS, em voga atualmente.

Palavras-chave: lipossomas; fotossensibilizadores; TFD; câncer; morte celular.

PEREIRA, Priscila. Liposome-Encapsulated Bacteriochlorin: Tumor Cell Inactivation Using Photodynamic Therapy. March 13, 2025. 77 pages. Thesis (PhD in Energy and Sustainability) - Federal University of Latin American Integration, Foz do Iguaçu.

ABSTRACT

Photodynamic Therapy (PDT) has been around for over 100 years, but it was only in 2023 that it was incorporated into the SUS (Unified Health System) as an alternative for skin cancer, as it is an efficient method for reducing the systemic side effects of the therapy currently used to treat cancer. PDT involves light and non-toxic components such as photosensitizer (PS) and oxygen that, when combined, induce cellular and tissue effects. PS is a photosensitive molecule that, upon reaching the target cell or tissue, is activated by a light source with a specific wavelength, which will excite the PS, generating reactive oxygen species that cause damage to cancer cells, inducing cell death. The use of PS that absorbs at longer wavelengths, such as bacteriochlorin (Bch), has the potential to reach greater depths in the tissue, expanding the treatment spectrum of PDT. To enhance the action of this Bch, liposomal formulation (LF) was developed. This LF has advantages such as the ability to improve the solubility, stability and bioavailability of active ingredients, such as PS, as well as allowing the controlled and targeted release of drugs in the body. With the aim of developing a nanoparticle formulation capable of optimizing the use of Bch by reducing the amount required to induce cell death, a comparison was made between the photodynamic activity of Bch in its free form and in a LF. The efficiency and therapeutic potential *in vitro* were evaluated. Therefore, the bacteria containing the Bch precursor were cultivated, centrifuged, and then extraction and transesterification were performed to obtain Bch, which was characterized and compared to the literature. LF was performed via film hydration method. The absorbance, cell survival data, obtained by MTT were normalized and then the treatments were analyzed by the ANOVA test, by the GraphPad Prism program, with a 95% confidence interval, followed by the Tukey test to compare the variables. It was concluded that FL outperformed the free form of Bch in efficiency in all tested cell lines. Comparing MRC-5 and MIA PaCa-2, the liposomal potency of FS was 392 times higher in MIA PaCa-2, with IC_{50} of 2 nM, and 34 times higher in MRC-5, with IC_{50} of 1 nM, compared to free FS. Furthermore, FL was shown to protect Bch from photodegradation, contributing to its superior performance. However, PDT is already a viable alternative to conventional therapies and is in the process of consolidation in clinical practice, standing out for its low long-term systemic toxicity and the absence of drug resistance. This study represents progress in the issue of sustainability in Brazil and the world, as it includes goals 3 and 12 of the SDGs, which are currently in vogue.

Keywords: liposomes; photosensitizers; PDT; cancer; cell death.

PEREIRA, Priscila. BACTERIOCLORINA ENCAPSULADA EN LIPOSOMA: Inactivación de células tumorales mediante Terapia Fotodinámica. 13 de marzo de 2025. 77 hojas. Tese - (Doctorado en Energía y Sostenibilidad) – Universidad Federal de Integración Latinoamericana, Foz do Iguaçu.

RESUMEN

La Terapia Fotodinámica (TFD) existe desde hace más de 100 años, pero recién en 2023 fue incorporada al SUS (Sistema Unificado de Salud), como alternativa para el cáncer de piel, por ser un método eficiente para reducir los efectos secundarios sistémicos de la terapia actualmente utilizada para tratar el cáncer. La TFD implica la utilización de luz y componentes no tóxicos, como el fotosensibilizador (FS) y el oxígeno, que, al combinarse, inducen efectos celulares y tisulares. El FS es una molécula fotosensible que, al llegar a la célula o tejido objetivo, es activada por una fuente de luz con una longitud de onda específica, que excitará el FS, generando especies reactivas de oxígeno que causan daño a las células cancerosas, induciendo la muerte del celular. El uso de FS que absorbe en longitudes de onda más largas, como la bacterioclorina (Bcl), tiene el potencial de alcanzar mayores profundidades en el tejido, ampliando el espectro de tratamiento de la TFD. Para mejorar la eficacia de este Bcl, hemos desarrollado una formulación liposomal (FL). Esta FL ofrece importantes beneficios, entre ellos, una mayor solubilidad, una mayor estabilidad y una biodisponibilidad superior de los principios activos como el FS. Además, facilita el control preciso y la liberación dirigida de medicamentos dentro del organismo, lo que garantiza que los tratamientos sean eficaces e impactantes. Con el objetivo de desarrollar una formulación de nanopartículas que optimizara el uso de Bcl y redujera la cantidad necesaria para inducir la muerte celular, se comparó la actividad fotodinámica de la bacterioclorina en su forma libre y en formulación liposomal, evaluando su eficiencia y potencial terapéutico *in vitro*. Por lo tanto, la bacteria que contenía el precursor Bcl fue cultivada, centrifugada y luego se realizó extracción y transesterificación para obtener Bcl, que fue caracterizado y comparado con la literatura. Se desarrolló un FL por hidratación de película. Los datos de absorbancia, supervivencia celular, obtenidos por MTT fueron normalizados y los tratamientos fueron analizados mediante el programa GraphPad Prism, utilizando la prueba ANOVA, con un intervalo de confianza del 95%, seguido de la prueba de Tukey para comparar las variables. En conclusión, FL superó a la forma libre de Bcl en términos de eficacia en todas las cepas ensayadas. Al comparar MRC-5 y MIA PaCa-2, la potencia liposomal del FS fue 392 veces mayor en MIA PaCa-2, con un IC50 de 2 nM, y 34 veces mayor en MRC-5, con un IC50 de 1 nM, en comparación con el SL libre. Además, se demostró que FL protege a Bcl de la fotodegradación, lo que contribuye a su mayor rendimiento. La TFD es ya una alternativa viable a las terapias convencionales y está en proceso de consolidación en la práctica clínica, ya que destaca por su baja toxicidad sistémica a largo plazo y por la ausencia de resistencia a los fármacos. Por lo tanto, el estudio es un avance en la cuestión sostenible en Brasil y en el mundo, según los objetivos 3 y 12 de los ODS, actualmente en boga.

Palabras clave: fotosensibilizadores; liposomas; TFD; cáncer; muerte celular.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Esquema de propagação da luz através do tecido.....	13
Figura 2: Estrutura molecular dos principais FS.....	14
Figura 3: Diagrama de Jablonski (modificado).....	17
Figura 4: Princípios moleculares da Terapia Fotodinâmica.....	18
Figura 5: Estruturas moleculares de alguns fotossensibilizadores aprovados comercialmente	25
Figura 6: Estrutura Molecular da Bacterioclorofila, Bacterioclorina fitil e da Bacterioclorina.....	28
Figura 7: Estrutura Molecular do Tookad® e Tookad Solúvel®.	29
Figura 8: Ilustração esquemática do processo de formação de lipossomas	30
Figura 9: Garrafas com cultivo de bactéria púrpura <i>Rhodopseudomonas faecalis</i>	35
Figura 10: Formulação de lipossomas	38
Figura 11: Células tumorais MIA PaCa-2.....	39
Figura 12: Células tumorais MCF-7	40
Figura 13: Células normais de fibroblastos MRC-5	40
Figura 14: Biotable	43
Figura 15: Reação de metabolização do MTT.....	44
Figura 16: Esquema de obtenção da bacterioclorina	46
Figura 17: Espectro de absorção da bacterioclorina	47
Figura 18: Estudo de fotodegradação.....	48
Figura 19: Monitoramento da estabilidade após preparação da formulação.....	49
Figura 20: Gráficos de citotoxicidade com FS livre e em FL nas três linhagens.....	52
Figura 21: Controles do teste de TFD nas linhagens tumorais.....	54
Figura 22: Controles do teste de TFD na linhagem normal de fibroblasto.....	55
Figura 23: Teste de TFD nas linhagens tumorais com FS livre.....	56
Figura 24: Teste de TFD na linhagem tumoral de mama (MCF-7) com FL.....	58
Figura 25: Curvas de regressão não linear, IC ₅₀ , na linhagem tumoral de mama.....	59
Figura 26: Teste de TFD na linhagem tumoral de pâncreas (MIA PaCa-2) com FL.....	60
Figura 27: Curvas de regressão não linear, IC ₅₀ , em linhagem tumoral de pâncreas.....	61
Figura 28: Teste de TFD na linhagem normal de fibroblasto (MRC-5) com FS livre.....	63
Figura 29: Teste de TFD na linhagem normal de fibroblasto (MRC-5) com FL.....	64
Figura 30 : Curvas de regressão não linear, IC ₅₀ , em linhagem normal de fibroblastos (MRC-5).....	65
Quadro 1: Principais fotossensibilizadores aprovados para TFD no câncer	19
Quadro 2: Variáveis Dependentes para o teste ANOVA.....	53
Quadro 3: Valores de IC ₅₀	66

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALA	Ácido 5-aminolevulínico
ANOVA	Análise de Variância
DAMPs	Padrões Moleculares Associados a Danos (do inglês)
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DSL	Espelamento de Luz Dinâmico (do inglês)
EMA	<i>European Medicines Agency</i> (do inglês)
EPR	Efeito de Retenção e Permeação Intensificada (do inglês)
EROS	Espécies Reativas de Oxigênio
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> (do inglês)
FL	Formulação Lipossomal
FS	Fotossensibilizador
IC ₅₀	Concentração Inibitória Média em 50% da sobrevivência celular
IDH	Índice de Desenvolvimento Humano
INCA	Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva
IPD	Índice de Polidispersão
J	Joules
LED	<i>Light Emitting Diode</i>
M	Molar
MAL	Aminolevulinato de metila
MDR	Resistência a Múltiplos Fármacos (do inglês)
MTT	Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio
NIR	Infravermelho Próximo (do inglês)
PBS	Solução Salina Tamponada com Fosfato
PDT	Terapia Fotodinâmica (do inglês)
PpIX	Protoporfirina IX
ODS	Objetivos do Desenvolvimento Sustentável
ONU	Organização das Nações Unidas
PAMPs	Padrões Moleculares Associados à Patógenos (do inglês)
R ²	Fator de Determinação
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RPM	Rotações por Minuto

SFB	Soro Fetal Bovino
TA	Temperatura Ambiente
TFD	Terapia Fotodinâmica
TFV	Terapia Fotodinâmica Vascular-direcionada
U	Unidades
W	Watts
WHO	<i>World Health Organization</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1 A TERAPIA FOTODINÂMICA	16
2.2 A MORTE CELULAR	20
2.3 O CÂNCER	21
2.4 O CÂNCER DE MAMA	22
2.5 O CÂNCER DE PÂNCREAS	22
2.6 O CÂNCER E O TRATAMENTO COM TFD	23
2.7 TERAPIA FOTODINÂMICA NO SUS	26
2.8 OS FOTOSSENSIBILIZADORES	27
2.9 SISTEMA DE CARREAMENTO DE DROGAS – LIPOSSOMAS	29
3 OBJETIVOS	33
3.1 OBJETIVOS GERAIS	33
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
4 METODOLOGIA	34
4.1 CLASSIFICAÇÃO DA PESQUISA	34
4.2 PARTE EXPERIMENTAL	34
4.2.1 Cultivo de <i>Rhodopseudomonas faecalis</i>	34
4.2.2 Extração da bacterioclorina fitil	35
4.2.3 Obtenção da bacterioclorina por transesterificação	36
4.2.4 Purificação e caracterização da bacterioclorina	36
4.2.5 Espectroscopia de Varredura	36
4.2.6 Preparo das Soluções de bacterioclorina livre para TFD	37
4.2.7 Preparo da formulação de lipossomas “vazios”	37
4.2.8 Preparo da formulação de lipossomas com fotossensibilizador	37
4.2.9 Estudo de Fotodegradação	38
4.2.10 Determinação do Tamanho de Partícula, Índice de Polidispersão e Potencial Zeta	39
4.2.11 Linhagens e culturas celulares	39
4.2.12 Crescimento, contagem e plaqueamento de células	41
4.2.13 Terapia Fotodinâmica	42
4.2.14 Determinação da atividade metabólica celular – MTT	44
4.2.15 Cálculo do IC ₅₀ (Concentração Inibitória Média em 50% da sobrevivência celular)	44
4.2.16 Análise estatística entre os grupos de variáveis	45

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
5.1 OBTENÇÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA BACTERIOCLORINA	46
5.2 ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO	47
5.3 ESTUDO DE FOTODEGRADAÇÃO	48
5.4 ESTUDO DOS LIPOSSOMAS	49
5.5 CITOTOXICIDADE EM FORMULAÇÕES COM PBS	50
5.6 OS CONTROLES DA AVALIAÇÃO DE TFD	54
5.8 AVALIAÇÃO DA TFD EM CÉLULAS NORMAIS	62
5.9 COMPARAÇÃO ENTRE IC ₅₀	66
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	67
7 REFERÊNCIAS	69
ANEXO A – FORMULAÇÃO LIPOSSOMAL EM TAMPÃO TRIS:HCL	76

1 INTRODUÇÃO

A Organização das Nações Unidas (ONU) tem como objetivo desenvolver tratativas para diversos desafios globais interconectados com a finalidade de promover um mundo sustentável, inclusivo e equitativo. A Agenda 2030 e seus Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS), estabelecidos em 2015, desempenham um papel crucial na promoção do acesso à saúde de qualidade e no bem-estar da população mundial como parte de uma abordagem global para o desenvolvimento sustentável (NAÇÕES UNIDAS BRASIL, 2023), com a ODS 3. Além disso, a utilização de moléculas oriundas do metabolismo de bactérias reduz consideravelmente a utilização de reagentes tóxicos e nocivos ao meio ambiente, sendo, portanto, um processo verde, sustentável em sinergia com a ODS 12.

A Terapia Fotodinâmica (TFD) é uma técnica para o tratamento de diversos tipos de tumores benignos e malignos, infecções causadas por microrganismos e até mesmo em tratamentos como o de onicomicose, psoríase, acne bacteriana, herpes viral, aterosclerose, entre outros (LUO et al., 2024; SONGCA, 2023). Esta técnica se destaca por ser uma abordagem terapêutica que não é específica para um único tipo de condição, mas a qual pode ser aplicada em diversas áreas da saúde para combater doenças de forma eficaz e com potencial para reduzir efeitos colaterais sistêmicos (PRATAVIEIRA et al., 2021).

As terapias convencionais para o câncer, atualmente, consistem em quimioterapia e a radioterapia. A primeira usa substâncias que destroem células que se dividem rapidamente, enquanto a segunda terapia usa de radiação aplicada no local do câncer. Como efeitos colaterais sistêmicos da quimioterapia podemos citar problemas na espermatogênese, na medula óssea, trato gastrointestinal e alopecia. A radioterapia tem um impacto prejudicial nas células saudáveis dos tecidos ao redor do tumor, também expostos à radiação durante o tratamento causando, a priori, uma inflamação nos tecidos em rápida proliferação e, tardiamente, pode-se observar fibrose, atrofia, dano vascular, infertilidade, deficiências hormonais e malignidades secundárias (HAK et al., 2023).

Na pesquisa do câncer, a TFD tem demonstrado potencial e os resultados das pesquisas clínicas sugerem que pode ser uma alternativa às terapias convencionais. A TFD envolve dois componentes não tóxicos individualmente combinados para induzir efeitos celulares e teciduais, dependente de oxigênio. O primeiro componente da TFD é o fotossensibilizador (FS), uma molécula fotossensível que se localiza em uma célula-alvo e/ou tecido. O segundo componente, a luz, é administrada em um comprimento de onda específico que ativa o FS, o qual, depois de ativado, transfere energia da luz ao oxigênio molecular, gerando espécies reativas de oxigênio (EROs). Portanto, as respostas biológicas ao FS são ativadas apenas em áreas específicas de tecido às quais

foram expostas à luz (DOLMANS; FUKUMURA; JAIN, 2003).

O desenvolvimento de novos FS ou aprimoramento dos FS já existentes é de grande importância, pois podem aumentar os efeitos anticancerígenos mediados pela TFD. A hematoporfirina foi o primeiro FS a ser usado na clínica na década de 1970, nos Estados Unidos. Desde então a TFD passou a crescer com o desenvolvimento de novos FS e dispositivos médicos melhorados para superar as desvantagens e limitações de protocolos anteriores (MFOUO-TYNGA et al., 2021).

Os FS de segunda geração, como ácido 5-aminolevulínico e clorina apresentam baixa biodisponibilidade, pouca seletividade pelo tecido tumoral e possuem baixa eficiência. Para melhorar a penetração da luz no tecido, têm sido pesquisados novos FS com absorção na região do infravermelho próximo (HU et al., 2022), pois a luz nesse comprimento de onda é capaz de atravessar a epiderme e chegar a camadas mais profundas da pele, até ultrapassando-a, como sugerido, no esquema da figura 1, os diferentes comprimentos de onda e a profundidade que pode atingir na pele.

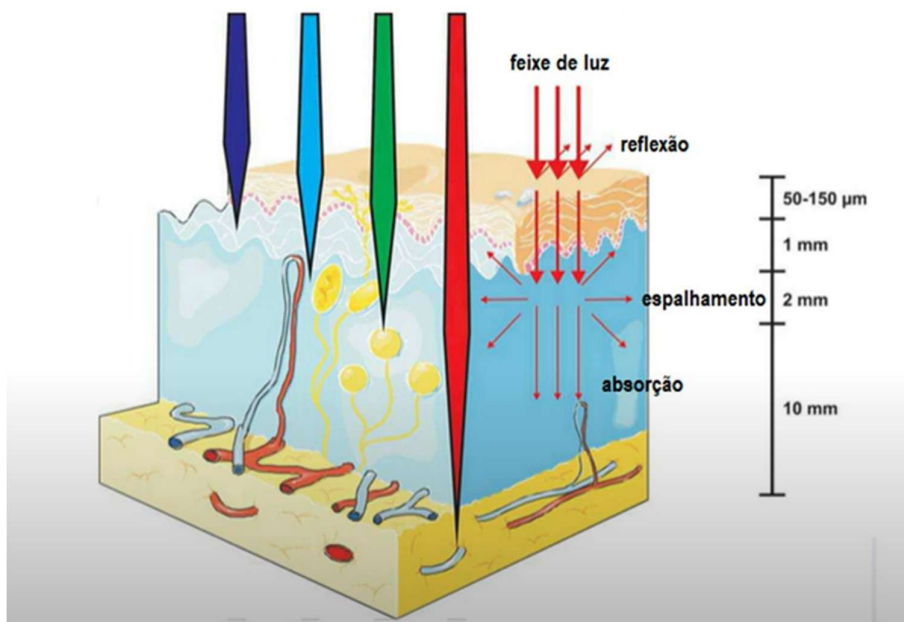


Figura 1: Esquema de propagação da luz através do tecido. Diferentes comprimentos de onda e as diferentes profundidades atingidas.

fonte: Modificado de AGOSTINIS et al., 2011.

A principal desvantagem da TFD é a limitada profundidade de penetração da luz. A utilização de FS com absorção em comprimentos de onda na faixa do UV/visível (400 nm até 700 nm), não é eficaz para tumores profundos. Atualmente, soluções para tratar tumores profundos com

TFD têm sido propostas, tais como: uso de nanopartículas como sistema de carreamento de drogas, por exemplo os lipossomas; uso de FS que absorvem comprimentos de ondas relativamente mais longos (SHRESTHA et al., 2019), na faixa de luz infravermelha próxima com comprimentos de onda entre 740 até 780 nm, como a bacterioclorina, objeto desse estudo, apresentada na figura 2.

Como citado em ARNAUT; PEREIRA, (2023), há pelo menos duas razões que podem explicar a lacuna entre o sucesso científico e clínico da TFD e a leve adesão de mercado, sendo elas: A TFD se assemelha a um nicho de mercado específico, com um medicamento (FS) e um dispositivo médico (fonte de luz), o que necessita aprender tanto a farmacologia quanto a dosimetria do laser, o que pode ser inconveniente para alguns profissionais; além disso a TFD desafia os modelos de negócios farmacêuticos padrão, uma vez que é usado apenas uma vez para o tratamento de um tumor sólido, em oposição a um medicamento que é tomado regularmente até alcançar a cura ou sua resistência medicamentosa. No entanto, alguns sucessos clínicos e comerciais da TFD, abaixo relatados, mostram que esses obstáculos podem ser transpostos.

Compostos de segunda geração, como clorinas, bacterioclorinas e ftalocianinas, demonstrados na figura 2, são os FS mais amplamente utilizados na TFD, com potencial para tratamento do câncer (OLIVEIRA et al., 2014; ULIANA et al., 2014). As bacterioclorinas e ftalocianinas apresentam uma janela terapêutica abrangente, permitindo maior penetração com menor dano aos tecidos humanos (ARNAUT et al., 2014). Um composto que ficou bastante conhecido por apresentar excelentes resultados para o tratamento de câncer de próstata é a bacterioclorina-paládio, comercialmente chamada de Tookad®. É a primeira bacterioclorina avaliada em humanos (KARWICKA et al., 2019; PUCELIK et al., 2016).

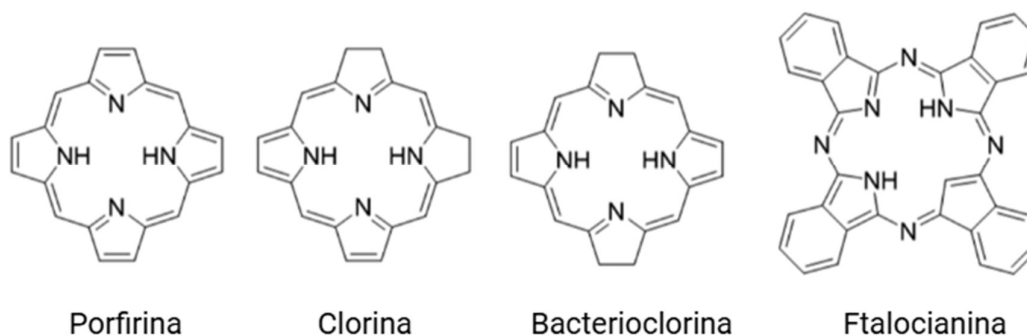


Figura 2: Estrutura molecular dos principais FS. Compostos à base de macrociclos tetrapirrólicos. fonte: (NGUYEN et al., 2021) modificado.

Outro derivado de bacterioclorina, este em estudos pré-clínicos, é a Redaporfina, comercialmente chamada de LUZ11®, ativada em 749 nm, utilizada em tumores de cabeça e pescoço

(ARNAUT; PEREIRA, 2023). Para o tratamento da degeneração macular relacionada à idade, há o FS benzoporfirina (clorina), comercialmente chamado Visudyne®, que não é um tratamento oncológico, no entanto é mais um sucesso da TFD (SCHMIDT-ERFURTH; HASAN, 2000). Atualmente esse FS é utilizado também na ceratose actínica, que é uma lesão pré-cancerosa, e no carcinoma basocelular (XUE et al., 2022) .

Para potencializar a ação desta bacterioclorina, foi proposto uma formulação lipossomal via método de hidratação de filme, método simples, não requer tecnologia e equipamentos caros, tornando apropriado para o uso em países em desenvolvimento. A principal vantagem das formulações lipossomais é a capacidade de melhorar a solubilidade, a estabilidade e a biodisponibilidade de princípios ativos, como FS, além de permitir a liberação controlada e direcionada dos fármacos no corpo. Essas formulações são sistemas vesiculares compostos por uma ou mais bicamadas de fosfolipídeos que envolvem um compartimento aquoso, capazes de encapsular tanto substâncias hidrofílicas como lipofílicas (MACHADO, 2000). Esse tipo de sistema, no qual o FS está associado a transportadores, é denominado FS de terceira geração (MUEHLMANN et al., 2014; SILVA, 2016).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A TERAPIA FOTODINÂMICA

A terapia fotodinâmica consiste na administração tópica ou sistêmica de um FS, o qual se incorpora seletivamente às células cancerígenas. Subsequentemente, a área neoplásica é irradiada com uma luz, resultando em danos fotodinâmicos geralmente irreversíveis, ou seja, morte das células cancerígenas (HONORS; KRUGER; ABRAHAMSE, 2018). A fonte de luz utilizada na TFD tem que emitir luz cujo comprimento de onda é definido de acordo com o espectro de absorção do FS.

Para o elevado nível de seletividade do FS pelo tecido tumoral, há dois fatores críticos, sendo eles: a capacidade intrínseca de muitos FS se acumularem preferencialmente no tecido tumoral e a aplicação de luz exclusivamente na área de tratamento (LUO et al., 2017). Além disso, TFD é simples, não invasivo e não requer tecnologia e equipamentos caros, o que torna conveniente para o uso em países em desenvolvimento (AKILOV et al., 2007).

A inativação fotodinâmica ocorre quando o FS recebe luz em um comprimento de onda específico, no qual excita esse FS e dá origem a espécies reativas de oxigênio (EROs). Existem dois tipos de mecanismos de reações fotodinâmicas, sendo: tipo I, a qual gera EROs e o tipo II, a qual gera oxigênio singlete (Figura 3). Essas espécies reativas podem oxidar moléculas bioativas como polissacarídeos (USACHEVA; TEICHERT; BIEL, 2003), lipídeos (ALVES et al., 2013), proteínas (GRACANIN et al., 2009) e outros, causando morte celular (KWIATKOWSKI et al., 2018; MA et al., 2022; SHARMA et al., 2013).

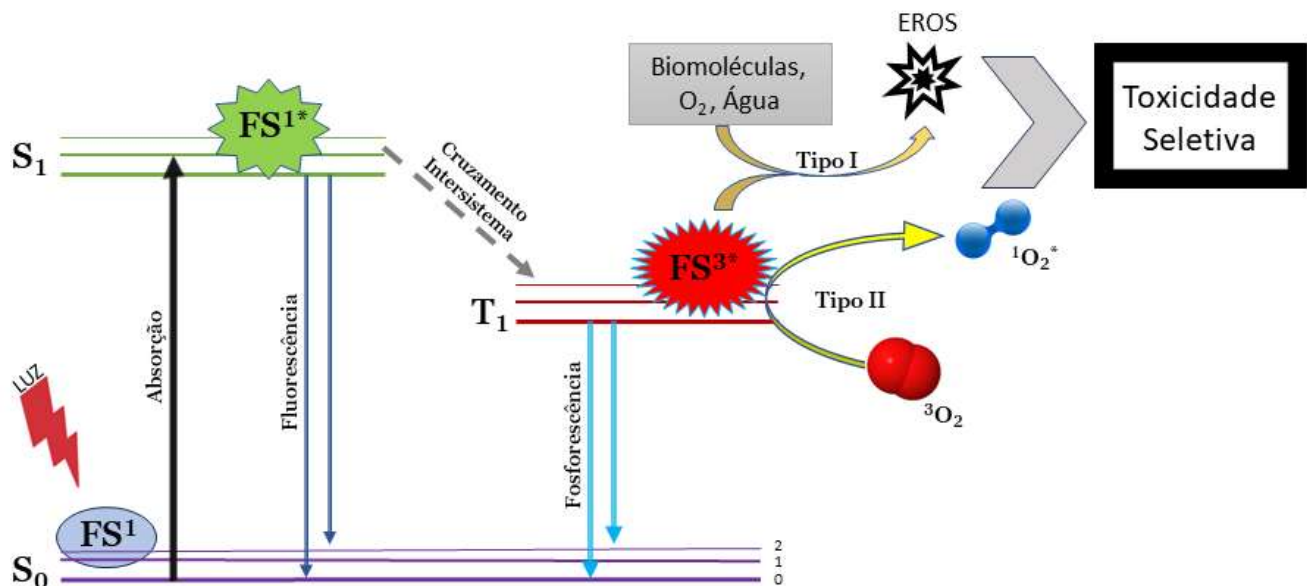


Figura 3: Diagrama de Jablonski (modificado): elementos necessários a TFD: luz, fotossensibilizador (FS) e oxigênio. A ativação do FS para o estado excitado ocorre quando exposto a comprimentos de onda específicos de luz. Ao retornar ao seu estado fundamental, libera energia, a qual é transferida para o oxigênio, formando espécies reativas de oxigênio (EROs), como oxigênio singleto e radicais livres.

fonte: Autora.

Devido à alta reatividade e a meia-vida curta das EROs, apenas células próximas à área da produção de EROs (áreas de localização do FS) são diretamente afetadas pela TFD, demonstrado na figura 4. A meia-vida do oxigênio singleto em sistemas biológicos é $<0,04 \mu s$ e o raio da ação do oxigênio singleto é $<0,02 \mu m$ (MOAN; BERG, 1991). Portanto, a extensão da fotodegradação e citotoxicidade são multifatoriais e depende do tipo de FS, a sua localização intra e extracelular, a dose total administrada, o tempo total de exposição à luz, a taxa de fluência da luz, a disponibilidade de oxigênio, e o tempo entre a administração da droga e exposição à luz. Todos esses fatores são interdependentes (DOLMANS; FUKUMURA; JAIN, 2003).

Os danos e a morte da célula cancerígena, apesar de ocorrer de maneira multifatorial, apresentam três principais causas, sendo elas: dano e morte direta das células cancerígenas mediadas por EROs; dano vascular tumoral; ativação da defesa imunológica e consequente resposta adaptativa (MFOUO-TYNGA et al., 2021).

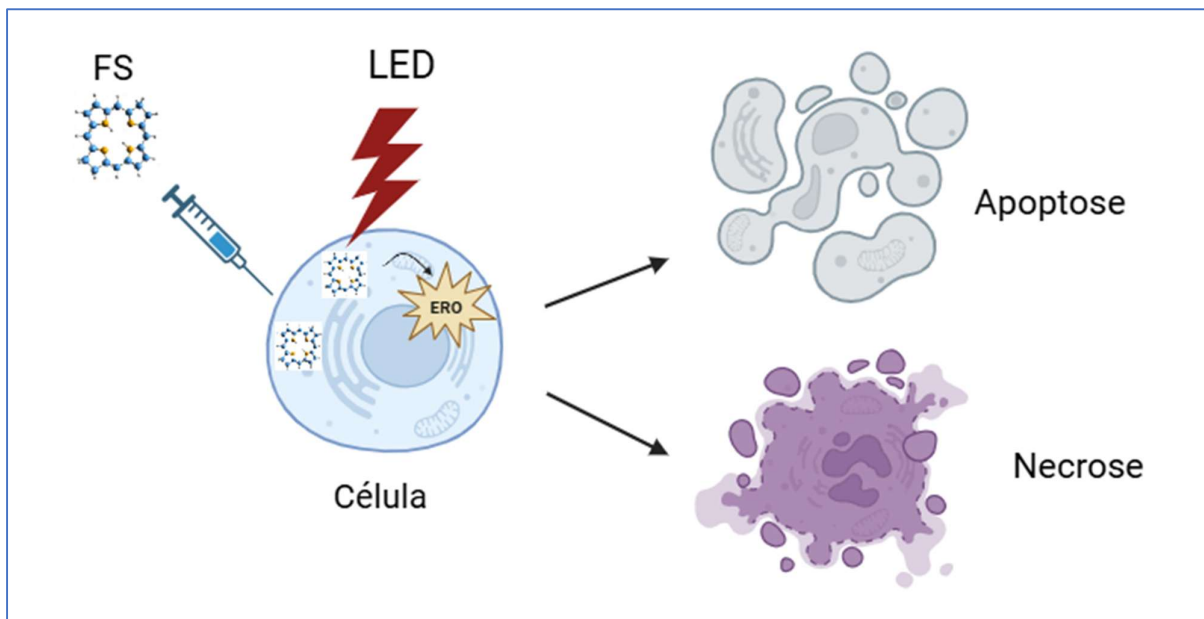


Figura 4: Princípios Moleculares da Terapia Fotodinâmica: o FS administrado se distribui pelos tecidos, o local do tumor é irradiado pelo LED, o qual ativa o FS. Esse quando ativado consegue formar ERO e oxigênio singleto que desencadeiam os mecanismos biológicos morte celular.

fonte: Autora. Desenvolvido com BioRender.com.

O uso eficaz da TFD requer a escolha de um FS apropriado que favoreça o procedimento. Pesquisas têm se concentrado em sistemas de liberação de medicamentos, como lipossomas, que aumentam a seletividade do FS pelo tumor, permitindo doses mais baixas e minimizando os efeitos colaterais indesejados. Algumas características importantes na busca por um fotossensibilizador ideal incluem (CHRISTIE; KOMPPELLA, 2008):

- Pureza química: O fotossensibilizador deve ser quimicamente puro para garantir sua eficácia e segurança.
- Seletividade para células tumorais: É desejável que o FS seja seletivo para células tumorais, minimizando o dano às células saudáveis.
- Estabilidade química e física: O FS deve manter sua estabilidade durante o armazenamento e administração.
- Curto intervalo de tempo entre a administração e o acúmulo máximo nos tecidos tumorais: Isso ajuda a otimizar o tratamento.
- Ativação em comprimentos de onda com excelente penetração no tecido: Comprimentos de onda de luz que penetram profundamente nos tecidos são preferíveis para ativar o FS no local do tumor.
- Rápida excreção do organismo: O FS deve ser eliminado do corpo de forma eficaz após o

tratamento para reduzir os efeitos colaterais sistêmicos.

- Eficiência na geração de oxigênio singlete;
- Capacidade de penetração na membrana celular;

Portanto, a pesquisa contínua na escolha de fotossensibilizadores ideais e no desenvolvimento de sistemas de entrega aprimorados é fundamental para a eficácia e segurança da TFD em várias aplicações de tratamento de saúde (MACHADO, 2000; ROCHA et al., 2012). Atualmente estão à disposição alguns FS aprovados por diferentes agências reguladoras ao redor do mundo, os quais apresentam tratamentos para diferentes tipos de cânceres e estão citados no Quadro 1, abaixo.

Fotossensibilizador	Nome Comercial	λ (nm)	Aprovado para	País
Ácido 5-aminolevulínico (ALA)	(1) BrALA Levulan®	635	Ceratose actínica, carcinoma basocelular, câncer de pele não melanoma, carcinoma de células escamosas	(1) Brasil EUA Reino Unido
Derivados de Hematoporfirina	Photofrin®	630	(1) Câncer de bexiga (2) Câncer de pulmão (estágio inicial) (3) Câncer de esôfago (4) Câncer de pulmão de células não pequenas (estágio inicial)	(1) Canadá (2) Japão (3) EUA (4) EUA
Meta-tetra(hidroxifenil)clorina (mTHPC)	Foscan®	652	Carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço, câncer esôfago, câncer de pulmão de células não pequenas	Europa Noruega Islândia
N-aspartil clorina e6	Laserphyrin®	664	Câncer de pulmão, glioma (estágio inicial), câncer de esôfago	Japão
Mistura de Ftalocianina de alumínio	Photosens®	675	Câncer de mama, pulmão, estômago e pele	Rússia
2-(1-hexiloxietil)-2-devinil pirofeoforbídeo (HPPH)	Photochlor®	665	Carcinoma basocelular, câncer de pulmão, cabeça e pescoço.	EUA
metilaminolevulinato (MAL)	(1) M-BrALA Metvix®	635	Ceratose actínica Carcinoma basocelular	(1) Brasil Europa EUA Canadá
Hexaminolevulinato (HLA)	Cysview®	635	Câncer de bexiga	Europa EUA
Clorina Benzoporfirina	Visudyne®	690	Ceratose actínica Carcinoma basocelular	EUA Noruega China
Bacterioclorina	Tookad® Soluble	753	Câncer de Próstata	México EUA

Quadro 1: Principais fotossensibilizadores aprovados para TFD no câncer.

fonte: (AZIZ et al., 2023; XUE et al., 2022) modificado.

2.2 A MORTE CELULAR

O ciclo celular inclui a morte celular, um evento irreversível que marca o término da atividade metabólica, desempenhando um papel central nos processos patológicos associados a diversas doenças. Inicialmente, era aceito na comunidade acadêmica que a morte celular incluía dois modos: apoptótica, morte celular programada, altamente coordenada imunologicamente inerte; e morte celular necrótica considerada uma forma passiva e altamente inflamatória de morte celular (BERTHELOOT; LATZ; FRANKLIN, 2021). Entretanto à medida que os princípios da morte celular continuam a ser estudados em profundidade, vários mecanismos de morte celular foram identificados (TU et al., 2025).

Tipos adicionais de morte celular programada que ocorrem em estados específicos de toxicidade celular, muitas vezes induzidos por tratamentos farmacológicos, como terapias anticancerígenas, foram relatados. Com base em suas características moleculares, a morte celular regulada pode ser classificada em múltiplas sub-rotinas, algumas das quais têm clara influência fisiológica (como necroptose e piroptose, que são observadas durante o desenvolvimento e/ou no contexto de infecções virais), enquanto outras (como ferroptose, morte celular entótica, morte celular netótica, parthanatos, morte celular dependente de lisossomos, morte celular dependente de autofagia, alkaliptose e oxeiptose) são menos estudadas e pode ser limitada a respostas celulares a toxinas específicas que não refletem a fisiologia normal (TANG et al., 2019).

A morte celular repentina e descontrolada resulta em liberação maciça de conteúdo celular no espaço extracelular. As moléculas liberadas atuam como sinais de dano, conhecidos como padrões moleculares associados a danos (DAMPs). A presença de DAMPs no espaço extracelular provoca uma robusta resposta imune que recruta fagócitos adicionais e outras células imunes para eliminar a ameaça e promover o reparo do tecido. Durante infecções, a presença de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) provoca respostas imunes antimicrobianas específicas para controlar a infecção. Em certas circunstâncias, as células podem regular sua morte para adaptar as respostas imunes, alterando assim o impacto que sua morte terá no ambiente (BERTHELOOT; LATZ; FRANKLIN, 2021).

A ferroptose, um dos tipos de morte celular programada necessária para manter a função e a morfologia do tecido, é caracterizada pelo acúmulo de grandes quantidades de íons de ferro, a redução da atividade da glutatona peroxidase 4 e a ocorrência de peroxidação lipídica de ácidos graxos insaturados na membrana celular, levando ao desequilíbrio redox intracelular e induzindo a morte celular (DIXON et al., 2012; ZHANG et al., 2024). É principalmente desencadeada

pela produção de EROs e um desequilíbrio na homeostase do ferro, levando à peroxidação lipídica grave. Além disso, a ferroptose é considerada um forte inibidor do crescimento tumoral, e sua ação aumenta a sensibilidade do tumor a agentes quimioterápicos, o que tem sido associado à progressão e ao tratamento de uma variedade de cânceres (TORII et al., 2016; TU et al., 2025).

2.3 O CÂNCER

O câncer continua sendo uma das principais causas de morte em todo o mundo, apesar dos avanços notáveis nos tratamentos anticâncer tradicionais como medicamentos, cirurgia, quimioterapia, radioterapia e, mais recentemente, imunoterapia. Atualmente, é reconhecido que as estratégias multimodais são o futuro da oncologia, com muitas empresas farmacêuticas buscando abordagens alternativas ou adjuvantes para complementar e aumentar a eficácia das terapias existentes (MCFARLAND et al., 2020).

O câncer no Brasil tem uma incidência que varia por região, sendo o de próstata predominante entre os homens e o câncer de mama entre as mulheres. Nas regiões mais desenvolvidas o câncer colorretal é dos mais incidentes, mas nas regiões de menor IDH o câncer de colo de útero ocupa essa posição. Os tipos mais comuns incluem câncer de pele não melanoma e os dois acima citados, seguidos de cólon e reto, pulmão e estômago. O Brasil tem uma estimativa de 704 mil casos novos de câncer a cada ano do triênio 2023-2025, com maior incidência nas regiões Sul e Sudeste (70% dos casos) (INCA, 2023).

Com essas informações constroem-se políticas públicas para combater eficazmente a doença, com destaque para o conhecimento e o planejamento de novas medidas que direcionam as ações. Ultimamente, foi adicionado à lista os cânceres de pâncreas e fígado devido à relevância como problema de saúde pública, sendo o primeiro mais incidente na região Norte e o segundo mais incidente na região Sul.

A resistência a múltiplos fármacos (MDR) é um dos maiores desafios no tratamento do câncer. Esta resistência é frequentemente mediada por transportadores de efluxo, como as proteínas da família ABC (*ATP-binding cassette*), que ajudam a expulsar drogas citotóxicas das células tumorais, diminuindo a eficácia dos tratamentos quimioterápicos. Estudos apontam que células tumorais apresentam maiores taxas de efluxo de drogas devido à expressão aumentada desses transportadores (GOTTESMAN; FOJO; BATES, 2002). Huber, Maruiama, Almeida (2010) ressaltam a importância da glicoproteína-P na MDR, destacando a relação estrutura-atividade de moduladores. Já foi descrito MDR em células tumorais, enfatizando a necessidade de novas abordagens terapêuticas

(MACHADO, 2013). Esta complexa interação de fatores reforça a importância de continuar investigando estratégias alternativas que possam superar a resistência e melhorar os resultados dos tratamentos oncológicos (ARALDI et al., 2016)

2.4 O CÂNCER DE MAMA

A estimativa para este tipo de câncer no Brasil, segundo o INCA, é de 74 mil casos novos previstos até 2025. A estratégia fundamental utilizada atualmente para controle dessa neoplasia é a detecção precoce, fornecendo maior sobrevida e baixa morbidade (INCA, 2023). Para esse tipo de câncer o tratamento convencional envolve cirurgia, quimioterapia e radioterapia. Assim surge a preocupação no uso dessas terapias que é a falta de seletividade pelas células neoplásicas, causando efeitos colaterais severos que podem inviabilizar o tratamento convencional. Deve-se levar em consideração também que a remoção da mama por cirurgias pode trazer consequências psicológicas e sociais (SOUZA RODRIGUES et al., 2017).

Já é descrito que genes supressores de tumor são conhecidos por sua função na reparação de quebras de dupla hélice do DNA, assim como os genes, BRCA1 e BRCA2, localizados no cromossomo 17q21 e 13q12 respectivamente, quando mutados, são fatores que podem levar ao desenvolvimento de câncer de mama e ovário em mulheres. Além disso, as mutações BCRA tornam os indivíduos mais suscetíveis a outros tipos de câncer, como de pâncreas e próstata em homens (SILVESTRIS et al., 2024).

Aproximadamente 10 – 20% dos diagnósticos de câncer de mama são caracterizados pelo câncer de mama triplo negativo. Esse tipo de câncer exibe um perfil molecular único devido à falta de expressão do receptor de estrogênio, receptor de progesterona e receptor de fator de crescimento epidérmico humano 2, com potencial de metástase, comportamento agressivo. O tratamento atual e pouco eficaz é a quimioterapia, cirurgia, radioterapia e imunoterapia. Novas opções de tratamento específicas e eficazes para esses pacientes precisam ser desenvolvidas (ERK; KAMANLI; GUNAY ESKILER, 2024)

Uma vantagem da TFD é sua utilização para atingir tumores independentemente de sua associação com receptores de estrogênio, permitindo o desenvolvimento de uma terapia antitumoral alternativa muito mais ampla (PRATAVIEIRA et al., 2021).

2.5 O CÂNCER DE PÂNCREAS

Os principais fatores de risco associados a esse tipo de câncer é a obesidade e o tabagismo. Além desses fatores, a idade avançada, doenças como diabetes tipo 2, consumo excessivo de álcool e condições genéticas aumentam o risco de desenvolver câncer de pâncreas. Dentro do Brasil, a incidência desse câncer se dá principalmente para mulheres na Região Sul, ocupando a sexta posição. Estima-se que para o triênio de 2023-2025 ocorra aproximadamente 10.980 novos casos no Brasil (INCA, 2023). Por não manifestar sinais ou sintomas nas fases iniciais, esse tumor maligno é detectado tardiamente e por isso sua elevada taxa de mortalidade.

Dados mostram que 90% dos casos diagnosticados de câncer de pâncreas correspondem ao tipo adenocarcinoma, que tem origem no tecido glandular. Por ser agressivo e de difícil detecção, possui alta taxa de mortalidade, devido ao diagnóstico tardio. No Brasil, esse tipo de câncer é responsável por 2% de todos os tipos de câncer diagnosticados e por 4% do total de mortes causadas pela doença (INCA, 2021). Os pacientes com câncer de pâncreas apresentam baixa taxa de sobrevivência, menos de 5% dos pacientes sobrevivem cinco anos após o diagnóstico. A quimioterapia é o tratamento adjuvante mais importante para pacientes recorrentes com adenocarcinoma ductal pancreático que não são indicados para cirurgia. No entanto, o câncer de pâncreas também é notoriamente resistente à gencitabina, que é o agente quimioterápico de primeira linha (GRASSO; JANSEN; GIOVANNETTI, 2017). Portanto, é de extrema importância identificar novos tipos de tratamentos mais eficazes para câncer de pâncreas (JALDE et al., 2018).

2.6 O CÂNCER E O TRATAMENTO COM TFD

A TFD existe há mais de 100 anos, embora em formas bastante diferentes. Recentemente, a TFD surgiu como uma intervenção médica para tratar certos tipos de câncer que não podiam ser tratados pelos métodos tradicionais (MCFARLAND et al., 2020). Já aprovada para tratamento de vários tipos de cânceres como o de cabeça e pescoço, carcinoma basocelular, cervical, endobrônquico, esofágico, bexiga e gástrico, a TFD, antigamente era usada apenas para tratamento de lesões na pele e órgãos luminiais. Devido a disponibilidade de entrega de luz intraoperatória e intersticial, a TFD pode ser utilizada em uma gama mais ampla de tumores sólidos, incluindo cérebro, mama, pulmão, pâncreas e próstata. Quando comparada a tratamentos convencionais (cirurgia, radiação e quimioterapia), apresenta algumas vantagens como toxicidade mínima do tecido normal, sem toxicidade sistêmica de longo prazo (imunossupressão), não desenvolve resistência ao medicamento (LUO et al., 2017).

O FS Photofrin®, considerado uma mistura de oligômeros da hematoporfirina, um

porfímero sódico, é o único FS que já foi aprovado em todo o mundo para certos tipos de câncer. Esse FS recebeu sua aprovação inicial para tratamento de câncer de bexiga no Canadá em 1993, seguido pela aprovação no Japão em 1994 para câncer de pulmão em estágio inicial. A Food and Drug Administration (FDA), dos EUA, concedeu sua primeira aprovação em 1995 para câncer de esôfago obstrutivo avançado. Posteriormente, em 1998, foi aprovado para o tratamento de câncer de pulmão de células não pequenas em estágio inicial (KIM; CHANG, 2023).

O Ácido 5-aminolevulínico (ALA) (Levulan) e metil 5-aminolevulinato (Metvix), precursores da protoporfirina IX (PpIX), foram posteriormente aprovados em todo o mundo para carcinoma basocelular, exceto nos Estados Unidos, onde são aprovados para ceratose actínica (MCFARLAND 2020). O ALA é metabolizado, nas mitocôndrias, em protoporfirina IX (PpIX) fotoativa e o acúmulo de PpIX ocorre quando a taxa de conversão de ALA em PpIX é maior do que a conversão de PpIX em heme (fig.5).

Apenas alguns FS de segunda e terceira geração foram aprovados, e apenas em países específicos: temoporfina (Foscan®) no UE, talaporfina (Laserphyrin®) no Japão e LUZ11 (Redaporfina) na UE. Photosens®, Photodithazine®, Radaclorin® e Photogem® foram aprovados na Rússia. Padeliporfina, figura 5, foi aprovado (WST11, TOOKAD Solúvel®) no México, em Israel e em alguns países da União Europeia (MCFARLAND et al., 2020).

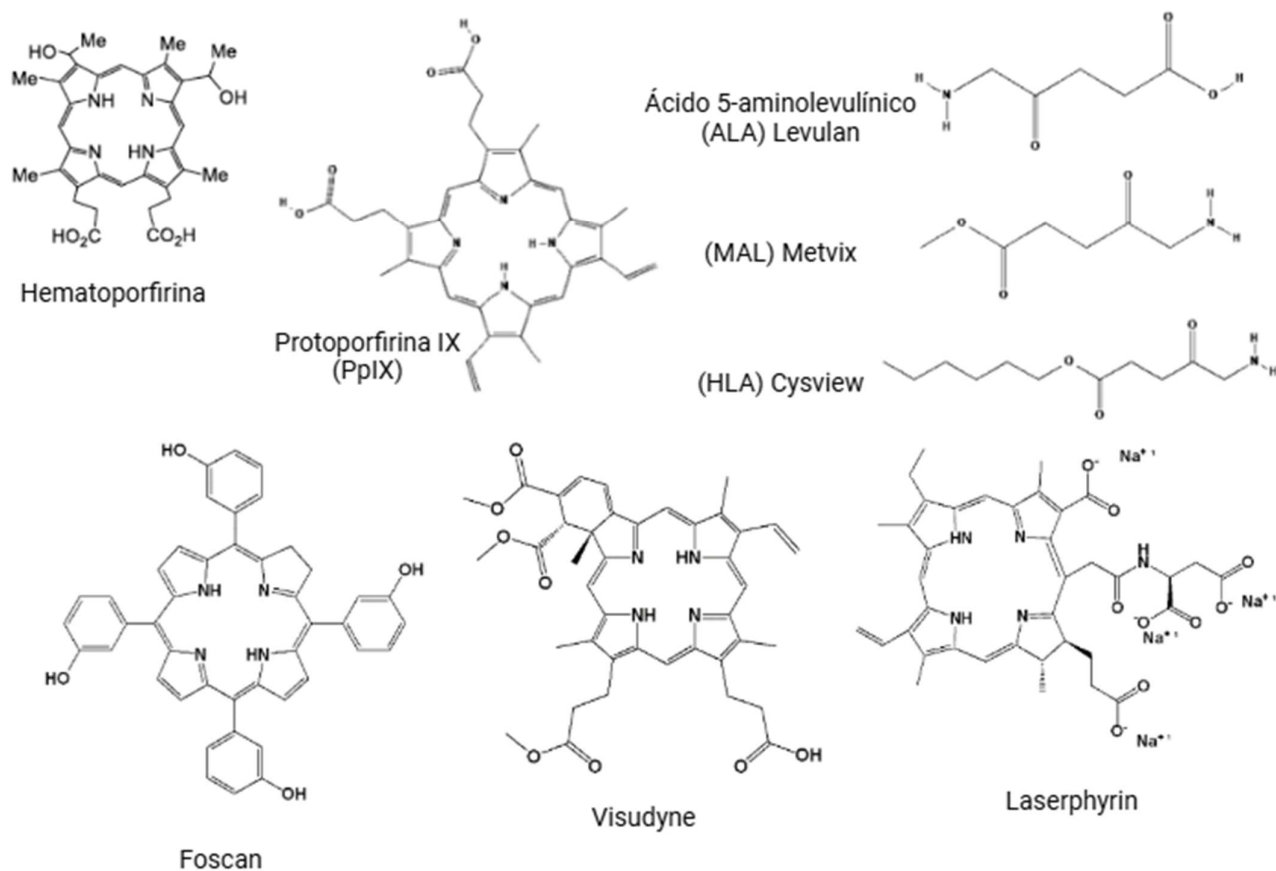


Figura 5: Estruturas moleculares de alguns fotossensibilizadores aprovados comercialmente.

fonte: Autora. Desenvolvido com BioRender.com.

O TFD pode desempenhar um papel significativo no tratamento de pacientes com câncer de pâncreas (principalmente nos casos de câncer não removíveis cirurgicamente). Dois estudos de pesquisa clínica usaram diferentes agentes fotossensibilizadores, clorina e veterporfina (absorção em 690 nm), que são FS de segunda geração, e obtiveram resultados promissores, respectivamente nos trabalhos realizados por BOWN, (2016); HUGGETT et al., (2014). Combinado com outras terapêuticas e nanomedicina, o TFD tem um grande potencial para o tratamento de câncer pancreático (LEE; CHOI; HASAN, 2017).

Atualmente já se discute a combinação da TFD com quimioterapia, visto essa ter baixa seletividade para célula tumoral. A tumorotropidade dos FS modernos e os danos às células tumorais pelos EROs aumentam a sensibilidade dos tecidos afetados aos quimioterápicos, possibilitando a diminuição da dose terapêutica do medicamento e melhora do resultado terapêutico (LIN et al., 2023). Além disso, foi relatada a possibilidade de superar a resistência a múltiplas drogas, o que limita muito o uso da quimioterapia (PLOTNIKOVA et al., 2024; SONGCA, 2023).

2.7 TERAPIA FOTODINÂMICA NO SUS

O Ministério da Saúde incorporou a TFD no SUS no ano de 2023, por ser uma alternativa para o tratamento de pacientes com câncer de pele, do tipo carcinoma basocelular superficial e nodular, os mais comuns no Brasil. Esta técnica apresenta bons resultados, sendo uma alternativa segura e eficiente em casos os quais não são recomendados intervenção cirúrgica. Essa técnica, em muitos casos, pode ser realizada de forma ambulatorial e sem efeitos colaterais importantes (NAÇÕES UNIDAS BRASIL, 2024).

O equipamento para realizar a TFD foi desenvolvido por uma universidade pública, a Universidade de São Paulo (USP), no Instituto de Física de São Carlos. Esse equipamento demonstra o quanto a pesquisa em universidades públicas contribui para a qualidade de vida e bem-estar da população (Nações Unidas Brasil, 2024; BUZZÁ, 2023). A TFD tem se tornado uma excelente opção terapêutica visto a facilidade em treinar profissionais, a simplicidade da técnica e por se tratar em ambulatorios, sem a necessidade de procedimentos operatórios e com risco de infecção desprezível, não necessitando a utilização de antibióticos. Além disso, o custo do equipamento é compatível com a realidade nacional e o medicamento é de produção brasileira (PDT Pharma) (AGOSTINIS et al., 2011).

Os casos encaminhados ao ambulatório do INCA (Instituto Nacional do Câncer) do Rio de Janeiro são submetidos a duas sessões de TFD separadas por sete dias de intervalo. Assim observam-se melhores resultados e menores índices de recidiva. O procedimento realizado nos pacientes se divide em etapas, sendo essas: o preparo da lesão, a aplicação do aminolevulinato de metila (MAL) e finaliza com a aplicação da luz vermelha (630nm). Embora seja um procedimento doloroso na maioria das vezes, geralmente apresenta alta eficácia e resultado cosmético muito satisfatório (BAGNATO; REQUENA, 2023).

O ALA (ácido 5-aminolevulínico) e o MAL têm mecanismos de ação semelhantes, são pró-fármacos que atuam produzindo a protoporfirina IX (PpIX) promovida pelas próprias células. O PpIX é o FS, que acumula na célula e quando irradiado produz danos celulares, característica da TFD. Comparando esses dois pró-fármacos, o MAL, apresenta maior permeabilidade, por ter o grupamento éster, e a ocorrência de dor é bem menos reportada pelos pacientes. Contudo, os dois pró-fármacos apresentaram taxas de sucesso nos tratamentos acima dos 95%, quando comparados às cirurgias, para os casos de carcinoma basocelular (BAGNATO; REQUENA, 2023).

2.8 OS FOTOSSENSIBILIZADORES

Dependendo das características específicas e do tempo de desenvolvimento, os FS são divididos em gerações. Hematoporfirinas são FS de primeira geração, surgiram no século XIX, apresentam-se como uma mistura natural complexa de hematoporfirina oligomérica. Já, os FS de segunda geração superam as limitações dos primeiros, com relação ao comportamento da droga, sendo mais seletivos e necessidade de menores doses para o tratamento, entre esses podemos citar: porfirinas, bacterioclorina, ftalocianinas, clorinas, curcumina, derivados do azul de metileno e outros. Esses são compostos puros, por isso uma previsível relação dose-resposta, diferente de misturas complexas que se apresentam os FS de primeira geração. Os FS de segunda geração exibem uma grande capacidade de absorção e produção de oxigênio singlete. (MFOUO-TYNGA et al., 2021; VAN STRATEN et al., 2017).

Os FS de terceira geração referem-se à FS de segunda geração modificados com conjugados biológicos tais como transportadores, anticorpos ou lipossomas, melhorando suas propriedades físicas, químicas e terapêuticas. Estes compostos possuem maior seletividade para o tecido tumoral, garantem dosagens mais baixas e menos efeitos colaterais indesejados (VAN STRATEN et al., 2017). Os principais objetivos do desenvolvimento de FS de terceira geração são reduzir os efeitos adversos nas células vizinhas e melhorar tanto a farmacocinética como a acumulação tumoral específica destes FS (MFOUO-TYNGA et al., 2021).

O FS do tipo bacterioclorina tem como principal vantagem o seu alto coeficiente de absorção molar na região do infravermelho próximo (comprimento de ondas de 740-780 nm) o que a torna eficiente para o tratamento de tumores localizados profundamente (DABROWSKI; ARNAUT, 2015). Essa faixa de comprimento de onda, que ativa a bacterioclorina, se mostrou particularmente eficaz contra tumores pigmentados, como melanoma maligno (MROZ et al., 2010). Além disso, os FS de segunda geração apresentam menor toxicidade, mas a maioria destes agentes são muito hidrofóbicos e apresentam baixa seletividade tumoral (PASZKO et al., 2011).

A bacterioclorofila, precursor da bacterioclorina, apresentada na figura 6, possui uma estrutura caracterizada por um macrociclo de tetrapirrol. Este macrociclo refere-se a uma molécula formada por quatro anéis de pirrol interligados, criando uma estrutura ampla e cíclica. Os pirróis são unidades químicas compostas por cinco átomos (quatro de carbono e um de nitrogênio), e sua disposição no macrociclo permite a formação de sistemas conjugados de elétrons. Esses sistemas são cruciais para as propriedades de absorção de luz que tornam a bacterioclorofila eficiente em processos fotossintéticos.

Dessa forma, o macrociclo de tetrapirrol desempenha um papel fundamental na

captura e transferência de energia luminosa. Esta estrutura ocorre naturalmente em pigmentos fotossintéticos de bactérias fotossintéticas roxas. A presença de anéis reduzidos no macrociclo de tetrapirrol tem um efeito pronunciado sobre a absorção de espectros, permitindo a captação da luz que penetra mais profundamente através do tecido e contornando a absorção da melanina. As bacterioclorina sintéticas possuem maior estabilidade química e nenhuma suscetibilidade à oxidação aeróbia degradativa (MROZ et al., 2010).

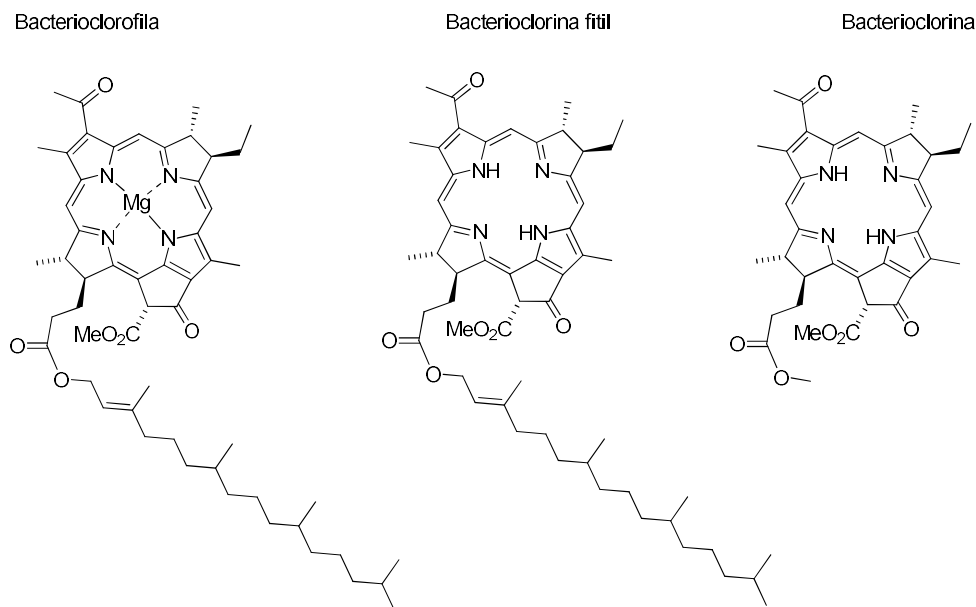


Figura 6: Estrutura Molecular da Bacterioclorofila, Bacterioclorina fitil e da Bacterioclorina. A bactéria púrpura apresenta a bacterioclorofila. Em laboratório é realizada a extração e obtém-se a bacterioclorina fitil. Com esse produto é realizada a transesterificação para obtenção da bacterioclorina.

fonte: Autora

O **TOOKAD Solúvel®**, figura 7, é um derivado do tipo bacterioclorina, o primeiro e único FS à base de paládio aprovado no México e na União Europeia para tratar câncer de próstata de baixo risco com terapia fotodinâmica vascular-direcionada (TFV) (XUE et al., 2022). A TFV atua danificando a vasculatura e alterando o suprimento sanguíneo. O dano ao endotélio vascular é seguido por uma série de eventos, como trombose e oclusão do vaso, levando à necrose tumoral. É um derivado da bacterioclorina (obtido de bactérias), carregado negativamente. **TOOKAD Solúvel®** foi desenvolvido por Salomon, Scherz e colegas de trabalho em Israel, o qual é solúvel em meio aquoso, é a versão melhorada do FS WST09 (GHEEWALA; SKWOR; MUNIRATHINAM, 2017; MCFARLAND et al., 2020).

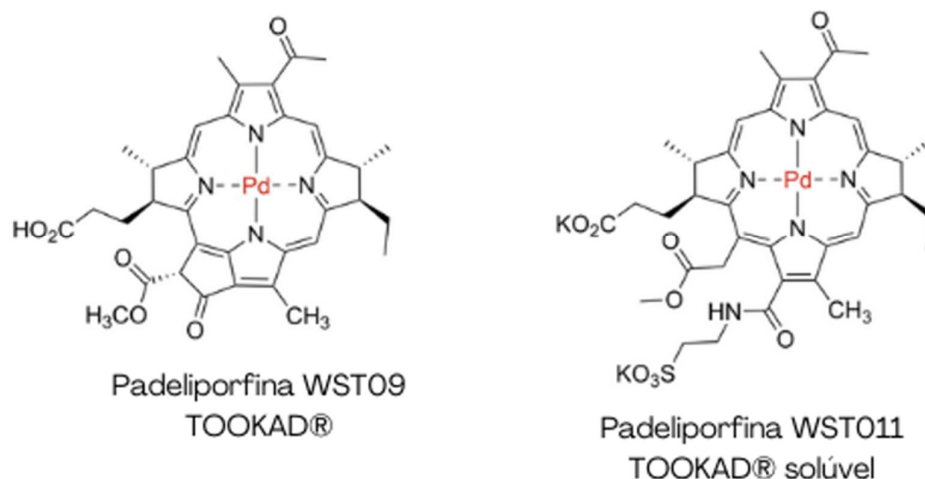


Figura 7: Estrutura Molecular do Tookad® e Tookad Solúvel®.

fonte: MCFARLAND, 2020 (modificado).

A bacterioclorina é proveniente de uma reação de semissíntese, que parte do pigmento, bacterioclorofila, extraída da bactéria *Rhodospseudomonas faecalis*. Essa é uma bactéria Gram negativa e foi descrita a primeira vez em ZHANG et al., (2002), a qual foi isolada, caracterizada e identificada, proveniente de reator anaeróbico que digere fezes de frango.

Bactérias púrpuras não sulfurosas são geralmente foto-heterotróficas, utilizam luz como fonte de energia e compostos orgânicos como fonte de carbono. Diferentes espécies podem usar uma ampla gama de fontes de carbono e doadores de elétrons para a fotossíntese. A espécie citada pertence ao filo Proteobacteria, classe Alphaproteobacteria e possui um flagelo polar (MADIGAN et al., 2016).

2.9 SISTEMA DE CARREAMENTO DE DROGAS – LIPOSSOMAS

Os lipossomas são veículos lipídicos com uma ou mais bicamadas de fosfolípidos, com fase aquosa dentro e entre bicamadas. Os fosfolípidos usados para preparação de lipossomas são constituídos por uma cabeça hidrofílica e duas cadeias hidrofóbicas, como demonstrado na figura 8. Os lipossomas são capazes de se ligar às membranas celulares e fundir-se com elas, liberando seu conteúdo no interior das células. As formulações lipossomais demonstram capacidade de diminuir a tendência do FS para agregar e melhora a acumulação seletiva do tumor (DERYCKE; DE WITTE, 2004).

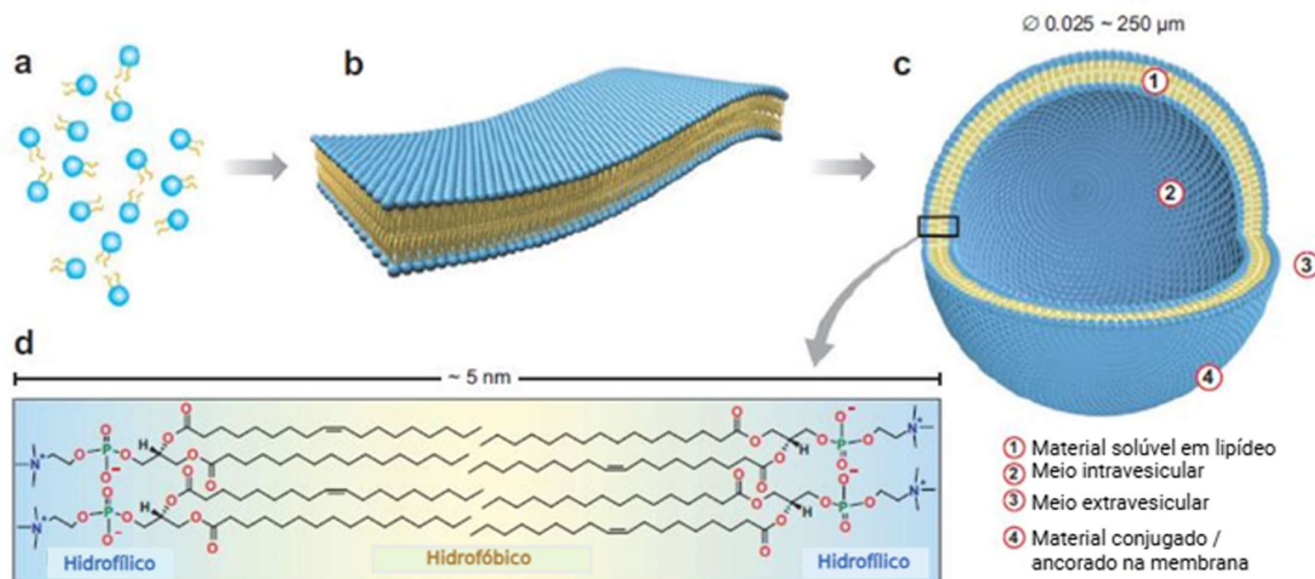


Figura 8: Ilustração esquemática do processo de formação de lipossomas: (a) moléculas individuais de fosfolípidios; (b) folhetos de membrana de bicamada; (c) lipossomas; (d) bicamada lipídica é composta por moléculas lipídicas individuais dispostas ordenadamente com as suas caudas hidrofóbicas voltadas para o interior da bicamada e com os seus grupos polares voltados para o meio aquoso e para o meio exterior ao lipossoma. A bicamada única tem cerca de 5 nm de espessura.

fonte: (JESORKA; ORWAR, 2008) modificado.

A farmacocinética dos lipossomas depende de suas características físico-químicas, como tamanho, carga superficial, estabilização estérica, empacotamento de lipídeos de membrana e vias de administração (KOZLOWSKA et al., 2009). A vantagem do lipossoma é que se trata de um sistema geral de entrega, resolvendo o intrínseco problema de muitos FS como a hidrofobicidade e a baixa solubilidade. Lipossoma é uma estratégia de formulação simples, quando comparado com outras abordagens nanométricas que aumentam o custo de desenvolvimento (PASZKO et al., 2011). Estes compostos possuem maior seletividade para o tecido tumoral, garantem dosagens mais baixas e menos efeitos colaterais indesejados (VAN STRATEN et al., 2017).

A formulação lipossomal acumula-se preferencialmente em tecidos tumorais sólidos devido ao efeito de retenção e permeação intensificada (EPR). Este efeito EPR é mediado por diferenças no tamanho dos poros dos vasos sanguíneos em tecidos tumorais e normais. Embora os vasos normais tenham poros de 5–10 nm de diâmetro, os vasos tumorais têm poros maiores, com tamanho médio de 300 nm. Esta característica permite que os vasos tumorais acumulem vesículas de lipossoma com um diâmetro de 100–250 nm, enquanto os vasos normais são protegidos desta entrega de lipossomas (CHEN; POGUE; HASAN, 2005; ROCHA et al., 2012).

Todo sistema de entrega deve apresentar uma série de características, como:

- ser biodegradável;
- ter pequeno tamanho e elevada capacidade de carga;
- imunogenicidade mínima e não tóxica, não deve causar efeitos secundários;
- deve apresentar circulação prolongada no corpo após a administração;
- tendência mínima de auto-agregação;
- deve acumular-se seletivamente na área requerida em concentração terapêutica com pouca ou mesmo nenhuma absorção por células não-alvo (TORCHILIN, 2007).

Existem vários métodos de formulação lipossomal. Dependendo da estrutura do FS pode-se dissolver em tampão aquoso quando trata-se de um FS hidrofílico ou, quando for um FS hidrofóbico como o Foscan®, são dissolvidos em excipientes orgânicos que podem manter a solubilidade do FS em tampões aquosos após a preparação para administração (BELLNIER et al., 2006). Há ainda outros FS que são formulados em tampão aquosos com utilização de surfactantes como o Tween 80 (GHOSH; CARTER; LOVELL, 2019).

A estrutura e a composição dos lipossomas desempenham um papel importante na estabilidade e na biodisponibilidade lipossomal. Quando esses contêm alta concentração de constituintes lipídicos fluídos, como fosfatidilcolina de ovo são facilmente desestabilizados e liberam seu conteúdo na circulação. Já lipossomas com fosfolípidos e colesterol mais saturados geralmente exibem maior estabilidade na circulação (CHEN; POGUE; HASAN, 2005). No entanto, formulações de FS lipossomal não apenas solubilizam FS para administração, mas podem melhorar seu comportamento fisiológico *in vivo* (GHOSH; CARTER; LOVELL, 2019).

Entre as formulações já existentes, o Visudyne®, primeiro medicamento para TFD aprovado para o tratamento de degeneração macular relacionada com a idade, em 2000, é utilizado para reduzir o risco de perda de visão. O FS verteporfina (um derivado da benzoporfirina) é o principal componente do Visudyne® e sua formulação é caracterizada por um pó lipossomal, verde, liofilizado, que é reconstituído antes da administração intravenosa (CHRISTIE; KOMPELLA, 2008; CRUESS et al., 2009; SHAH et al., 2024). Em 2001, o Visudyne® foi aprovado para o tratamento da miopia patológica (CHRISTIE; KOMPELLA, 2008).

Aprovada clinicamente, uma formulação lipossomal, a clorina, chamada de temoporfina (Foslip®), quando comparado à formulação não-lipossomal de clorina (Foscan®), apresenta elevada eficácia e baixa destruição dos tecidos saudáveis. A clorina Foscan®, FS de segunda geração apresenta características favoráveis para a TFD e foi aprovada para o tratamento de câncer de cabeça e pescoço, na União Europeia e no Japão. Entretanto é uma molécula hidrofóbica e

propensa à agregação, tornando-a menos fotoativa, ligando-as fortemente às proteínas séricas. Contudo, essa clorina foi incorporada em lipossomas peguados e observou-se o aumento de captação tumoral desse FS quando em formulação lipossomal (BOVIS et al., 2012; GARRIER et al., 2011).

SWAMI VETHA et al., (2020) estudaram uma formulação lipossomal de curcuminóides (compostos fenólicos bioativos provenientes da *Curcuma longa*), FS ativado pela luz azul. A formulação foi testada e ao comparar com a molécula não encapsulada, apresentou excelente bioatividade nos ensaios *in vitro*, em células A549 (câncer de pulmão). Os curcuminóides são moléculas pequenas que possuem fracas solubilidade e biodisponibilidade, o que restringe o potencial terapêutico do composto. Entretanto algumas nanoformulações com esses compostos citados têm sido testadas com o lipossoma com melhor potencial clínico (BELFIORE et al., 2018; ROSTAMABADI; FALSAFI; JAFARI, 2019).

Outro estudo comparou a aplicação da formulação lipossomal de clorina e6 di-N-metilglucaminato e resultou num aumento significativo da seletividade de acumulação do FS no tumor em comparação com o tecido normal, conseqüentemente, resultando em um aumento significativo da eficiência fotodinâmica em comparação com a forma farmacêutica original produzida comercialmente (solução aquosa) de Fotoditazin®. Esse FS foi desenvolvido por uma empresa Russa e é aprovado para uso clínico em TFD de tumores superficiais e intracavitários. O liofilizado da forma lipossomal pode ser armazenado em baixa temperatura, mantendo seus parâmetros físico-químicos e atividade antitumoral (avaliada em dispersão lipossomal reidratada) por longos períodos (THI HAI YEN et al., 2012).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAIS

O objetivo deste trabalho é desenvolver uma formulação de nanopartícula capaz de otimizar a utilização do fotossensibilizador (FS) bacterioclorina, reduzindo a quantidade necessária para induzir a morte celular. Para alcançar esse objetivo, realizou-se a comparação entre a atividade fotodinâmica da bacterioclorina na sua forma livre e em formulação lipossomal, avaliando sua eficiência e seu potencial terapêutico *in vitro*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.2.1 Extrair o pigmento da bactéria *Rhodopseudomonas faecalis*;

3.2.2 Realizar modificações estruturais na molécula da bacterioclorina fitil para obter a bacterioclorina;

3.2.3 Produzir um sistema de formulação lipossomal, visando aumentar a seletividade pelo tecido neoplásico e, conseqüentemente, aumentar a eficiência da TFD;

3.2.4 Investigar os efeitos da TFD com a bacterioclorina em formulação lipossomal e na sua forma livre, utilizando diferentes concentrações do FS e diferentes doses de luz em linhagens celulares;

3.2.5 Avaliar a atividade fotodinâmica em linhagens de células tumorais de mama (MCF-7) e pâncreas (MIA-PaCa-2), e comparar com linhagem de células normais de fibroblastos (MRC-5) por métodos estatísticos;

3.2.6 Determinar o tamanho das partículas, índice de polidispersão e potencial zeta da formulação lipossomal, para estabelecer sua estabilidade em curto prazo.

3.2.7 Realizar estudos de fotodegradação para verificar a estabilidade do FS quando iluminado.

4 METODOLOGIA

4.1 CLASSIFICAÇÃO DA PESQUISA

Na seção abaixo será apresentada a metodologia da pesquisa, um estudo experimental, realizado na Universidade Federal da Integração Latino-Americana – UNILA, campus Jardim Universitário e na Itaipu Parquetec. As análises dos lipossomas foram realizadas em colaboração na Universidade de São Paulo, em Ribeirão Preto, no Centro de Nanotecnologia e Engenharia Tecidual.

4.2 PARTE EXPERIMENTAL

4.2.1 Cultivo de *Rhodopseudomonas faecalis*

Inicialmente foi cultivada a bactéria púrpura não sulfurosa *Rhodopseudomonas faecalis*, gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Clovis W.O. de Souza, da UFSCar, em meio de cultura descrito em FANG; LIU; ZHANG, (2005), porém modificado, descrito abaixo:

Fosfato de potássio (K_2HPO_4) 0,5g/L; Sulfato de magnésio hepta hidratado ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) 0,3 g/L; Cloreto de amônio (NH_4Cl) 0,4 g/L; Cloreto de cálcio ($CaCl_2$) 1,2 g/L; Extrato de Levedura 0,6 g/L; Ácido Málico ($C_4H_6O_5$) 1,0 g/L; Succinato de Sódio hexa hidratado ($C_4H_4Na_2O_4 \cdot 6H_2O$) 1,0 g/L; Acetato de Sódio ($C_2H_3NaO_2$) 1,0 g/L; Micronutrientes 2 mL/L, sendo esse: Água (H_2O) 100 mL; Ácido Clorídrico (HCl) 25 μ L; Sulfato de zinco ($ZnSO_4$) 0,001g; Sulfato de manganês ($MnSO_4$) 0,001 g; Ácido bórico (H_3BO_3) 0,007 g; Cloreto de cálcio ($CaCl_2$) 0,004 g; Sulfato de cobre ($CuSO_4$) 0,002 g; Molibdato de sódio ($NaMoO_4$) 0,004 g.

O pH foi acertado para 7,0 com hidróxido de sódio (NaOH) 3M e autoclavado. Após, foi adicionado 0,5 mL/L de sulfato ferroso hepta hidratado ($FeSO_4 \cdot 7 H_2O$) 0,15% estéril. O cultivo ocorreu em garrafas de 1L devidamente tampadas em temperatura ambiente e na presença de luz amarela incandescente de 100 W.



Figura 9: Garrafas com cultivo de bactéria púrpura *Rhodospirillum rubrum*.

Após o crescimento bacteriano, o material foi centrifugado (Solab SL-701) a 6000 rpm por 10 min, na temperatura de 10° C. O pellet formado foi liofilizado no liofilizador Solab SL-404 sob pressão de 43000 uHg, na temperatura de -30° C por 8h (Laboratório de Microbiologia, Jardim Universitário, UNILA).

4.2.2 Extração da bacterioclorina fitil

Em balão de 100 mL de fundo redondo adicionou-se 5g de bactéria liofilizada e 30 mL de solução metanol/ácido sulfúrico 5%, sob atmosfera de argônio, protegido da luz, por 30 min. A amostra foi filtrada em papel filtro e foi adicionando diclorometano até o filtrado sair transparente. Adicionou-se solução de bicarbonato de sódio até pH 7,0. Transferiu-se para balão de separação e obteve-se a parte orgânica, inferior, na qual se adicionou sulfato de sódio, para retirar resquícios de água, e filtrou-se novamente em algodão. O solvente foi evaporado, em rotaevaporador (IKA, MVP

10 basic RV8, Brasil) a 40° C, 100 rpm. Foi armazenado a -20° C (PRATAVIEIRA et al., 2021).

4.2.3 Obtenção da bacterioclorina por transesterificação

Na amostra de bacterioclorina fitil obtida na seção acima foi adicionado 25 mL de diclorometano sob agitação. O balão foi fechado e ficou sob atmosfera de argônio. Adicionou-se 20 mL de solução de metanol/ácido sulfúrico 5% e foi mantido reagindo nessas condições por 8h. Depois transferiu para *Becker* e adicionou solução de bicarbonato até pH 7,0. Foi para o funil de separação onde obtém-se a parte orgânica, inferior, com a bacterioclorina. Evaporou-se o solvente e tem-se a bacterioclorina em uma reação com rendimento de aproximadamente 0,2%. Armazenada a -20° C (PRATAVIEIRA et al., 2021). As reações foram realizadas no Laboratório de Tecnologias e Processos Sustentáveis (LATEPS), da UNILA.

4.2.4 Purificação e caracterização da bacterioclorina

Para a purificação, a amostra de bacterioclorina foi solubilizada em solução diclorometano/metanol a 5% colocada em coluna de cromatografia empacotada com sílica gel 0,063-0,2 mm / 70 -230 mesh (Macherey-Nagel) e foi eluída com diclorometano depois metanol. Foram unidas as frações contendo bacterioclorina e evaporada, em rotaevaporador, até saída total do solvente para obtenção da amostra pura, a qual foi caracterizada por ressonância magnética nuclear e o espectro condizente com o espectro apresentado em (PRATAVIEIRA et al., 2021).

4.2.5 Espectroscopia de Varredura

As análises UV-Vis foram realizadas no equipamento Evolution 201 (Thermo Fisher Scientific, EUA), no Laboratório de Estudos Interdisciplinares do Meio Ambiente e Alimentos (LEIMAA), UNILA. Foi realizado o espectro de varredura de 300 até 850 nm, em triplicata, da bacterioclorina dissolvida em diclorometano.

UV-Vis (diclorometano): $\lambda_{\text{máx.}}$, (nm): 359; 527; 682; 752.

4.2.6 Preparo das Soluções de bacterioclorina livre para TFD

A solução estoque do fármaco fotossensibilizador foi preparada dissolvendo 1 mg de bacterioclorina em 100 μ L de DMSO. A partir dessa foi preparada a solução que foi usada na TFD, sendo 10 μ L de solução estoque em 990 μ L de PBS (pH 7,4), obtendo a concentração de 160 μ M. As sucessivas diluições foram realizadas em PBS para, posteriormente, serem distribuídas em seus respectivos poços.

4.2.7 Preparo da formulação de lipossomas “vazios”

As formulações de lipossomas “vazios” foram preparadas pelo método de hidratação de filme já estabelecido, porém com modificações (SILVA; FRANCHI; TEDESCO, 2016; ZHANG et al., 2014). Em balão de fundo redondo de 250 mL adicionou-se 400 mg de fosfatidilcolina de soja (Lipoid S-100, Lipid Ingredients, Brasil) e 60 mg de colesterol (Sigma Aldrich, EUA) e uma solução diclorometano:metanol (2:1 v/v). Agitou o balão até completa dissolução dos componentes e rotaevaporada a 40° C até completa eliminação do solvente.

O filme formado foi hidratado com 10 mL de PBS (pH 7,4). Essa formulação passou por emulsificação em disruptor celular com micro ponta de titânio (QR550, Ecosonics), amplitude de 40% por 2 min em banho de gelo.

Na sequência, essa formulação passou pelo processo de extrusão (mini extrusor com bloco de aquecimento – Avanti Polar Lipids, EUA) em membrana 0,2 μ m por 11 vezes e 0,1 μ m por mais 11 vezes, a temperatura de 57° C. As formulações foram armazenadas a 4° C ao abrigo da luz até sua utilização.

O processo incluiu a produção de um lote utilizando um tampão alternativo. Para a hidratação do filme, foram adicionados 10 mL de TRIS:HCl. Os resultados relacionados a essa formulação estão detalhados no Anexo A. Posteriormente, o tampão foi substituído por PBS, uma escolha que demonstrou manter a viabilidade celular nos controles realizados.

4.2.8 Preparo da formulação de lipossomas com fotossensibilizador

As formulações de lipossomas com o FS foram preparadas conforme descrito anteriormente, com a diferença que essa preparação contém a bacterioclorina, a qual foi previamente dissolvida no diclorometano (0,1 mg de bacterioclorina/mL de solução final). Foi utilizado 1 mg de

FS, pois o volume final de formulação foi de 10 mL.

Em balão de fundo redondo de 250 mL adicionou-se 400 mg de fosfatidilcolina de soja (Lipoid S-100, Lipid Ingredients, Brasil) e 60 mg de colesterol (Sigma Aldrich, EUA) e uma solução diclorometano:metanol (2:1 v/v). Nesse diclorometano foi dissolvido a Bcl e depois adicionou-se o metanol. Agitou o balão até completa dissolução dos componentes e rotaevaporada a 40° C até completa eliminação do solvente.

O filme formado foi hidratado com 10 mL de PBS (pH 7,4). Essa formulação passou por emulsificação em disruptor celular com micro ponta de titânio (QR550, Ecosonics), amplitude de 40% por 2 min em banho de gelo.

Na sequência essa formulação passou pelo processo de extrusão (mini extrusor com bloco de aquecimento – Avanti Polar Lipids, EUA) em membrana 0,2 µm por 11 vezes e 0,1 µm por mais 11 vezes, a temperatura de 57° C. As formulações foram armazenadas a 4° C ao abrigo da luz até sua utilização.



Figura 10: Foto da formulação de lipossomas com bacterioclorina (cor púrpura) em mini extrusor sobre o bloco de aquecimento.

4.2.9 Estudo de Fotodegradação

Soluções de Bcl livre e Bcl lipossomal com uma absorbância de aproximadamente 0,8 foram preparadas. Acondicionadas em cubeta de vidro, foram irradiadas no comprimento de onda de 760

nm com uma intensidade de $10,4 \text{ mW/cm}^2$ por 48 minutos. A cada 2 min os espectros de absorvância foram medidos e posteriormente observados em 760 nm (DA CRUZ RODRIGUES et al., 2024; ULIANA et al., 2022).

4.2.10 Determinação do Tamanho de Partícula, Índice de Polidispersão e Potencial Zeta

O diâmetro hidrodinâmico das partículas e índice de polidispersão (IPD) foram determinados por espectroscopia de fotocorrelação, por espelhamento dinâmico de luz (DLS), no equipamento Nano ZetaSizer™ (ZEN3600, Malvern instruments, U.K), no modo de operação de laser He-Ne que opera em 633 nm, ângulo de espalhamento à 173° e temperatura à 25°C .

Os lipossomas foram diluídos na proporção 1:100 (v/v) em água Mili-Q filtrada (membranas de diâmetro de $0,22 \mu\text{m}$). O potencial zeta das partículas foi determinado por mobilidade eletroforética no mesmo equipamento.

4.2.11 Linhagens e culturas celulares

Neste trabalho foram utilizadas as linhagens de células tumorais:

- MIA PaCa-2, caracterizada por tecido tumoral epitelial pancreático humano, derivado de carcinoma e é registrada no ATCC sob o número CRL-1420;

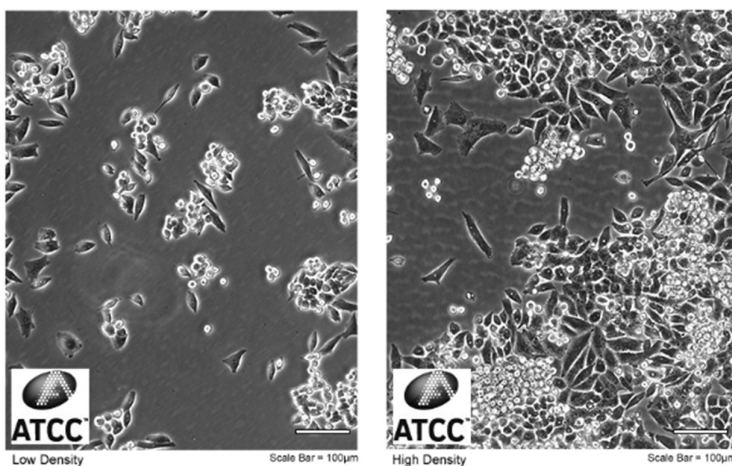


Figura 11: Células tumorais de pâncreas MIA PaCa-2. À esquerda em crescimento e à direita em confluência.

fonte: <https://www.atcc.org/products/crl-1420>

- MCF-7, derivada de tecido tumoral epitelial de glândula mamária humana, derivado de adenocarcinoma e está registrada no ATCC sob o número CRL-3435. Essa linhagem

celular foi gentilmente fornecida pelo Prof. Dr. Rodrigo P. Araldi, do Instituto Butantan – SP.

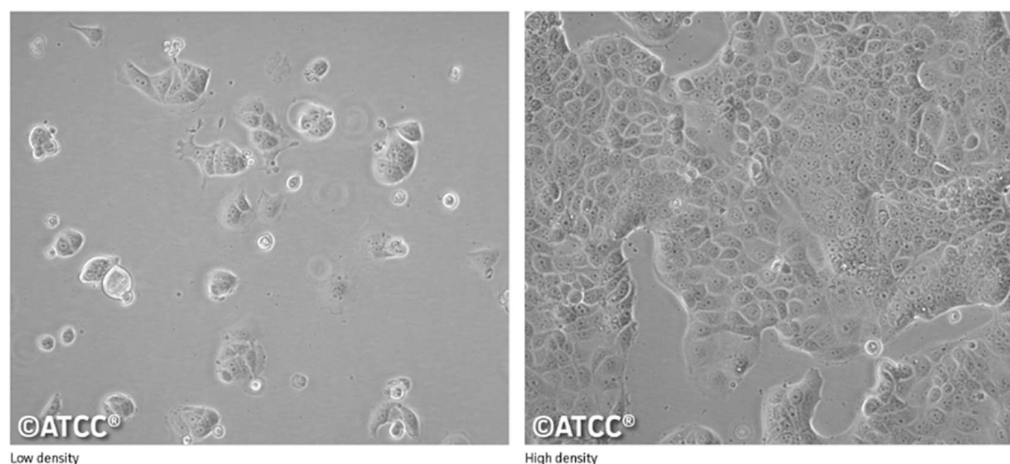


Figura 12: Células tumorais de mama MCF-7. À esquerda em crescimento e à direita em confluência.

fonte: <https://www.atcc.org/products/crl-3435>

Também foi empregada a linhagem de células normais MRC-5, que está registrada no ATCC sob o número CCL-171, é composta por fibroblastos isolados do tecido pulmonar de um embrião humano branco, do sexo masculino, com 14 semanas de idade, obtidos por J.P. Jacobs em 1966. Essas células são capazes de realizar entre 42 e 46 divisões populacionais.

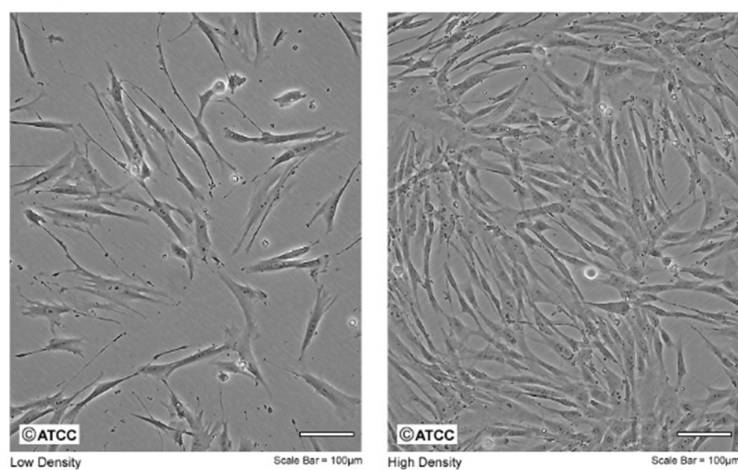


Figura 13: Células normais de fibroblastos MRC-5. À esquerda em crescimento e à direita em confluência.

fonte: <https://www.atcc.org/products/ccl-171>

As três linhagens foram cultivadas em meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM, Vitrocell, Brasil) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB, Nova

Biotechnology, Brasil) e 1% de penicilina/estreptomicina (100U/mL de penicilina e 100 µg de estreptomicina, Sigma-Aldrich, EUA). As garrafas de cultivo foram mantidas em estufa (Thermo Fisher, EUA) em condições de umidade a 37° C, atmosfera de 5% CO₂.

4.2.12 Crescimento, contagem e plaqueamento de células

As linhagens celulares (de 0,5 até 1 x 10⁶ cel/ mL) estavam estocadas a -80° C em criotubos foram descongeladas e adicionadas a 10 mL de meio de cultura DMEM com 10% SFB e antibiótico (meio completo, previamente descrito no item 4.2.6), em tubos Falcon e centrifugados a 1200 rpm por 10 min, para retirada do dimetilsulfóxido (DMSO). Descartado o sobrenadante, o *pellet* foi ressuspensionado em meio completo e acondicionado em garrafas estéreis de cultivo celular com tampa contendo filtro de 75cm² (Nest, China), incubado em estufa em condições de umidade a 37° C, atmosfera de 5% CO₂.

A cada dois ou três dias o meio de cultura era substituído e a garrafa era observada em microscópio invertido (Nikon Eclipse Ti-S, Japão) para verificar se a cultura estava confluenta. Quando a cultura celular atingia a confluência — ou seja, quando as células preenchiam completamente a superfície da garrafa de cultivo —, era realizado o processo de tripsinização. Esse procedimento consiste em tratar as células com uma solução de tripsina, uma enzima que promove o desprendimento das células aderentes ao recipiente. O objetivo da tripsinização era reduzir a densidade celular, evitando a sobrecarga que poderia levar à falta de nutrientes e espaço, fatores que resultariam na morte celular. Após o desprendimento, as células podiam ser redistribuídas em novas garrafas ou placas, garantindo o crescimento saudável e contínuo da cultura. Em fluxo laminar, o meio era descartado, as garrafas eram lavadas duas vezes com 4 ml de solução salina tamponada com fosfato (PBS) estéril. Após a lavagem era adicionado 1,5 mL de tripsina (1%) (Inlab Confiança, Brasil) em PBS e após aguardava-se 3 min na estufa, até o desprendimento das células da garrafa. Em seguida era adicionado 5 mL de meio completo para inativação da tripsina, transferido para Falcon e centrifugado a 1200 rpm por 10 min. Descartado o sobrenadante, o *pellet* era ressuspensionado em 1 mL de meio completo.

Para a contagem das células e verificação da viabilidade celular foi utilizado o método azul de tripan (0,4% m/v, Gibco). Em tubo *ependorf* de 1,5mL era adicionado 10 µL de amostra de célula (que estava em 1 mL de meio completo) mais 10 µL de azul de tripan, homogeneizado. Aguardado 2 minutos, 10 µL era transferido para câmara de *Neubauer*. Por ser um corante que adentra células mortas ou com a membrana celular comprometida, o azul de tripan é um

marcador de células mortas, que ficam azuis ao observar no microscópio óptico. Contou-se as células que permaneceram incolores. Foi utilizada câmara de *Neubauer* para a contagem e determinação do número de células viáveis.

As placas de 96 poços foram preenchidas com 1×10^4 células/poço com 100 μL de meio completo, incubadas por 24h em estufa a 37°C , atmosfera de 5% CO_2 , para aderência ao fundo.

4.2.13 Terapia Fotodinâmica

Dois estudos foram conduzidos em paralelo: avaliação de citotoxicidade (sem exposição à luz) e terapia fotodinâmica (TFD). Ambos seguiram o mesmo protocolo experimental, com a diferença de que as placas destinadas à análise de citotoxicidade permaneceram no escuro durante todo o experimento. Nesse grupo, as células foram mantidas no escuro por 20 minutos para absorção do fotossensibilizador, seguidos de mais 48 minutos para simular o tempo equivalente à exposição ao LED do grupo de TFD tratado com 30 J/cm^2 , que foi o grupo com maior tempo de irradiação. Já no estudo de TFD, as placas irradiadas variaram conforme a intensidade aplicada: o grupo 15 J/cm^2 foi exposto ao LED por 24 minutos, enquanto o grupo 30 J/cm^2 recebeu irradiação por 48 minutos.

Para realizar esse estudo, todas as diluições foram realizadas em PBS e os controles utilizados foram:

- Controle Negativo – grupo sem fármaco fotossensibilizador e sem irradiação, manteve-se com PBS durante o tempo de incubação;
- *LED* – grupo submetido a irradiação na presença de PBS, apenas;
- DMSO – grupo submetido a irradiação na presença de apenas 0,125% DMSO dissolvido em PBS (quantidade presente como solvente, no grupo $20 \mu\text{M}$ de fotossensibilizador).
- LIP ϕ 1 – grupo com lipossoma vazio, sem o fotossensibilizador, na quantidade de lipossomas presente no tratamento de $1 \mu\text{M}$.

Além dos controles, os grupos de tratamento foram os seguintes:

- Bacterioclorina livre nas concentrações $0,1 \mu\text{M}$; $0,5 \mu\text{M}$; $1,0 \mu\text{M}$; $10 \mu\text{M}$; $20 \mu\text{M}$;
- Bacterioclorina em formulação lipossomal nas concentrações: $0,001 \mu\text{M}$; $0,025 \mu\text{M}$; $0,05 \mu\text{M}$; $0,1 \mu\text{M}$; $0,5 \mu\text{M}$; $1,0 \mu\text{M}$;

Foi removido o meio de cultura de três placas com células, preparadas como descrito na seção anterior, pois o meio de cultura DMEM contém vermelho de fenol, substância que pode interferir na passagem da luz e conseqüentemente afetar os resultados. Depois, foram lavadas

duas vezes com PBS (140 e 200 μL) e cada componente foi adicionado em seu poço, em triplicata, no volume de 100 μL . Foi incubado por 20 min ao abrigo da luz na estufa, com a finalidade de absorção do FS pelas células e, posteriormente, irradiou a primeira placa a 15 J/cm^2 , e a segunda a 30 J/cm^2 . A terceira placa, controle, ficou o tempo designado ao abrigo da luz, na estufa.

O equipamento *Biotable* (Biolambda, Brasil) fornece a fonte de luz infravermelha de forma homogênea a todos os poços, a base de lâmpadas *Light Emitting Diode (LEDs)*, no comprimento de onda de 760 nm (Figura 14) com irradiância de 10,4 mW/cm^2 .



Figura 14: Biotable (Empresa Biolambda) – LEDs 760 nm. Nessa biotable é possível regular a irradiância e a dose de luz, em J/cm^2 .

Na sequência, foram retirados os componentes de cada poço e as placas foram lavadas duas vezes com PBS. Adicionou-se 100 μL de meio completo e incubou-se na estufa por 24 h. Foram realizados três ensaios independentes para cada linhagem celular.

4.2.14 Determinação da atividade metabólica celular – MTT

Para avaliar, por espectrofotometria, a atividade mitocondrial e por consequência a viabilidade celular, foi utilizado o método de redução do sal de tetrazólio amarelo (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio), comumente conhecido como MTT, para cristais de formazan de coloração roxa, por células metabolicamente ativas. Ao detectar a coloração roxa, é possível verificar a quantidade de células que estavam vivas, o que indica o grau de citotoxicidade do tratamento em questão.

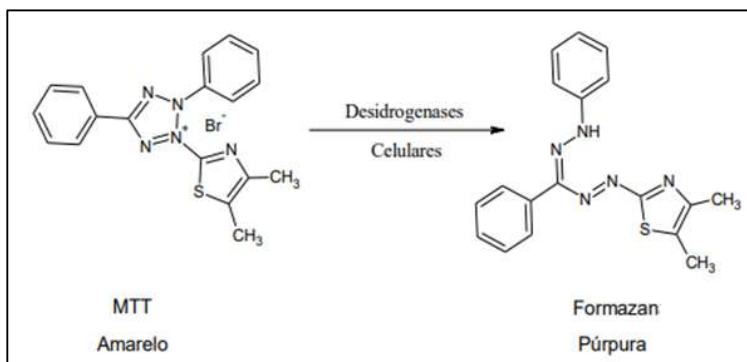


Figura 15: Estruturas do MTT. Reação de metabolização do MTT em cristais de formazan, por mitocôndrias de células viáveis.

fonte: Google imagens.

Após o tratamento e incubação na estufa por 24 h, foi adicionado aos 100 μ L de meio completo 10 μ L de MTT (0,5 mg/mL concentração final), e aguardou por 4h a 37° C, atmosfera de 5% CO₂. Na sequência, o meio foi retirado e adicionado 100 μ L de DMSO para dissolução dos cristais formados. Concluída essa etapa, a placa foi para o leitor de microplacas (Loccus, LMR-96, Brasil), em programa com 1,5 min de agitação lenta e medidas de absorbância no comprimento de onda de 570 nm, descontando a absorbância de 630 nm, para deixar livre de interferências de fundo.

A viabilidade celular foi calculada considerando 100% os valores de absorbância do controle negativo, ou seja, a amostra que não teve nem tratamento nem irradiação.

4.2.15 Cálculo do IC₅₀ (Concentração Inibitória Média em 50% da sobrevivência celular)

O cálculo do IC₅₀ foi realizado utilizando o software GraphPad Prism versão 8.0.2 e o Excel (Microsoft 365). Primeiramente, no Excel, os dados obtidos de densidade óptica no MTT foram transformados para porcentagem, sendo definido 100% os valores do controle sem tratamento e sem irradiação, e considerados os valores de Y. Os valores de Y foram copiados para o

programa GraphPad Prism. Os valores de concentração de FS foram transformados em Log [FS], considerado como valor de X, diretamente no nesse software. Então foi realizada uma regressão não linear. O R^2 , o coeficiente de determinação, apresenta valores de $0 < R^2 < 1$, sendo que mais próximo de 1 apresenta-se como um modelo adequado de teste estatístico, ou seja, os valores de IC_{50} são determinados e influenciados pelas variáveis analisadas.

4.2.16 Análise estatística entre os grupos de variáveis

Os resultados de absorvância obtidos foram analisados estatisticamente com o software GraphPad Prism versão 8.0.2. Os grupos experimentais foram comparados parametricamente por análise de variância – ANOVA e, depois, o teste de Tukey para comparação múltipla, sendo considerados significativos os valores $p < 0,05$, com um intervalo de confiança de 95%.

Os dados obtidos de densidade óptica no MTT foram transformados para porcentagem no Excel, sendo definido 100% os valores do controle sem tratamento e sem irradiação. Cada grupo apresenta um valor, em porcentagem, que representa a taxa de sobrevivência em cada tratamento. Os gráficos foram realizados no programa GraphPad Prism 8.0.2.

No início desse trabalho, foi proposto trabalhar com a bacterioclorina fitil e a bacterioclorina, que apresenta o grupo metoxi, pois se a primeira molécula fosse efetiva, seria mais econômica reduzindo o tempo de preparo e o consumo de reagente, conseqüentemente, sendo mais sustentável. No entanto, o lipossoma com a bacterioclorina fitil apresentou tamanho grande, na média de 257,8 μm quando comparado a outros lipossomas, o que tornou o processo de extrusão inviável. Por isso o trabalho teve continuidade apenas com o FS bacterioclorina metoxi (chamada apenas de bacterioclorina). A bacterioclorina fitil não seria um bom FS na forma livre, sem estar encapsulada, pois o grupo fitil é bastante apolar e dificulta sua solubilização em meio biológico. Desta forma a transesterificação substitui o grupo fitil pelo grupo metoxi, deixando a molécula um pouco mais solúvel. Após a obtenção, o FS foi purificado por cromatografia e caracterizado por RMN.

5.2 ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO

A espectroscopia de varredura, conforme apresentado na figura 17, revelou o espectro de absorção da Bcl, a qual apresenta banda de Soret em aproximadamente 350 nm e banda Q em aproximadamente 760 nm, desejada para a TFD, pois está na “janela terapêutica”. Esse termo corresponde a região do comprimento de onda o qual não ocorre absorção por componentes como melanina, água ou outras moléculas fotoativas endógenas, e está entre 600 e 800 nm.

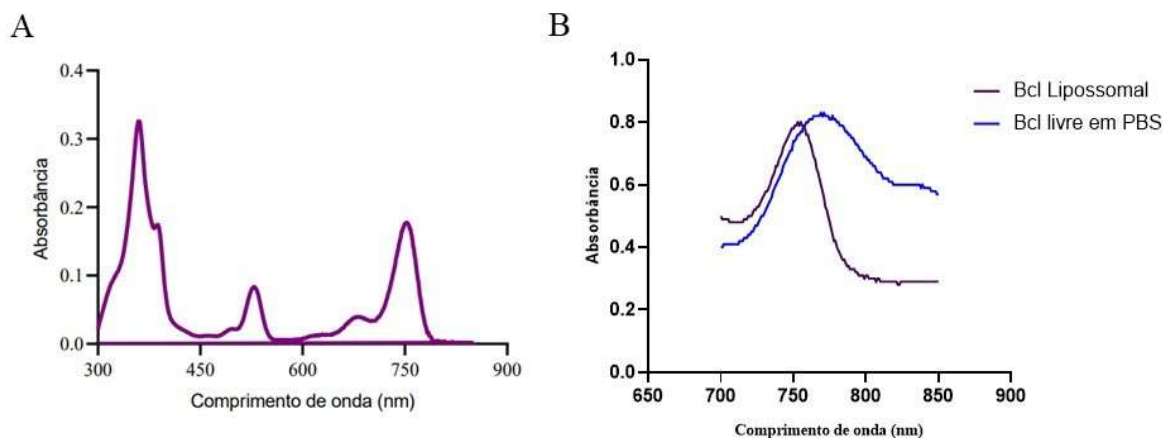


Figura 17: Espectro de absorção da bacterioclorina a 25 °C. No gráfico (A), apresenta-se a bacterioclorina (Bcl) solubilizada em diclorometano, com varredura espectral realizada entre 300 e 800 nm. No gráfico (B), são exibidos os espectros das formulações de Bcl na forma livre e lipossomal, ambas em PBS, com varredura conduzida no intervalo de 700 a 850 nm para a detecção da banda Q. As medições foram iniciadas a partir de uma solução concentrada, tanto em diclorometano quanto nas formulações em PBS, sendo progressivamente diluída até que as absorbâncias se situassem no intervalo de 0,3 a 0,8.

5.3 ESTUDO DE FOTODEGRADAÇÃO

Muitos dos FS utilizados na TFD sofrem degradação pela ação da luz (STRATONNIKOV; MEEROVICH; LOSCHENOV, 2000), de modo que os mesmos mecanismos responsáveis pela eficácia da TFD podem também destruir o FS. Sabe-se que diferentes FS apresentam taxas de degradação variadas e a estabilidade do FS pode representar uma desvantagem ou uma vantagem (ROTOMSKIS; STRECKYTE; BAGDONAS, 1997a, 1997b). Se o FS se degradar rapidamente, a destruição do tumor poderá não ser completa quando a concentração do FS não fotodegradado nos tecidos diminuir após a iluminação. Por outro lado, a lesão fotodinâmica irreversível nos tecidos normais ao redor do tumor, que geralmente retêm menos FS, pode ser significativamente evitada com a diminuição na concentração da molécula ativa nessas células (MENEZES; BAGNATO, 2005).

No estudo de fotodegradação, observa-se a diminuição da absorbância da Bcl livre ao irradiá-la no comprimento de onda de 760 nm por 48 min, a 10.4 mW/cm². Portanto, a concentração da Bcl, quando livre em tampão PBS, vai caindo durante o processo de TFD, em que se irradia o FS. Ao observar o gráfico da figura 18, tem-se a concentração da Bcl encapsulada em lipossomas permanece relativamente estável durante o processo de TFD. Dessa forma, sugerimos que o lipossoma protege a Bcl de degradação por irradiação, o que pode ser parte da explicação para o melhor desempenho da formulação lipossomal.

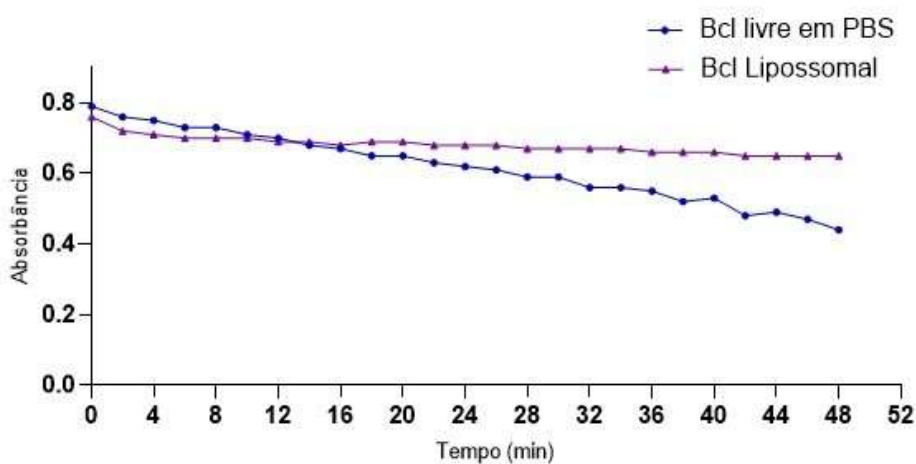


Figura 18: Estudo de fotodegradação. As amostras Bcl livre em PBS e lipossomal foram preparadas em concentração inicial próxima a 0,8, acondicionada em cubeta de vidro e irradiada na Biotable, a 760 nm, com irradiância de 10.4 mW/cm². A absorbância foi verificada a cada 2 min em espectrofotômetro, no total de 48 min, no comprimento de onda de 760 nm, banda Q.

5.4 ESTUDO DOS LIPOSSOMAS

Foram preparadas duas formulações para serem analisadas na Universidade de São Paulo, no Centro de Nanotecnologia e Engenharia Tecidual, onde foi realizado os estudos de tamanho de partícula, índice de polidispersão (IPD) e potencial zeta, das formulações seguintes:

- lipossoma “vazio”, sem o FS (Lip ϕ);
- lipossoma com FS bacterioclorina (Lip Bcl).

O estudo foi realizado com análises sequenciais durante 4 semanas, a qual determinou a estabilidade de curto prazo, como observado na figura 19. Não houve modificações significativas no tamanho de partícula nem no IPD, confirmando que a formulação é estável por no mínimo um mês.

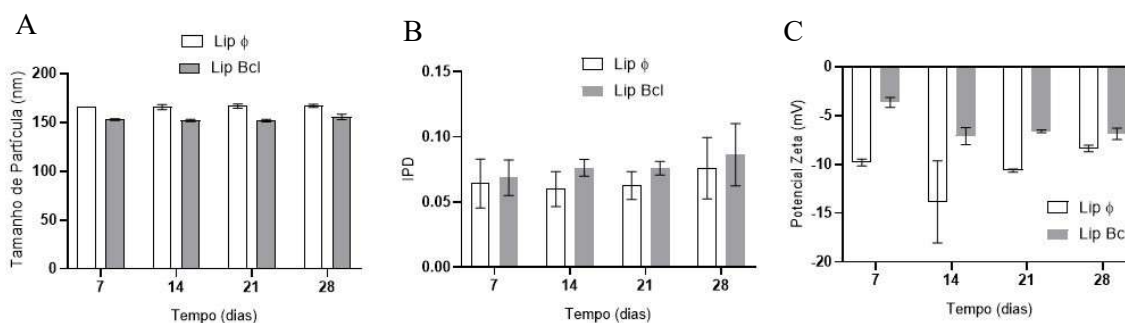


Figura 19: Monitoramento da estabilidade após preparação da formulação. A análise ocorreu uma vez na semana por 28 dias, em triplicata cada análise. Tamanho médio de partícula (A), índice de polidispersão (B) e potencial zeta (C) da formulação lipossomal com Bcl (Lip Bcl) e sem Bcl (Lip ϕ).

O diâmetro das partículas é crucial na farmacologia, pois influencia diretamente a dissolução, biodisponibilidade e absorção de medicamentos. Vesículas com tamanho nanométrico podem ser absorvidas mais eficientemente pelas células, o que é essencial para a liberação controlada do medicamento. Além disso, a uniformidade no tamanho das partículas garante uma liberação consistente do fármaco (BARBUGLI et al., 2010; BRUXEL et al., 2012). Leva-se em consideração também que vesículas pequenas (menores de 200 nm) são reconhecidas e fagocitadas mais lentamente, permanecendo mais tempo na circulação sanguínea, já as vesículas grandes são rapidamente removidas da circulação por macrófagos, além de aumentar o risco de embolia (BRUXEL et al., 2012).

Os resultados da análise granulométrica são promissores, indicando que os lipossomas projetados possuem um diâmetro médio inferior a 200 nm e um índice de polidispersão (IPD) inferior a 0,1. Isso sugere uma distribuição de tamanho de partícula estreita e unimodal, o que é ideal para garantir a homogeneidade das formulações coloidais. A homogeneidade é essencial para assegurar que cada partícula ou vesícula carregue uma dose consistente do medicamento, contribuindo para uma liberação eficaz do fármaco no organismo (BARBUGLI et al., 2010).

O potencial zeta é uma medida fundamental na caracterização de coloides. Representando a carga superficial ou o potencial eletrocinético das partículas, ele é expresso em milivolts (mV) e é importante para entender a estabilidade de dispersões coloidais. Valores de potencial zeta superiores a +30 mV ou inferiores a -30 mV são indicativos de uma dispersão estável. Isso ocorre porque tais valores sugerem que as forças de repulsão elétrica entre as partículas são suficientemente fortes para contrariar as tendências de agregação (BRUXEL et al., 2012; CALORI, 2016; SILVA, 2013).

A agregação de partículas em uma dispersão coloidal pode levar à instabilidade, resultando em fenômenos indesejados como a sedimentação ou a floculação. Por isso, a medição do potencial zeta é uma ferramenta valiosa, pois permite prever a estabilidade a longo prazo de formulações coloidais. Em sistemas onde as partículas possuem tamanhos médios na faixa nanométrica e uma distribuição de tamanho unimodal, a estabilidade é particularmente crítica, pois qualquer variação pode afetar significativamente as propriedades e a funcionalidade do coloide.

Portanto, o monitoramento do potencial zeta não apenas fornece informação sobre a carga superficial das partículas, mas também serve como um preditor confiável da estabilidade coloidal. Isso é especialmente importante em aplicações industriais e farmacêuticas, onde a consistência e a eficácia dos produtos dependem diretamente da estabilidade das suas dispersões coloidais. Observou-se que as vesículas apresentaram um valor médio de potencial zeta não ideal, ou seja, entre -4 e -9 mV (Lip Bcl), portanto não indicam estabilidade podendo estar proclives a sedimentação e floculação a longo prazo.

5.5 CITOTOXICIDADE EM FORMULAÇÕES COM PBS

A citotoxicidade da formulação lipossomal e da bacterioclorina na forma livre, avaliada por meio de testes conduzidos no escuro, foi investigada em três diferentes linhagens celulares, incluindo duas tumorais (MCF-7 e MIA PaCa-2) e uma normal (MRC-5). Os fotossensibilizadores de aplicação em neoplasias devem possuir como características baixa toxicidade

no escuro e acúmulo preferencial no tecido do tumor, além do que as formulações lipossomais devem ser inertes (BARBUGLI et al., 2010). Dessa forma a etapa desse trabalho que demonstra essa questão será abaixo debatida, mostrando os gráficos referentes a toxicidade no escuro (citotoxicidade) nas três linhagens. Todos os experimentos de TFD desde esse item até o final do trabalho foram realizados em tampão PBS.

Concomitantemente foram realizados experimentos de citotoxicidade (sem irradiação) e de TFD, pois realizou-se três placas de cultivo, sendo duas para TFD (15 e 30 J/cm²) e uma para citotoxicidade, além disso esses experimentos foram realizados em triplicata técnica e triplicata biológica, ou seja, cada concentração de FS foi testada em triplicata na mesma placa e esse experimento repetido três vezes.

Na Figura 20, são apresentados os resultados dos testes de citotoxicidade obtidos pela técnica de detecção com MTT, que avalia a atividade mitocondrial das células viáveis. Esse método gera um substrato de coloração roxa detectável por espectroscopia. As placas utilizadas nos experimentos foram preparadas e incubadas no escuro. O controle consistiu em células tratadas apenas com PBS, representando 100% de sobrevivência celular. A barra correspondente ao tratamento com DMSO 0,125% diluído em PBS demonstra que o solvente do FS, na maior concentração testada (20 µM), não exerce efeito tóxico. Além disso, são apresentadas as diferentes concentrações do FS, tanto na forma livre (Bac) quanto na formulação lipossomal (LIP).

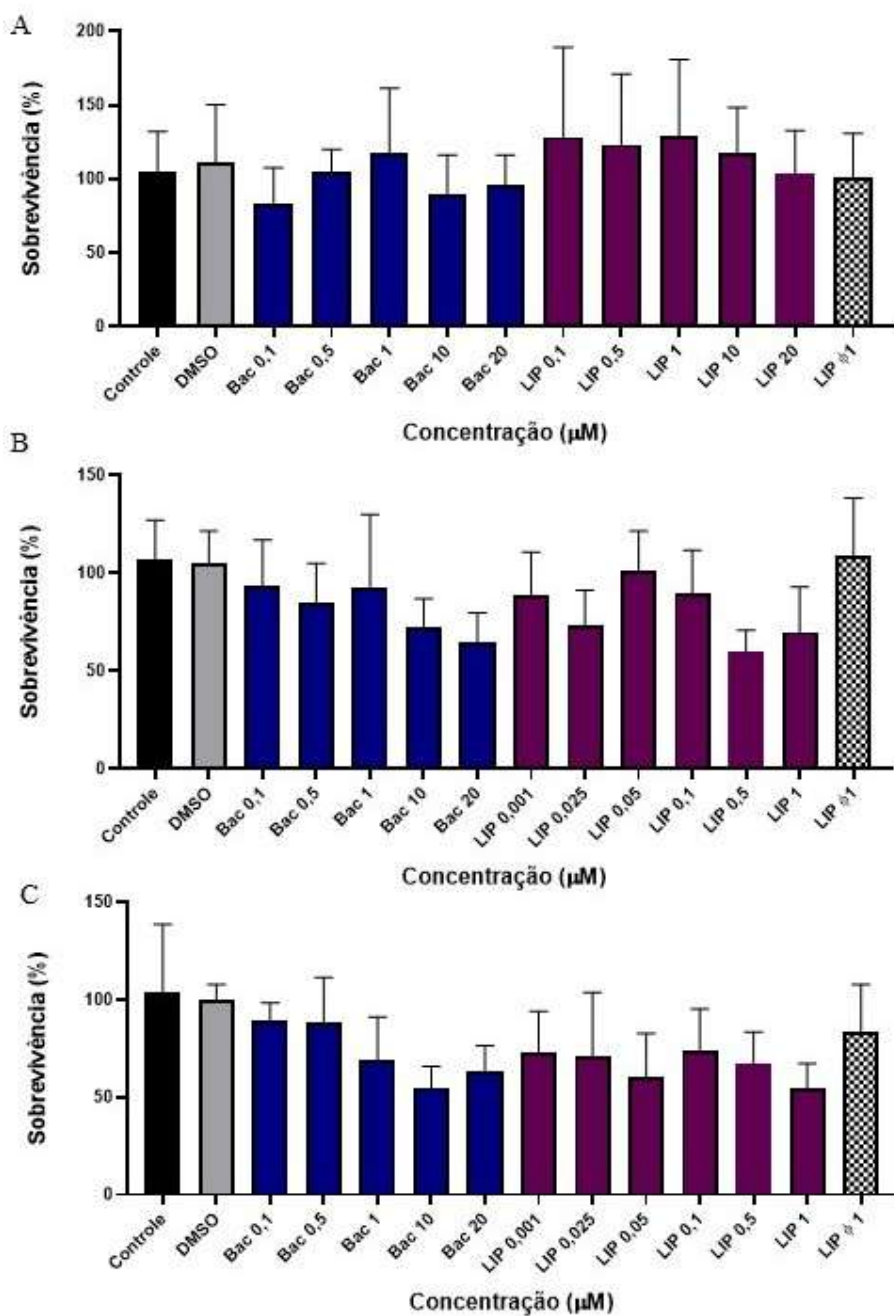
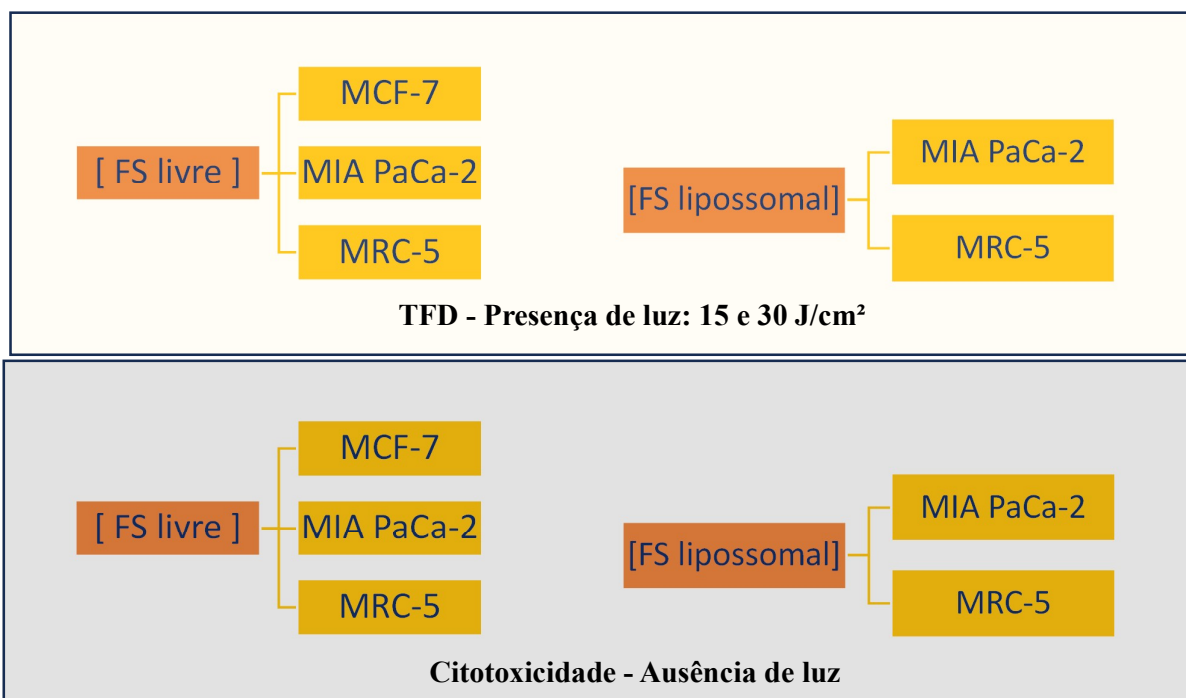


Figura 20: Gráficos da citotoxicidade das formulações de FS avaliadas em sua forma livre e lipossomal em três linhagens celulares distintas. Em A, apresenta-se a linhagem MCF-7 (células tumorais de mama); em B, a linhagem MIA PaCa-2 (células tumorais de pâncreas); e em C, a linhagem MRC-5 (fibroblastos normais). As placas experimentais foram incubadas no escuro por 20 minutos para permitir a absorção do FS, seguidos de mais 48 minutos, tempo equivalente à exposição ao tratamento com LED no grupo de incubação. O controle foi composto por células tratadas apenas com PBS durante todo o período de incubação. A barra correspondente ao tratamento com DMSO 0,125% em PBS demonstra que o solvente do FS, na maior concentração utilizada (20 µM), não apresentou efeito tóxico. Os tratamentos foram realizados com o FS bacterioclorina na forma livre (Bac), na formulação lipossomal (LIP), e com lipossomas "vazios" (LIP ϕ 1), na mesma quantidade presente no LIP 1. Os experimentos foram conduzidos em triplicata técnica e biológica. Os gráficos não apresentam diferenças estatisticamente significativas entre as barras, confirmando que as formulações não demonstram toxicidade para nenhuma das linhagens celulares analisadas.

Ao analisar os gráficos, podemos sugerir que tanto para as células tumorais de mama (MCF-7), tumoral de pâncreas (MIA PaCa-2) quanto para as células de fibroblasto (MRC-5), o tratamento não é citotóxico após 1h08 no escuro, tempo referente à incubação mais a exposição ao *LED* na maior dose de luz. Assim, podemos sugerir que tanto a formulação lipossomal quanto a solução de bacterioclorina livre tem a característica crucial que toda boa formulação de FS tem que apresentar, que é não diminuir a sobrevivência celular no escuro, ou seja, não ser citotóxico. Dessa forma, sugere-se que o FS não produz efeitos de dano celular nas linhagens testadas, quando na ausência de luz.

Neste estudo foi utilizado o teste bioestatístico ANOVA (análise de variância) seguido o teste de Tukey para comparação dos resultados, pelo programa GraphPad Prism 8, pois os dados apresentam homogeneidade dentro de cada grupo e possui distribuição normal, fazendo uma análise intra e intergrupos. Assim, como variável dependente, preditora, tem-se a absorbância adquirida em cada teste MTT, transformado em sobrevivência celular. As variáveis independentes de grupamento são as concentrações obtidas em cada grupo, representado no quadro abaixo.



Quadro 2: Variáveis Dependentes para o teste ANOVA. Esse quadro apresenta em fundo claro os testes de TFD, na presença de FS e com irradiação dos grupos amostrais. No fundo escuro apresenta-se os testes de citotoxicidade, sem irradiação.

5.6 OS CONTROLES DA AVALIAÇÃO DE TFD

Na figura 21 apresenta-se as comparações dos controles nas linhagens tumorais e depois, figura 22, na linhagem de células normais. Os controles utilizados na TFD foram definidos da seguinte forma:

- **Controle:** amostra sem tratamento e sem exposição à luz;
- **LED:** amostra incubada em tampão PBS e submetida à exposição à luz;
- **DMSO:** amostra com concentração de 0,125% de DMSO em PBS, empregada para demonstrar que o solvente do fotossensibilizador (FS) na maior concentração testada (20 μM) não apresenta efeito tóxico;
- **LIP ϕ 1:** "lipossoma vazio", correspondente à quantidade de lipossomas presentes na amostra LIP com 1 μM de FS, porém sem conter FS, mantendo apenas a mesma quantidade de lipossomas.

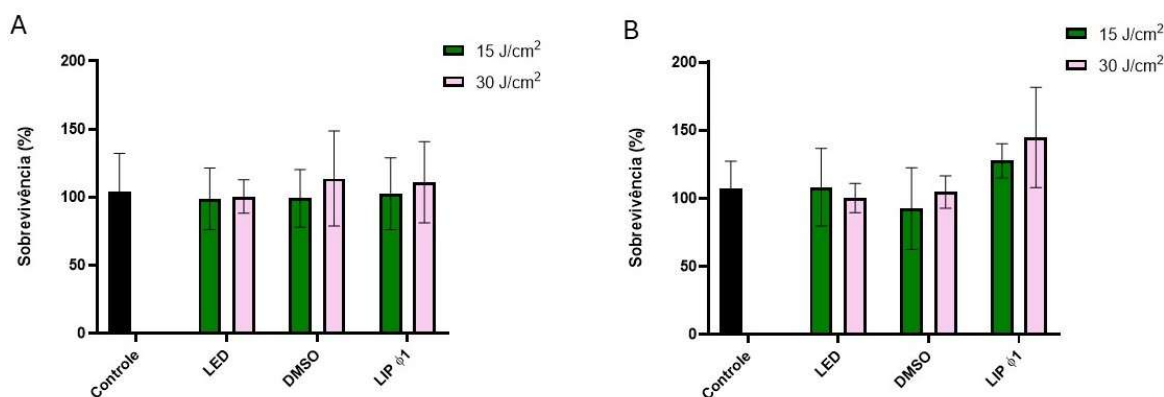


Figura 21: Controles utilizados no teste de TFD em linhagens tumorais. Em A, observa-se a linhagem tumoral de mama (MCF-7), e em B, a linhagem tumoral de pâncreas (MIA PaCa-2). Os controles incluíram: células incubadas apenas com PBS sem exposição à luz (**controle**); células incubadas com PBS e expostas à irradiação (**LED**); células tratadas com DMSO 0,125% solubilizado em PBS e expostas à irradiação (**DMSO**); e lipossomas "vazios" (**LIP ϕ 1**), correspondendo à mesma quantidade de lipossomas presente na amostra LIP com 1 μM de FS, porém sem o FS. As placas foram incubadas no escuro por 20 minutos. Nos tratamentos, as doses de luz variaram entre 15 J/cm², com irradiação de 24 minutos, e 30 J/cm², com irradiação de 48 minutos. Após a incubação, foi realizado o teste de MTT para avaliação da viabilidade celular. Os experimentos foram realizados em triplicata técnica. Para os testes estatísticos utilizou-se três experimentos independentes em MCF-7 e dois experimentos em MIA-Paca-2. Os gráficos não apresentam diferenças estatisticamente significativas entre as barras, confirmando que os testes realizados não promovem diminuição da sobrevivência celular.

Para a linhagem tumoral de mama, todos os controles mantiveram-se viáveis, próximos a 100%, indicando que se trata de um estudo controlado. Da mesma forma, a linhagem tumoral de pâncreas também demonstrou ser um estudo controlado.

Para a linhagem de células normais de fibroblastos, linhagem MRC-5, os controles mantiveram-se viáveis, próximos ao 100%, indicando também ser um estudo controlado.

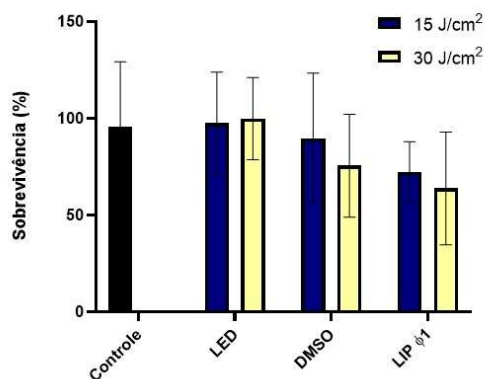


Figura 22: Controles do teste de TFD na linhagem normal de fibroblasto (MRC-5). Os controles incluíram: células incubadas apenas com PBS sem exposição a luz (**controle**); células incubadas com PBS e expostas à irradiação (**LED**); células tratadas com DMSO 0,125% solubilizado em PBS e expostas à irradiação (**DMSO**); e lipossomas "vazios" (**LIP ϕ 1**), correspondendo à mesma quantidade de lipossomas presente na amostra LIP com 1 μ M de FS, porém sem o FS. As placas foram incubadas no escuro por 20 minutos. Nos tratamentos, as doses de luz variaram entre 15 J/cm², com irradiação de 24 minutos, e 30 J/cm², com irradiação de 48 minutos. Após a incubação, foi realizado o teste de MTT para avaliação da viabilidade celular. Os experimentos foram realizados em triplicata técnica. Para os testes estatísticos utilizou-se dois experimentos. O gráfico não apresenta diferenças estatisticamente significativas entre as barras, confirmando que os testes realizados não promovem diminuição da sobrevivência celular.

5.7 AVALIAÇÃO DA TFD EM CÉLULAS TUMORAIS

Como previamente abordado na introdução, a extensão do efeito da TFD é multifatorial e depende do tipo de FS, a sua localização intra e extracelular, a dose total administrada, o tempo total de exposição à luz, a taxa de fluência da luz, a disponibilidade de oxigênio, e o tempo entre a administração da droga e exposição à luz. Todos esses fatores são interdependentes (DOLMANS; FUKUMURA; JAIN, 2003). Para elevar o nível de seletividade do FS pelo tecido tumoral, há dois fatores críticos, sendo eles: a capacidade intrínseca de muitos FS se acumularem preferencialmente no tecido tumoral, a utilização de um sistema carreador de drogas (lipossomal) e a aplicação de luz exclusivamente na área de tratamento (LUO et al., 2017).

Assim foi demonstrado na figura 23 como o FS, a bacterioclorina na sua forma livre, interage com diferentes tipos celulares, segundo a metodologia desenvolvida nessa tese.

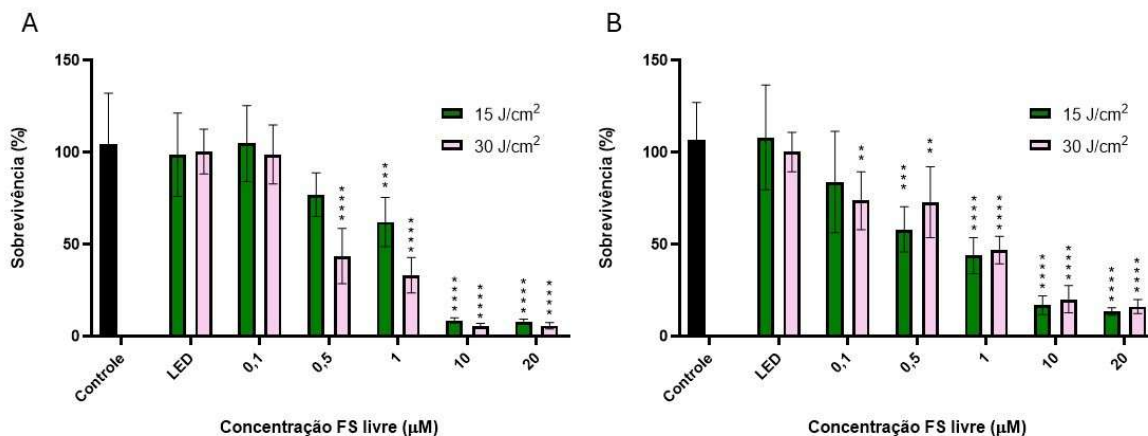


Figura 23: Teste de TFD nas linhagens tumorais com FS livre. Linhagem mama MCF-7 (gráfico A) e linhagem pâncreas MIA PaCa-2 (gráfico B), após incubação com cinco diferentes concentrações de bacterioclorina em sua forma livre, nas doses de luz de 15 J/cm^2 à esquerda e 30 J/cm^2 à direita. Experimentos em triplicata técnica. Para MCF-7 N=3 nos testes estatísticos e N=2 para MIA PaCa-2.

** p<0,01, ***p<0,001 e ****p<0,0001.

Para a linhagem tumoral de mama, MCF-7, (figura 23 A), o FS na forma livre, quando testado em 15 J/cm^2 , mostrou diferença significativa quando comparado o controle às concentrações 1, 10 e 20 μM , com p<0,001, ou seja, menos de 0,1% de probabilidade desses resultados sejam ao acaso. Quando testado em 30 J/cm^2 , maior dose de luz, houve diferença significativa com menor concentração de FS, com 0,5 μM . Dessa forma indicando que a intensidade luminosa está diretamente relacionada ao efeito da TFD, quanto maior a dose de luz, menor quantidade de FS é necessário para ter efeito semelhante. Ao observar a amostra LED, sugere-se que a luz não causa danos a célula quando em PBS (resultados no item 5.6, fig. 21). Observa-se ainda que a inativação celular depende da concentração do fotossensibilizador e da dose de luz utilizada.

Para a linhagem tumoral de câncer de pâncreas, MIA PaCa-2, (fig. 23 B), o FS na forma livre, quando testado em 15 J/cm^2 , mostrou diferença significativa quando comparou-se o controle às concentrações a partir de 0,5 μM , com p<0,001. Já, quando se testou em 30 J/cm^2 houve diferença significativa na redução da sobrevivência celular já com 0,1 μM , sendo p<0,01.

Contudo, ficou demonstrado pelos gráficos acima (fig. 23) que quando utilizado uma potência baixa de luz, concentrações mais altas de bacterioclorina tem que ser usada para se obter a resultados significantes. Na linhagem de câncer de mama, 0,5 μM do FS livre já se tem um resultado relevante na maior dose de luz, enquanto 1 μM do FS livre é necessário na menor dose de luz, ou seja, uma concentração duas vezes maior quando se usa a menor dose de luz testada. Para a linhagem tumoral de pâncreas são necessários 0,5 μM e 0,1 μM na menor e maior dose de luz respectivamente,

para ter uma redução significativa entre os grupos.

Observa-se também que quando comparamos as duas linhagens tumorais estudadas, a MCF-7 (mama) é mais resistente a morte, pois necessitou 0,5 μM da bacterioclorina livre para reduzir a sobrevivência celular significativamente, enquanto para a MIA PaCa-2 0,1 μM já houve redução na sobrevivência celular. Portanto, aqui sugerimos que a bacterioclorina livre é 5 vezes mais eficiente em matar células tumorais de pâncreas do que de mama, para a metodologia desenvolvida nessa tese.

Ao comparar com outros trabalhos, a bacterioclorina modificada estruturalmente com adição do grupo Trizma, utilizado para torná-la mais solúvel em ambiente fisiológico, foi testada em células tumorais de mama, MCF-7, e foram necessários 0,1 μM desse FS, em 15 J/cm^2 para redução da sobrevivência celular de modo significativo (PRATAVIEIRA et al., 2021). Apesar de a metodologia da TFD utilizada nos trabalhos serem diferentes, pois em PRATAVIEIRA et al., (2021) a TFD foi realizada em meio de cultivo DMEM sem fenol, o que poderia ajudar na conservação das células mais tempo vivas do que quando utilizamos, neste trabalho, a TFD em PBS. Salvo as diferenças, pode-se discutir a efetividade das bacterioclorina em sua forma livre nesta linhagem celular, sendo que a mais solúvel, com grupamento Trizma, mostrou-se mais efetiva na redução de viabilidade celular.

Para acrescentar, visando melhorar a entrega ao interior das células tumorais, foi realizada uma formulação de lipossomas a qual acumula-se preferencialmente em tecidos tumorais sólidos devido ao efeito de retenção e permeação intensificada (EPR). Este efeito EPR é mediado por diferenças no tamanho dos poros dos vasos sanguíneos em tecidos tumorais e normais, característica a qual permite que os vasos tumorais acumulem vesículas de lipossoma com um diâmetro de 100–250 nm, enquanto os vasos normais são protegidos desta entrega lipossomal (CHEN; POGUE; HASAN, 2005; ROCHA et al., 2012).

Abaixo, nas figuras 24 e 25, foi demonstrado como o FS em formulação lipossomal interage com os componentes do estudo, a fim de comparar sua atividade com o FS em sua forma livre. Observamos claramente como a formulação lipossomal é mais efetiva para ser utilizada com a bacterioclorina para reduzir a sobrevivência das células tumorais. Nas células MCF-7 tem-se a necessidade de valores menores de 0,1 μM do FS encapsulado para resultados significativos. Em MIA PaCa-2 0,001 μM do FS em formulação lipossomal foi suficiente para resultados significativos de redução de sobrevivência celular.

Portanto, com o trabalho conseguiu-se chegar a uma formulação lipossomal capaz de reduzir a concentração de bacterioclorina na ordem de 100 vezes para se obter a mesma redução de sobrevivência celular.

É possível inferir pelos gráficos acima que quando comparamos as mesmas

concentrações utilizadas do FS livre (fig. 23 A) com o FS lipossomal (fig. 24) há uma redução da sobrevivência das células tumorais de mama logo com 0,1 μM do FS lipossomal já na dose de luz mais baixa. Assim evidenciando uma maior eficiência quando se usa o FS lipossomal comparado ao FS livre, o que é sustentavelmente melhor, pois diminuiu as quantidades de semissíntese do produto natural, a bacterioclorina, além de eliminação mais rápida do organismo e redução da possibilidade de efeitos fotossensíveis quando administrados no organismo (MROZ et al., 2010; O'CONNOR; GALLAGHER; BYRNE, 2009).

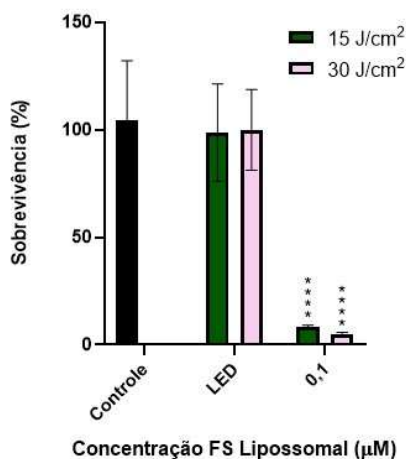


Figura 24: Teste de TFD na linhagem tumoral de mama (MCF-7) com FS lipossomal. Após incubação com bacterioclorina lipossomal, incubação por 20 min no escuro, nas doses de luz de 15 e 30 J/cm^2 . Experimento em triplicata técnica e biológica. **** $p < 0,0001$.

Ao realizar a regressão para determinar o IC_{50} (concentração inibitória média em 50% da sobrevivência celular), figura 25, observa-se que o valor desse parâmetro para a bacterioclorina livre, em 15 J/cm^2 , é 2,4 vezes maior do que em 30 J/cm^2 . Portanto, a dose de luz influencia a concentração na mesma grandeza. Como não foi possível a detecção do IC_{50} nesse estudo com formulação lipossomal, o próximo, que foi realizado com MIA PaCa-2, utilizou-se concentrações muito menores de FS lipossomal. Observa-se que a linha verde, referente ao FS em lipossoma apresenta-se próximo de zero, visto que todas as concentrações testadas matam todas as células. Conclui-se assim, inicialmente, que a formulação lipossomal é muito mais eficaz para reduzir a sobrevivência da célula tumoral de mama (MCF-7) do que a quando utilizado o FS na sua forma livre.

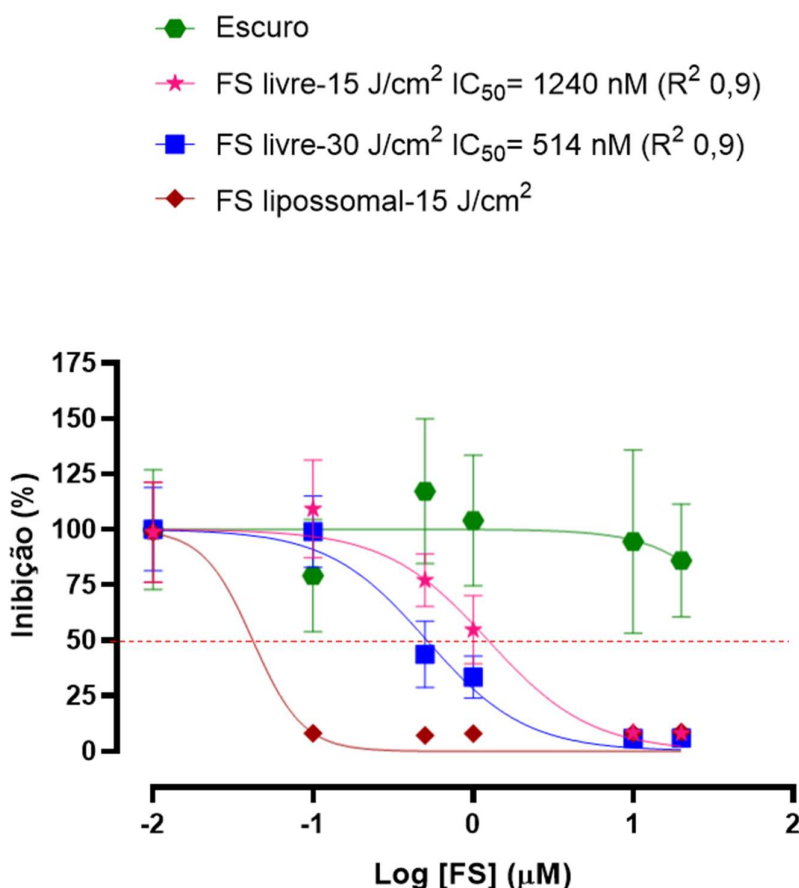


Figura 25: Representação das curvas de regressão não linear utilizadas para a determinação do IC₅₀ (concentração inibitória média) na linhagem celular tumoral de mama MCF-7. O IC₅₀ corresponde à concentração do FS necessária para reduzir em 50% a viabilidade celular, sendo um parâmetro importante para avaliar a eficácia citotóxica das formulações testadas. As análises foram realizadas com base nos dados obtidos a partir do teste de MTT, ajustando os resultados às curvas de regressão não linear para estimativa precisa dos valores.

Para 15 J/cm² tem-se IC₅₀ de 1240 nM de FS na forma livre.

Para 30 J/cm² tem-se IC₅₀ de 514 nM de FS na forma livre.

Ao observar a figura 26, abaixo, podemos inferir a diminuição da sobrevivência nas células tumorais de pâncreas com o aumento da concentração de FS lipossomal e da dose de luz. Observa-se ainda que utilizando 0,001 µM de FS lipossomal já se obtêm resultados significativamente mais reduzidos de sobrevivência celular em qualquer dose de luz. Sendo 1% a chance de ser ao acaso em 15 J/cm² e 0,01% essa mesma chance em 30 J/cm². Portanto podemos sugerir que em linhagens tumorais a concentração de FS tem muita influência sobre os resultados. Quando foi observado na figura 23, em célula tumoral de pâncreas, 0,5 µM de FS livre foram necessários para reduzir a sobrevivência celular, no entanto, pela figura 26, observamos que 0,001 µM de FS lipossomal já reduz significativamente a sobrevivência dessa célula tumoral de pâncreas.

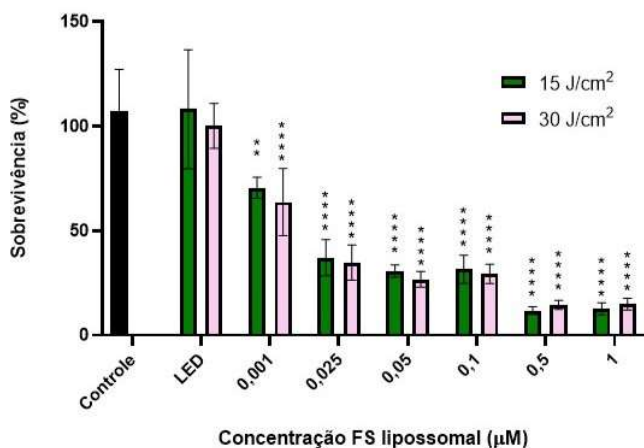


Figura 26: Teste de TFD na linhagem tumoral de pâncreas (MIA PaCa-2) com FS lipossomal. Linhagem tumoral de pâncreas após incubação com seis diferentes concentrações de bacterioclorina lipossomal por 20 min no escuro e depois irradiadas nas doses de luz de 15 J/cm² à esquerda e 30 J/cm² à direita. Experimento em triplicata técnica e duplicata biológica. ** p<0,01 e ****p<0,0001.

Ao determinar a regressão não-linear, observa-se na figura 27, a formulação lipossomal apresenta IC₅₀ 392 vezes menor do que quando comparada ao FS livre, ou seja, muito mais eficiente em inibir a sobrevivência celular. Esses são resultados que corroboram com trabalhos que usam de lipossomas como sistema de entrega de FS para células tumorais (ROCHA et al., 2012; SILVA, 2016).

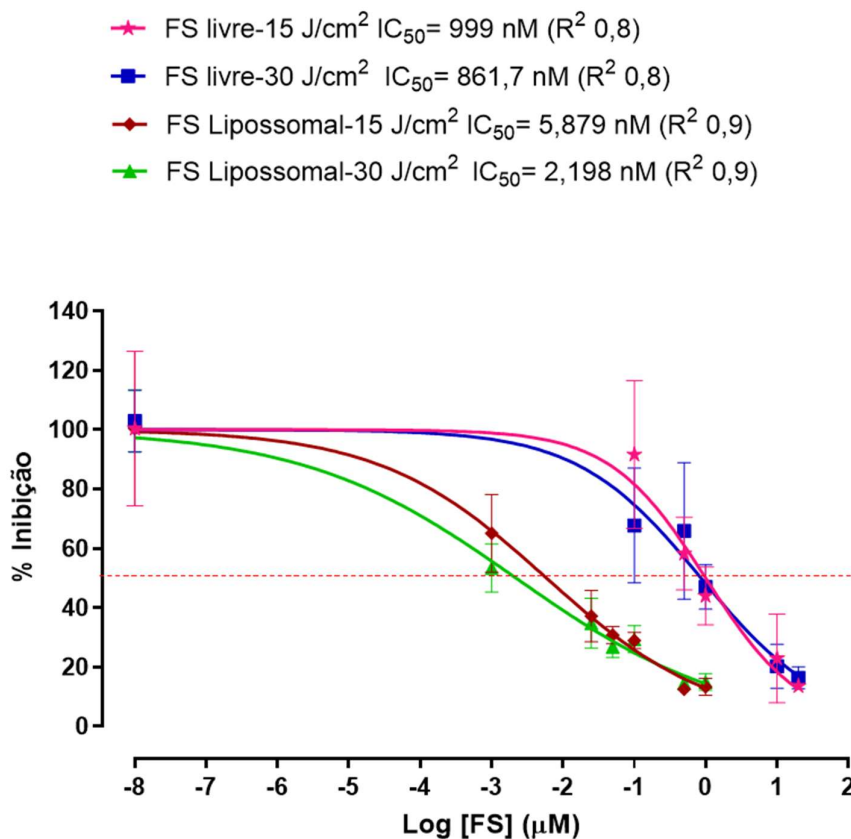


Figura 27: Representação das curvas de regressão não linear utilizadas para a determinação do IC₅₀ (concentração inibitória média) na linhagem celular tumoral de pâncreas MIA PaCa-2. O IC₅₀ corresponde à concentração do FS necessária para reduzir em 50% a viabilidade celular, sendo um parâmetro importante para avaliar a eficácia citotóxica das formulações testadas. As análises foram realizadas com base nos dados obtidos a partir do teste de MTT, ajustando os resultados às curvas de regressão não linear para estimativa precisa dos valores. Em azul e rosa tem-se as curvas de IC₅₀ para resposta a FS livre. Em vinho e verde tem-se as curvas de IC₅₀ para resposta a FS em formulação lipossomal.

Diversas formulações de lipossomas já foram aprovadas pelo *Food and Drug Administration* (FDA) dos Estados Unidos, demonstrando grande potencial no encapsulamento de diversos FS, drogas quimioterápicas e outras moléculas terapêuticamente ativadas melhorando a distribuição do medicamento (MARIÑO-OCAMPO et al., 2023). Como exemplo tem-se o TPP (mesotetrafenilporfirina) que foi incorporado em lipossomas e aumentou eficientemente a atividade anticancerígena devido ao aumento na seletividade para células tumorais de ovário (WANG et al., 2019). Em PRZYBYLO et al., (2016) foi demonstrado também que os lipossomas permitem produzir suspensões contendo altas concentrações de FS, protoporfirina IX, sem formação de cristais biologicamente inertes, e que a incorporação em lipossomas de fosfatidilcolina foram eficientemente entregues células HeLa (câncer cervical) seguidas de sua redistribuição por todo o sistema endomembranar de células garantindo a exposição máxima das estruturas celulares vitais às ações dos radicais livres gerados pela irradiação.

Segundo DAMOISEAU et al., (2001), alguns fatores podem explicar a diminuição da sobrevivência celular quando lipossomas são utilizados como carreadores de fármacos. Primeiramente, o efeito da formulação lipossomal observado pode resultar em diferentes estados de agregação da bacterioclorina nas células: a bacterioclorina pode permanecer em sua forma monomérica (a espécie que produz mais oxigênio singlete) nas células quando lipossomas são empregados, enquanto, ao contrário, a bacterioclorina pode ser agregada nas células quando incubado em meio de cultura celular. Outro fator seria que o uso de lipossomas pode influenciar a localização da bacterioclorina na célula.

5.8 AVALIAÇÃO DA TFD EM CÉLULAS NORMAIS

Com a finalidade de comparação dos resultados em células tumorais e células normais, foi utilizado também células MRC-5 que são células normais a qual são derivadas de fibroblastos isolados do tecido pulmonar. Sabe-se previamente que o efeito de permeação e retenção intensificada (EPR), em que é mediado por diferenças no tamanho dos poros dos vasos sanguíneos em tecidos tumorais e normais, eleva a absorção da formulação lipossomal pelas células tumorais (DOUGHERTY et al., 1998; ROCHA et al., 2012; TORCHILIN, 2007). Entretanto, já foi descrito que células tumorais apresentam maiores taxas de efluxo de drogas, visto possuírem mecanismos de resistência que incluem a expressão aumentada de transportadores de efluxo. Estes transportadores ajudam a expulsar as drogas citotóxicas das células, reduzindo a eficácia dos tratamentos e aumentando a resistência a morte celular (ARALDI et al., 2016; HUBER; MARUIAMA; ALMEIDA, 2010; MACHADO, 2013).

Observou-se, na figura 28, o FS livre o qual reduz significativamente a sobrevivência das células normais em 0,1 μM em baixa intensidade luminosa. Observa-se também que as linhagens tumorais são mais resistentes à morte do que as células de linhagem normal, visto que em MRC-5 (célula normal, fibroblasto) já há redução significativa em 0,1 μM enquanto em MCF-7 (tumoral de mama) começa uma redução significativa em 1 μM e em MIA-PaCa-2 (tumoral de pâncreas) em 0,5 μM . Portanto sugerimos que as células tumorais, por apresentarem mecanismos de efluxo de drogas mais eficiente, mantêm-se mais resistentes à morte, apresentando menor redução de sobrevivência celular na metodologia de TFD empregada.

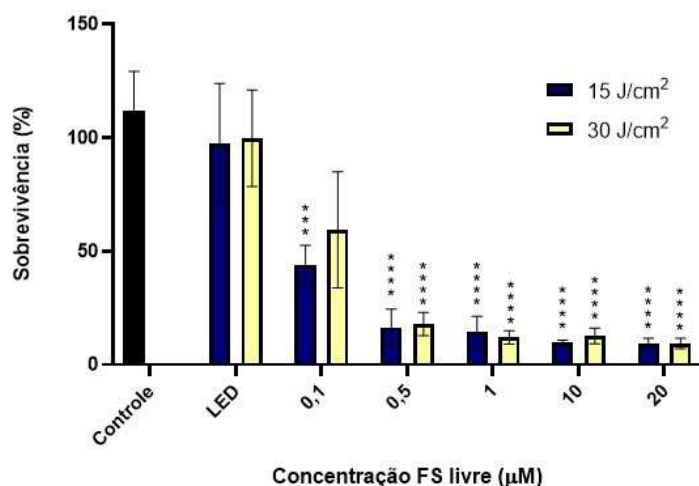


Figura 28: Teste de TFD na linhagem normal de fibroblasto (MRC-5) com FS livre. Após incubação com cinco diferentes concentrações de bacterioclorina em sua forma livre, nas doses de luz de 15 e 30 J/cm². Experimentos em triplicata, duas repetições biológicas. ****p<0,0001 ; ***p<0,001

Ao analisar a figura 29, os gráficos de barras referente a diferentes concentrações de bacterioclorina encapsulada utilizada em células normais, tem-se uma redução significativa na sobrevivência dessas células em 0,025 µM quando se utiliza o FS lipossomal. Assim, demonstrando que a metodologia da formulação lipossomal é eficiente para o objetivo desejado, que é diminuir a quantidade necessária do FS para provocar a morte celular, pois menores concentrações utilizadas favorecem a eliminação mais rápida do organismo e menor chance de fotossensibilidade.

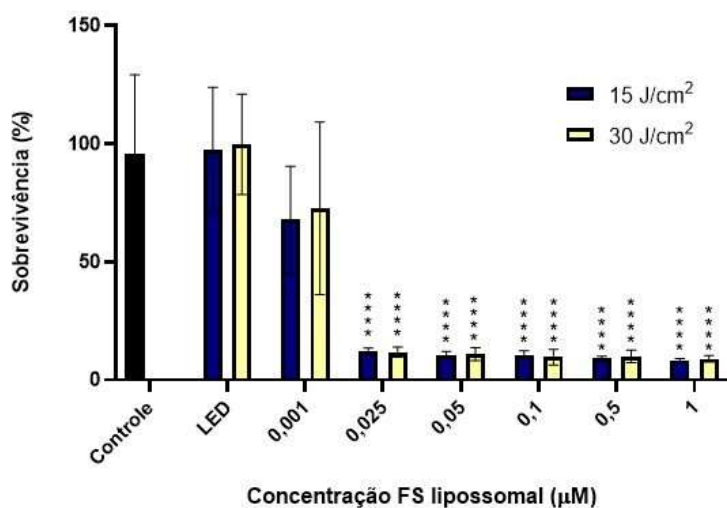


Figura 29: Teste de TFD na linhagem normal de fibroblasto (MRC-5) com FS lipossomal. Após incubação com seis diferentes concentrações de Bcl na sua forma lipossomal por 20 min no escuro, foi irradiado nas doses de luz de 15 e 30 J/cm². Tratamentos em triplicata, duas repetições biológicas. ****p<0,0001.

Retomando os dados anteriores, em MIA PaCa-2 a formulação lipossomal apresenta concentração inibitória 392 vezes menor quando comparada ao FS na sua forma livre, portanto, muito mais eficiente a formulação nanoestrutural em inibir o crescimento celular. Outra diferença que se observa é a maior suscetibilidade da célula normal a morrer no estudo, pois temos o IC₅₀ de 2 nM para as células tumorais MIA PaCa-2 e 1 nM para MRC-5, sendo que essa maior suscetibilidade também se observa com o FS livre.

Demonstrou-se também que as células tumorais são mais resistentes à morte quando se utiliza o FS livre, uma vez que para MCF-7 514 nM do FS livre matou 50% das células enquanto para MIA PaCa-2 861,7 nM foram necessários. Isso quando comparamos aos dados de MRC-5, células normais, temos que 42,2 nM foram necessários do FS livre para matar 50% das células do estudo. Portanto, uma concentração mais baixa de FS é necessária para atingir células normais quando comparada às células tumorais o que já foi estabelecido anteriormente, visto que as células tumorais frequentemente desenvolvem mecanismos de resistência a medicamentos, como proteínas que bombeiam o fármaco para fora da célula. Além disso, as células tumorais podem ter uma taxa de proliferação maior.

Para determinação da potência da bacterioclorina em MRC-5 observou-se pela figura 30 o IC₅₀ em 15 J/cm² primeiramente, inferindo-se que o encapsulamento tornou o FS 26 vezes mais potente do que a forma livre da bacterioclorina. Depois, em 30 J/cm² observou-se 34 vezes mais potente a formulação lipossomal.

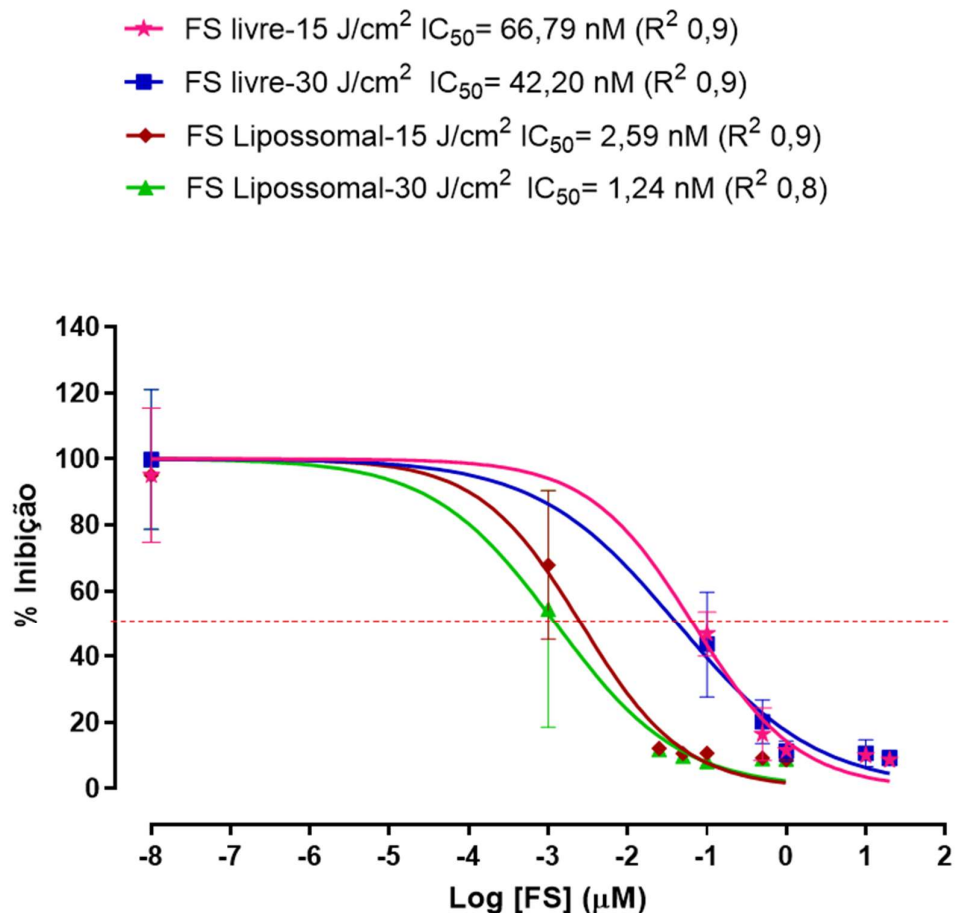


Figura 30: Representação das curvas de regressão não linear utilizadas para a determinação do IC₅₀ (concentração inibitória média) na linhagem celular normal de fibroblastos (MRC-5). O IC₅₀ corresponde à concentração do FS necessária para reduzir em 50% a viabilidade celular, sendo um parâmetro importante para avaliar a eficácia citotóxica das formulações testadas. As análises foram realizadas com base nos dados obtidos a partir do teste de MTT, ajustando os resultados às curvas de regressão não linear para estimativa precisa dos valores. Dois experimentos independentes, em triplicata. Em azul e rosa tem-se as curvas de IC₅₀ para resposta a FS livre. Em vermelho e verde tem-se as curvas de IC₅₀ para resposta a FS em formulação lipossomal.

Foi observado que em todas as linhagens testadas a formulação lipossomal foi mais eficiente do que a forma livre do FS. Comparando as linhagens MRC-5 e MIA PaCa-2 temos que para MIA PaCa-2 a maior potência do fármaco foi de 392 vezes mais eficiente lipossomal, com valor de IC₅₀ de 2,198 nM de bacterioclorina encapsulada. Já para MRC-5 a forma encapsulada foi de 34 vezes mais eficiente do que a forma livre, com valor de IC₅₀ de 1,24 nM. Portanto, utiliza-se na faixa de 1 nanomolar de FS quando se utiliza formulação lipossomal, enquanto para a forma livre é necessária uma quantidade de 42 e 860 nanomolar da bacterioclorina, em células de fibroblastos e tumoral de pâncreas respectivamente.

5.9 COMPARAÇÃO ENTRE IC₅₀

As características analisadas foram: três linhagens celulares diferentes, FS livre ou em formulação lipossomal e duas doses de luz. Entretanto, recorda-se que a linhagem celular MCF-7, a primeira testada, não apresenta valores de IC₅₀ para formulação lipossomal, devido as concentrações iniciais utilizadas de FS em formulação lipossomal nos testes serem muito altas.

Contudo, nos itens 5.6, 5.7 e 5.8 dessa tese foram apresentados os valores de sobrevivência celular versus a concentração de FS testados, comparados pelo teste paramétrico ANOVA. Já nessa seção, apresenta-se uma regressão não linear com o desfecho sendo os dados de IC₅₀ (cálculo descrito no item 4.2.16). O R² é denominado coeficiente de determinação.

	IC ₅₀ 15 J/cm ² (nM)	IC ₅₀ 30 J/cm ² (nM)	R ² 15 J/cm ² / 30 J/cm ²
MIA PaCa-2	999	861,7	0,8 / 0,8
MIA PaCa-2 Lipossomal	5,879	2,198	0,9 / 0,9
MRC-5	66,79	42,20	0,9 / 0,9
MRC-5 Lipossomal	2,59	1,24	0,9 / 0,8
MCF-7	1240	514	0,9 / 0,9

Quadro 3: Valores de IC₅₀ das diferentes variáveis. Foi utilizado análise de regressão não linear. Valores de R² - fator de determinação.

Pelo quadro 3, observamos que para célula tumoral na dose de luz mais alta (30 J/cm²), com formulação lipossomal obteve-se um IC₅₀ muito abaixo do que os valores de FS livre, na ordem de 392 vezes menor. Já para a célula normal de fibroblasto o IC₅₀ também foi abaixo dos valores de FS livre, entretanto, na ordem de 34 vezes. Essa diferença pode ser explicada pelo fato dessa célula não apresentar mecanismo de efluxo de drogas tão eficiente como uma célula tumoral.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com o passar do tempo, com a evolução da sociedade que caminha para formação de grandes centros urbanos, mecanização de serviços braçais e avanço das tecnologias sustentáveis surgem problemáticas novas como sedentarismo, obesidade, envelhecimento da população. Observou-se pelos dados do INCA que esses problemas estão associados ao aumento no número de casos de câncer. Por isso, para nossa sociedade, é tão importante estudos que desvendem, pelo menos, uma vertente desse problema global.

Este trabalho se alinha ao tema da qualidade de vida, ODS 3, oferecendo uma contribuição científica para a sociedade na busca por uma cura para essa doença devastadora. Embora existam alguns tratamentos disponíveis, eles são frequentemente acompanhados por efeitos colaterais incapacitantes. Há aproximadamente 100 anos a TFD vem aprimorando sua técnica, melhorando FS e aumentando a eficácia dos tratamentos. Ao longo desse período, avanços significativos foram feitos na seleção de fotossensibilizadores mais seguros e eficientes, na otimização das dosagens de luz, e na aplicação clínica da terapia para uma variedade de doenças. Esses esforços têm permitido tratamentos mais precisos e com menos efeitos colaterais, trazendo esperança e conforto para os pacientes.

Esse estudo com a bacterioclorina em formulação lipossomal a base de fosfatidilcolina de soja e colesterol demonstrou eficiência *in vitro* e sustentabilidade do ponto de vista econômico social, alinhada a ODS 12, devido ao uso de uma técnica simples de produção de nanoestrutura. Assim, a incorporação em lipossomas de fosfatidilcolina permitiu entrega eficiente para células tumorais de mama (linhagem MCF-7) e de pâncreas (linhagens MIA PaCa-2).

Neste trabalho foi demonstrado também um excelente método de cultivo e extração de bacterioclorina a partir da bactéria púrpura. Com a metodologia de transesterificação, já descrita, foi possível obter o fotossensibilizador utilizado nos experimentos. Demonstrou-se a eficiência do aumento da intensidade luminosa, o que acarretou a necessidade de utilização de menores quantidades de FS, porque ocorreu maior dano às células tumorais.

Sobre o uso de lipossomas, como um sistema de entrega de drogas, mostrou-se eficiente a sua utilização, pois o IC₅₀ baixou algumas casas decimais quando utilizamos dessa formulação. Assim requer menor quantidade de bacterioclorina, o que economiza tempo e processo laboratorial, visto ser um componente de difícil obtenção. Além disso, com formulação lipossomal foi possível sugerir que há captação celular diferencial, possivelmente em decorrência da endocitose ou devido a diferentes localizações da bacterioclorina na célula após a incorporação do lipossoma.

A formulação lipossomal apresentou diversas vantagens. Primeiramente, demonstrou estabilidade a curto prazo, embora sejam necessários estudos adicionais para avaliar sua

estabilidade a longo prazo e a viabilidade de sua forma liofilizada. Esse método já é aplicado com outros fotossensibilizadores lipossomais utilizados na prática clínica, conforme descrito neste trabalho. Além disso, os estudos de fotodegradação indicaram que a formulação lipossomal é capaz de proteger a bacterioclorina contra degradação ao ser irradiada por LED. Por fim, sugere-se que a bacterioclorina apresenta instabilidade na presença de oxigênio, e a formulação lipossomal pode oferecer proteção contra oxidação.

Contudo, esse trabalho contribui para a sociedade de forma a aumentar o entendimento sobre a interação da bacterioclorina, em formulação lipossomal ou livre, além de ser uma forma de iniciar novos estudos que visem trabalhar a bacterioclorina em tumores ainda com alta taxa de mortalidade e tratamentos debilitantes. No entanto, mais estudos são necessários para avaliar os mecanismos moleculares subjacentes e mais estudos podem vir a ser desenhados que utilizem essa formulação lipossomal carreando bacterioclorina e mais um agente quimioterápico ou outras moléculas com efeitos antitumorais.

7 REFERÊNCIAS

AGOSTINIS, P. et al. Photodynamic therapy of cancer: An update. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 61, n. 4, p. 250–281, jul. 2011.

AKILOV, O. E. et al. Photodynamic therapy for cutaneous leishmaniasis: The effectiveness of topical phenothiaziniums in parasite eradication and Th1 immune response stimulation. **Photochemical and Photobiological Sciences**, v. 6, n. 10, p. 1067–1075, 2007.

ALVES, E. et al. Photodynamic oxidation of *Staphylococcus warneri* membrane phospholipids: new insights based on lipidomics. **Rapid communications in mass spectrometry : RCM**, v. 27, n. 14, p. 1607–1618, 2013.

ARALDI, R. P. et al. Genetics and metabolic deregulation following cancer initiation: A world to explore. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 82, p. 449–458, 1 ago. 2016.

ARNAUT, L. G. et al. Photodynamic therapy efficacy enhanced by dynamics: The role of charge transfer and photostability in the selection of photosensitizers. **Chemistry - A European Journal**, v. 20, n. 18, p. 5346–5357, 2014.

ARNAUT, L. G.; PEREIRA, M. M. Overcoming the challenges of infrared photosensitizers in photodynamic therapy: the making of redaporfin. **Chemical Communications**, v. 59, n. 62, p. 9457–9468, 6 jul. 2023.

AZIZ, B. et al. An Overview of Potential Natural Photosensitizers in Cancer Photodynamic Therapy. **Biomedicines**, v. 11, n. 1, p. 1–18, 1 jan. 2023.

BAGNATO, V.; REQUENA, M. **Terapia fotodinâmica dermatológica: Programa TFD Brasil Volume 2**. 1. ed. São Carlos: Even 3 Editora, 2023. v. 2

BARBUGLI, P. A. et al. In vitro phototoxicity of liposomes and nanocapsules containing chloroaluminum phthalocyanine on human melanoma cell line. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 10, n. 1, p. 569–573, jan. 2010.

BELFIORE, L. et al. Towards clinical translation of ligand-functionalized liposomes in targeted cancer therapy: Challenges and opportunities. **Journal of Controlled Release**, v. 277, p. 1–13, 10 maio 2018.

BELLNIER, D. A. et al. Clinical pharmacokinetics of the PDT photosensitizers porfimer sodium (Photofrin), 2-[1-hexyloxyethyl]-2-devinyl pyropheophorbide-a (Photochlor) and 5-ALA-induced protoporphyrin IX. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 38, n. 5, p. 439–444, jun. 2006.

BERTHELOOT, D.; LATZ, E.; FRANKLIN, B. S. Necroptosis, pyroptosis and apoptosis: an intricate game of cell death. **Cellular and Molecular Immunology**, v. 18, n. 5, p. 1106–1121, 1 maio 2021.

BOVIS, M. J. et al. Improved in vivo delivery of m-THPC via pegylated liposomes for use in photodynamic therapy. **Journal of Controlled Release**, v. 157, n. 2, p. 196–205, 2012.

BOWN, S. G. Photodynamic therapy for cancer of the pancreas-The story so far. **Photonics and**

Lasers in Medicine, v. 5, n. 2, p. 91–100, 2016.

BRASIL. Disponível em: <<https://brasil.un.org/pt-br/sdgs>>. Acesso em: 14 mar. 2024.

BRUXEL, F. et al. NANOEMULSÕES COMO SISTEMAS DE LIBERAÇÃO PARENTERAL DE FÁRMACOS. **Quim. Nova**, v. 35, n. 9, p. 1827–1840, 2012.

CALORI, I. R. **Preparação, caracterização e propriedades de lipossomas contendo o ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico e o agente fotossensibilizador AICIPc: Um novo sistema carreador específico com ação sinérgica aplicado a terapia fotodinâmica**. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, 2016.

CHEN, B.; POGUE, B. W.; HASAN, T. Liposomal delivery of photosensitising agents. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 2, n. 3, p. 477–487, maio 2005.

CHRISTIE, J. G.; KOMPELLA, U. B. Ophthalmic light sensitive nanocarrier systems. **Drug Discovery Today**, v. 13, n. 3–4, p. 124–134, 2008.

CRUESS, A. F. et al. Photodynamic therapy with verteporfin in age-related macular degeneration: A systematic review of efficacy, safety, treatment modifications and pharmacoeconomic properties. **Acta Ophthalmologica**, v. 87, n. 2, p. 118–132, 2009.

DA CRUZ RODRIGUES, A. et al. Photoinactivation of microorganisms using bacteriochlorins as photosensitizers. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 55, n. 2, p. 1139–1150, 1 jun. 2024.

DABROWSKI, J. M.; ARNAUT, L. G. Photodynamic therapy (PDT) of cancer: From local to systemic treatment. **Photochemical and Photobiological Sciences**, v. 14, n. 10, p. 1765–1780, 2015.

DAMOISEAU, X. et al. Increase of the photosensitizing efficiency of the Bacteriochlorin a by liposome-incorporation. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 60, p. 50–60, 6 fev. 2001.

DERYCKE, A. S. L.; DE WITTE, P. A. M. Liposomes for photodynamic therapy. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, n. 1, p. 17–30, 2004.

DIXON, S. J. et al. Ferroptosis: An iron-dependent form of nonapoptotic cell death. **Cell**, v. 149, n. 5, p. 1060–1072, 25 maio 2012.

DOLMANS, D. E. J. G. J.; FUKUMURA, D.; JAIN, R. K. Photodynamic therapy for cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 3, n. 5, p. 380–387, maio 2003.

DOUGHERTY, T. J. et al. Review Photodynamic Therapy. **Journal of the National Cancer Inst.**, v. 90, n. 12, p. 889–905, 1998.

ERK, B.; KAMANLI, A. F.; GUNAY ESKILER, G. The therapeutic efficacy of 5-ALA based photodynamic therapy and chemotherapy combination in triple negative breast cancer cells. **Lasers in Medical Science**, v. 39, n. 1, 1 dez. 2024.

FANG, H. H. P.; LIU, H.; ZHANG, T. Phototrophic hydrogen production from acetate and butyrate in wastewater. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 30, n. 7, p. 785–793, jul. 2005.

GARRIER, J. et al. Foslip ®-based photodynamic therapy as a means to improve wound healing. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 8, n. 4, p. 321–327, dez. 2011.

GHEEWALA, T.; SKWOR, T.; MUNIRATHINAM, G. Oncotarget 30524 www.impactjournals.com/oncotarget Photosensitizers in prostate cancer therapy. **Oncotarget**, v. 8, n. 18, p. 30524–30538, 2017.

GHOSH, S.; CARTER, K. A.; LOVELL, J. F. Liposomal formulations of photosensitizers. **Biomaterials**, v. 218, p. 1–15, 1 out. 2019.

GRACANIN, M. et al. Singlet-oxygen-mediated amino acid and protein oxidation: Formation of tryptophan peroxides and decomposition products. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 47, n. 1, p. 92–102, 1 jul. 2009.

GRASSO, C.; JANSEN, G.; GIOVANNETTI, E. Drug resistance in pancreatic cancer: Impact of altered energy metabolism. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 114, p. 139–152, 2017.

HAK, A. et al. Chlorin e6: A Promising Photosensitizer in Photo-Based Cancer Nanomedicine. **Cite This: ACS Appl. Bio Mater**, v. 6, p. 349–364, 2023.

HONORS, C. N.; KRUGER, C. A.; ABRAHAMSE, H. Photodynamic therapy for metastatic melanoma treatment: A review. **Technology in Cancer Research and Treatment**, v. 17, p. 1–15, 2018.

HU, X. et al. Emerging photodynamic/sonodynamic therapies for urological cancers: progress and challenges. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 20, n. 1, 1 dez. 2022.

HUBER, P. C.; MARUIAMA, C. H.; ALMEIDA, W. P. GLICOPROTEÍNA-P, RESISTÊNCIA A MÚLTIPLAS DROGAS (MDR) E RELAÇÃO ESTRUTURA-ATIVIDADE DE MODULADORES #. **Quim. Nova**, v. 33, n. 10, 2010.

HUGGETT, M. T. et al. Phase I/II study of verteporfin photodynamic therapy in locally advanced pancreatic cancer. **British Journal of Cancer**, v. 110, n. 7, p. 1698–1704, 2014.

JALDE, S. S. et al. Synthesis of novel Chlorin e6-curcumin conjugates as photosensitizers for photodynamic therapy against pancreatic carcinoma. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 147, p. 66–76, 2018.

JESORKA, A.; ORWAR, O. Liposomes: Technologies and analytical applications. **Annual Review of Analytical Chemistry**, v. 1, n. 1, p. 801–832, 2008.

KARWICKA, M. et al. Effects of Photodynamic Therapy with Redaporfin on Tumor Oxygenation and Blood Flow in a Lung Cancer Mouse Model. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, 1 dez. 2019.

KIM, T. E.; CHANG, J. E. Recent Studies in Photodynamic Therapy for Cancer Treatment: From Basic Research to Clinical Trials. **Pharmaceutics**, v. 15, n. 9, 1 set. 2023.

KOZLOWSKA, D. et al. Molecular and magnetic resonance imaging: The value of immunoliposomes. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 61, n. 15, p. 1402–1411, 2009.

- KWIATKOWSKI, S. et al. Photodynamic therapy - mechanisms, photosensitizers and combinations. **Biomedicine & pharmacotherapy**, v. 106, p. 1098–1107, 1 out. 2018.
- LEE, H. H.; CHOI, M.; HASAN, T. Kjim-2016-200. **Korean J Intern Med**, v. 32, p. 1–10, 2017.
- LIN, X. et al. Bibliometric and visual analysis of doxorubicin-induced cardiotoxicity. **Frontiers in Pharmacology**, v. 14, 2023.
- LUO, D. et al. Chemophototherapy: An Emerging Treatment Option for Solid Tumors. **Advanced Science**, v. 4, n. 1, p. 1–24, 2017.
- LUO, O. D. et al. A Review of the Dermatologic Clinical Applications of Topical Photodynamic Therapy. **Journal of Cutaneous Medicine and Surgery**, v. 28, n. 1, p. NP1, 2024.
- MA, Q. et al. Diketopyrrolopyrrole-derived organic small molecular dyes for tumor phototheranostics. **Chinese Chemical Letters**, v. 33, n. 4, p. 1681–1692, 1 abr. 2022.
- MACHADO, A. E. DA H. Terapia fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e perspectivas. **Química Nova**, v. 23, n. 2, p. 237–243, abr. 2000.
- MACHADO, K. E. **Estudo do Efeito dos Derivados de Imidas Cíclicas sobre os Mecanismos de Resistência Tumoral e Apoptose em Células de Linhagens Tumorais**. Florianópolis: UFSC, 2013.
- MARIÑO-OCAMPO, N. et al. Recent Photosensitizer Developments, Delivery Strategies and Combination-based Approaches for Photodynamic Therapy†. **Photochemistry and Photobiology**, v. 99, n. 2, p. 469–497, 1 mar. 2023.
- MCFARLAND, S. A. et al. Metal-based photosensitizers for photodynamic therapy: the future of multimodal oncology? **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 56, p. 23–27, 2020.
- MENEZES, P.; BAGNATO, V. S. Dark cytotoxicity of the photoproducts of the photosensitizer Photogem after photobleaching induced by a laser. **Laser Physics**, v. 15, n. 3, p. 435–442, 2005.
- MFOUO-TYNGA, I. S. et al. Features of third generation photosensitizers used in anticancer photodynamic therapy: Review. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 34, 1 jun. 2021.
- MOAN, J.; BERG, K. the Photodegradation of Porphyrins in Cells Can Be Used To Estimate the Lifetime of Singlet Oxygen. **Photochemistry and Photobiology**, v. 53, n. 4, p. 549–553, 1991.
- MROZ, P. et al. Stable synthetic bacteriochlorins overcome the resistance of melanoma to photodynamic therapy. **The FASEB Journal**, v. 24, n. 9, p. 3160–3170, 2010.
- MUEHLMANN, L. A. et al. Aluminum-phthalocyanine chloride associated to poly(methyl vinyl ether-co-maleic anhydride) nanoparticles as a new third-generation photosensitizer for anticancer photodynamic therapy. **International Journal of Nanomedicine**, v. 9, n. 1, p. 1199–1213, 2014.
- NGUYEN, V. N. et al. Heavy-Atom-Free Photosensitizers: From Molecular Design to Applications in the Photodynamic Therapy of Cancer. **Accounts of Chemical Research**, v. 54, n. 1, p. 207–220, 2021.

O'CONNOR, A. E.; GALLAGHER, W. M.; BYRNE, A. T. Porphyrin and nonporphyrin photosensitizers in oncology: Preclinical and clinical advances in photodynamic therapy. **Photochemistry and Photobiology**, v. 85, n. 5, p. 1053–1074, set. 2009.

OLIVEIRA, K. T. DE et al. Chlorins: Natural Sources, Synthetic Developments and Main Applications. **Current Organic Synthesis**, v. 11, n. 1, p. 42–58, 20 abr. 2014.

PASZKO, E. et al. Nanodrug applications in photodynamic therapy. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 8, n. 1, p. 14–29, 2011.

PLOTNIKOVA, E. et al. Conjugate of Natural Bacteriochlorin with Doxorubicin for Combined Photodynamic and Chemotherapy. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 25, n. 13, p. 7210, 29 jun. 2024.

PRATAVIEIRA, S. et al. Photodynamic therapy with a new bacteriochlorin derivative: Characterization and in vitro studies. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 34, n. xxxx, p. 102251, jun. 2021.

PRZYBYŁO, M. et al. The cellular internalization of liposome encapsulated protoporphyrin IX by HeLa cells. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 85, p. 39–46, 31 mar. 2016.

PUCELIK, B. et al. Design of Pluronic-Based Formulation for Enhanced Redaporfin-Photodynamic Therapy against Pigmented Melanoma. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 8, n. 34, p. 22039–22055, 2016.

ROCHA, M. S. T. et al. Aluminum-chloride-phthalocyanine encapsulated in liposomes: Activity against naturally occurring dog breast cancer cells. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 8, n. 2, p. 251–257, 2012.

ROSTAMABADI, H.; FALSAFI, S. R.; JAFARI, S. M. Nanoencapsulation of carotenoids within lipid-based nanocarriers. **Journal of Controlled Release**, v. 298, p. 38–67, 28 mar. 2019.

ROTOMSKIS, R.; STRECKYTE, G.; BAGDONAS, S. Phototransformations of sensitizers 1. Significance of the nature of the sensitizer in the photobleaching process and photoproduct formation in aqueous solution. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 39, n. 2, p. 167–171, 1 jun. 1997a.

ROTOMSKIS, R.; STRECKYTE, G.; BAGDONAS, S. Phototransformations of sensitizers 2. Photoproducts formed in aqueous solutions of porphyrins. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 39, n. 2, p. 172–175, 1 jun. 1997b.

SCHMIDT-ERFURTH, U.; HASAN, T. Mechanisms of Action of Photodynamic Therapy with Verteporfin for the Treatment of Age-Related Macular Degeneration. **Current Research Survey of Ophthalmology**, v. 45, p. 195–214, nov. 2000.

SHAH, N. et al. A Physicochemical, In Vitro, and In Vivo Comparative Analysis of Verteporfin-Lipid Conjugate Formulations: Solid Lipid Nanoparticles and Liposomes. **ACS Applied Bio Materials**, 15 jul. 2024.

SHARMA, S. K. et al. Synthesis and evaluation of cationic bacteriochlorin amphiphiles with effective in vitro photodynamic activity against cancer cells at low nanomolar concentration. **Journal of Porphyrins and Phthalocyanines**, v. 17, n. 1–2, p. 73–85, 2013.

SHRESTHA, S. et al. X-ray induced photodynamic therapy with copper-cysteamine nanoparticles in mice tumors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 116, n. 34, p. 16823–16828, 2019.

SILVA, C. V. “**Sistema lipossomal de ftalocianina de cloro-alumínio, contendo ácido fólico, aplicada à Terapia Fotodinâmica**”. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, 2013.

SILVA, E. **Estudos fotofísicos e fotobiológicos de sistemas de liberação contendo o fármaco fotossensível cloro-ftalocianina de alumínio para aplicação em terapia fotodinâmica**. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, 2016.

SILVA, E. P. O.; FRANCHI, L. P.; TEDESCO, A. C. Chloro-aluminium phthalocyanine loaded in ultradeformable liposomes for photobiology studies on human glioblastoma. **RSC Advances**, v. 6, n. 83, p. 79631–79640, 2016.

SILVESTRIS, E. et al. Fertility Preservation in BRCA1/2 Germline Mutation Carriers: An Overview. **Life**, v. 14, n. 5, p. 615, 10 maio 2024.

SONGCA, S. P. Combinations of Photodynamic Therapy with Other Minimally Invasive Therapeutic Technologies against Cancer and Microbial Infections. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 13, 1 jul. 2023.

SOUZA RODRIGUES, N. et al. Importância do Acompanhamento Psicológico em Mulher Mastectomiada. **Arquivos Catarinenses de Medicina**, v. 46, n. 1, p. 164–172, mar. 2017.

STRATONNIKOV, A. A.; MEEROVICH, G. A.; LOSCHENOV, V. B. Photobleaching of photosensitizers applied for photodynamic therapy. 2000.

SWAMI VETHA, B. S. et al. Curcuminoids encapsulated liposome nanoparticles as a blue light emitting diode induced photodynamic therapeutic system for cancer treatment. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 205, 1 abr. 2020.

TANG, D. et al. The molecular machinery of regulated cell death. **Cell Research**, v. 29, n. 5, p. 347–364, 1 maio 2019.

THI HAI YEN, T. et al. Comparative studies in vivo of free and liposomal forms of photosensitizer on a base of hydrophilic derivative of chlorin e 6. **J. Drug Del. Sci. Tech.**, v. 22, n. 4, p. 291–294, 2012.

TORCHILIN, V. P. Targeted Pharmaceutical Nanocarriers. **The AAPS journal**, v. 9, n. 2, p. 128–147, 2007.

TORII, S. et al. An essential role for functional lysosomes in ferroptosis of cancer cells. **Biochemical Journal**, v. 473, n. 6, p. 769–777, 10 mar. 2016.

TU, S. et al. Ferroptosis in hepatocellular carcinoma: Mechanisms and therapeutic implications.

Biomedicine & Pharmacotherapy, v. 182, p. 117769, jan. 2025.

ULIANA, M. P. et al. Photobiological characteristics of chlorophyll a derivatives as microbial PDT agents. **Photochemical and Photobiological Sciences**, v. 13, n. 8, p. 1137–1145, 2014.

ULIANA, M. P. et al. Photodynamic Inactivation of Microorganisms Using Semisynthetic Chlorophyll a Derivatives as Photosensitizers. **Molecules**, v. 27, n. 18, 1 set. 2022.

USACHEVA, M. N.; TEICHERT, M. C.; BIEL, M. A. The Interaction of Lipopolysaccharides with Phenothiazine Dyes. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 33, n. 5, p. 311–319, 2003.

VAN STRATEN, D. et al. Oncologic photodynamic therapy: Basic principles, current clinical status and future directions. **Cancers**, v. 9, n. 2, p. 1–54, 2017.

WANG, Y. et al. Incorporation of 7-dehydrocholesterol into liposomes as a simple, universal and efficient way to enhance anticancer activity by combining PDT and photoactivated chemotherapy. **Chemical Communications**, v. 55, n. 93, p. 14081–14084, 2019.

XUE, Q. et al. Photodynamic therapy for prostate cancer: Recent advances, challenges and opportunities. **Frontiers in Oncology**, v. 12, 23 set. 2022.

ZHANG, D. et al. *Rhodopseudomonas faecalis* sp. nov., a phototrophic bacterium isolated from an anaerobic reactor that digests chicken faeces. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 52, n. 6, p. 2055–2060, nov. 2002.

ZHANG, L. et al. Ferroptosis inhibitors: past, present and future. **Frontiers in Pharmacology**, v. 15, 2024.

ZHANG, W. et al. Strategies to maximize liposomal drug loading for a poorly water-soluble anticancer drug. **Pharmaceutical Research**, v. 32, n. 4, p. 1451–1461, 2014.

ANEXO A – FORMULAÇÃO LIPOSSOMAL EM TAMPÃO TRIS:HCL

Três formulações foram preparadas conforme o item 4.2.7, no entanto foi usado tampão TRIS:HCl para ressuspender. Ao testar as formulações, observou-se que as células não tinham estabilidade para fazer a TFD, pois no controle negativo só células e tampão TRIS:HCl, já apresentava morte celular (figura abaixo). Dessa forma não foi possível seguir os experimentos com TRIS:HCl, o qual foi posteriormente substituído por PBS.

Na figura abaixo, observa-se o gráfico com os dados correspondentes ao uso das formulações de lipossomas em TRIS:HCl, com três tipos de formulação, sendo:

- LP Bac: formulação de lipossoma com bacterioclorina, diluído em TRIS:HCl;
- LIP ϕ : formulação de lipossoma “vazios”, sem fotossensibilizador, diluído em TRIS:HCl;
- LP Ftl: formulação de lipossoma com bacterioclorofila fitil, precursora da bacterioclorina, diluído em TRIS:HCl.

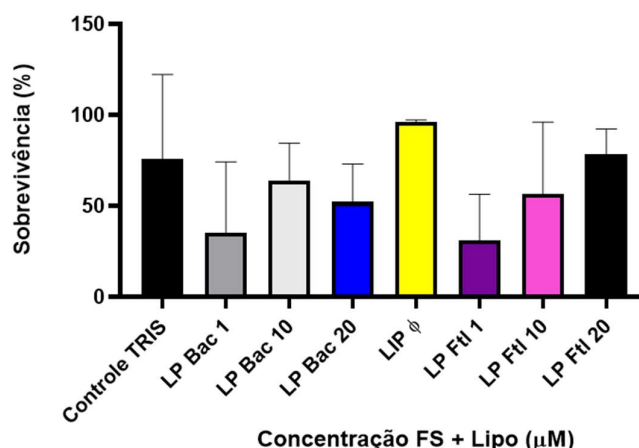


Figura: Gráfico de citotoxicidade com FS formulado em TRIS:HCl em células MCF-7. As placas permaneceram no escuro por 20 min para absorção do fotossensibilizador e mais 48 min, tempo referente à exposição ao tratamento no LED pelo grupo de 30 J/cm². O controle permaneceu com TRIS durante o período de incubação. LP Bac é a formulação de lipossoma com o fotossensibilizador bacterioclorina diluído em TRIS:HCl, LP Ftl é a formulação de lipossomas com o fotossensibilizador bacterioclorina fitil diluído também em TRIS:HCl. Não houve diferença significativa entre os grupos. Experimento em triplicata técnica. Número de repetições biológicas 1.

Pela figura acima, observa-se que o controle TRIS:HCl sem irradiação (primeira barra preta) já mostra diminuição da sobrevivência da linhagem tumoral de mama (MCF-7), dificultando assim analisar os resultados subsequentes de fototoxicidade na presença de luz, em 15 e 30 J/cm². Apesar dos resultados não apresentarem uma resposta como esperado, observou-se que o lipossoma vazio (LIP ϕ , barra amarela) não apresentou morte celular, indicativo de que a formulação lipossomal não é tóxica para a célula ou essa formulação favorece o crescimento celular, uma vez que

é composta por lipídeos e tampão apenas.

Devido a diminuição da sobrevivência celular no controle negativo (célula mais tampão TRIS:HCl, incubado no escuro), o tampão TRIS foi substituído por tampão PBS. Os testes subsequentes foram todos avaliados em PBS como tampão de solubilização tanto do FS livre como da formulação de lipossomas.

Tabela: Estudo dos lipossomas. Amostras solubilizadas em TRIS:HCl.

AMOSTRA	TAMANHO DA PARTÍCULA (nm)	ÍNDICE DE POLIDISPERSÃO	POTENCIAL ZETA (mV)
LP Φ	156,5	0,069	-9,94
LP FITIL	257,8	0,282	-9,70
LP BAC	175,0	0,222	-7,96

Pelo estudo dos lipossomas em tampão TRIS:HCl observou-se que o tamanho de partícula da amostra LP FITIL se apresenta superior a 255 nm, o que não é interessante para o propósito, por ser uma estrutura grande e difícil de processá-la na extrusão, visto que são utilizados filtros de 0,2 e 0,1 μm . O índice de polidispersão (IPD) apresentou valores adequados para formulação lipossomal. Entretanto o potencial zeta não atingiu um valor desejável, acima de 30 e menor de -30 mV, o que pode indicar tendência à floculação a longo prazo.