



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Yara Schuvinski Ricken

Lipossomas Híbridos Polimérico-Lipídicos de Longa Circulação para a Incorporação de Curcumina e Nanopartículas de Prata Almejando a Aplicação em Terapia Fotodinâmica

Florianópolis - SC

2024

Yara Schuvinski Ricken

Lipossomas Híbridos Polimérico-Lipídicos de Longa Circulação para a Incorporação de Curcumina e Nanopartículas de Prata Almejando a Aplicação em Terapia Fotodinâmica

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Mestra em Físico-Química.

Orientadora: Profa. Camila Fabiano de Freitas Marin, Dr.a

Florianópolis

2024

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática da
Biblioteca Universitária da UFSC.

Ricken, Yara Schuvinski

Lipossomas Híbridos Polimérico-Lipídicos de Longa
Circulação para a Incorporação de Curcumina e
Nanopartículas de Prata Almejando a Aplicação em Terapia
Fotodinâmica / Yara Schuvinski Ricken ; orientadora,
Camila Fabiano de Freitas Marin, 2024.

115 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas,
Programa de Pós-Graduação em Química, Florianópolis, 2024.

Inclui referências.

1. Química. 2. Curcumin. 3. Photodynamic Therapy. 4.
Silver Nanoparticles. 5. Liposomes. I. Marin, Camila
Fabiano de Freitas . II. Universidade Federal de Santa
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Química. III.
Título.

Yara Schuvinski Ricken

Lipossomas Híbridos Polimérico-Lipídicos de Longa Circulação para a Incorporação de Curcumina e Nanopartículas de Prata Almejando a Aplicação em Terapia Fotodinâmica

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado, em 23 de fevereiro de 2024, pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Ismael Casagrande Bellettini, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.(a) Hellen Karine Stulzer Koerich, Dr.(a)
Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Mestre em Química.

Insira neste espaço a
assinatura digital

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Insira neste espaço a
assinatura digital

Prof.(a) Camila Fabiano de Freitas Marin, Dr.(a)
Orientador(a)

Florianópolis, 2024.

AGRADECIMENTOS

A verdade é que não sei se conseguirei agradecer da forma como desejo, porém durante estes dois anos estive cercada de pessoas que foram muito importantes para mim e fizeram toda a diferença na construção deste trabalho, espero conseguir expressar um pouquinho da minha gratidão a todo mundo.

Primeiro a minha orientadora Prof. Dra. Camila, por ter me acolhido mesmo sem me conhecer e aceitado me orientar neste período. Obrigada por toda sua paciência em me ensinar tudo, pela disponibilidade em discutir os dados e por sempre me acalmar quando eu achava que tudo estava dando errado.

Aos meus pais, Rosi e Claudio, obrigada por sempre me apoiarem em minhas escolhas, por sempre me ajudarem quando precisei e entenderem minha ausência nesse tempo.

Ao pessoal do Lab POLIMAT. Obrigada Alemão, por estar sempre disposto a me ajudar, por todas as gambiarras que tornaram esse trabalho possível e por ter me recebido quando cheguei perdida nesse novo laboratório. A Eloah, por me inspirar e sempre estar disposta a me ajudar. Perdão por todas as vezes que te incomodei para discutir meus dados e muito obrigada. A Helô, por ser minha parceira de congressos, fugas para cafés, mas também de chegar cedo comigo e aguentar meu caos na bancada. A todo resto do pessoal do Lab, Ângela, Cinthia, David, Flávio, João, Layla, Mari, Matheus, Carlos e Binder, obrigada por todos cafés e bugios e por tornarem meus dias mais divertidos. Ao Prof. Dr. Alexandre Parize, obrigada por estar sempre disposto a ajudar e resolver problemas. Ao Augusto, obrigada pela amizade mesmo de longe e por me apoiar tanto.

Ao Glitz, obrigada por toda ajuda sempre, por montar os LEDs que possibilitaram a realização de diversos experimentos, por todas as discussões de gráficos e por sua opinião, por configurar mil vezes esse trabalho e acima de tudo, obrigada por continuar presente.

A Gisele, obrigada por me aturar quando nem eu me aguentava mais. Obrigada por dividir tua vida comigo nesse tempo, lar sempre vai ser onde você está. Obrigada ao Thi e a Aline, que vieram neste combo, por todos os jantares veganos. A Bruna e a Marie, obrigada pela amizade, mesmo que nem sempre tão presente. Ao Gabriel e a Helena, pelas distrações quando eu tanto precisei e por sempre conseguir me fazer rir. A minha psicóloga Aline, que foi tão importante nessa fase de finalização e por me ensinar tanto.

Ao Laboratório Central de Microscopia Eletrônica da UFSC, Central de Análises do departamento de química, LACFI e Prof. Dr. Daniel pela assistência nas análises. Ao LabCancer e Prof. Dr. Alfeu Zanotto pelas análises de viabilidade celular e ao Dr. Jonathan Agnes pelos testes *in vivo*. Ao Prof. Dr. Thiago Caon, ao mestrando Douglas Porto e a Dr. Débora Argenta pela ajuda nos experimentos de permeação *ex vivo*.

Aos professores e funcionários do Departamento de Química da UFSC. Ao CNPq, CAPES e Fapesc pelo apoio financeiro e viabilização deste trabalho.

Por fim, agradeço a banca Prof.^a Dr.^a Hellen Karine Stulzer Koerich, Prof. Dr. Ismael Casagrande Bellettini e Prof. Dr. Eduard Westphal por aceitarem contribuir neste trabalho.

RESUMO

O melanoma maligno, uma neoplasia cutânea notória por sua alta letalidade, tem apresentado um aumento significativo em sua incidência ao longo dos anos. Apesar dos esforços consideráveis dedicados à extensão da sobrevivência dos pacientes, é observado que remissões completas e duradouras são raras quando a doença atinge sua fase metastática. Historicamente, o emprego de plantas e extratos vegetais tem sido uma prática comum no campo terapêutico; contudo, a eficácia nem sempre é assegurada quando se recorre à aplicação de princípios ativos puros. A curcumina (CUR), um polifenol natural, é conhecida por sua ampla gama de atividades farmacológicas, incluindo efeitos anticancerígenos. Contudo, apresenta baixa biodisponibilidade, fato que limita sua aplicação. O surgimento de formulações personalizadas de CUR e novos sistemas de entrega, como nanopartículas poliméricas e lipossomas tem contribuído para aumentar a sua biodisponibilidade. Aliado a isso, a CUR pode ser utilizada como fármaco fotossensibilizador (FS) ativo na Terapia Fotodinâmica (TFD), um procedimento minimamente invasivo, com discretos efeitos colaterais. Quando um FS é excitado por uma fonte de luz adequada na presença de oxigênio molecular ($^3\text{O}_2$) são formadas espécies citotóxicas, como o oxigênio singleto ($^1\text{O}_2$), capazes de gerar danos celulares fotoinduzidos. Além disso, sua combinação com nanopartículas de prata (AgNPs) pode levar a um aumento na geração de $^1\text{O}_2$, devido ao efeito *metal-enhanced singlet oxygen generation (MEO)*. Nesse cenário, CUR e AgNPs foram incorporadas em lipossomas híbridos polimérico-lipídicos formados por DPPC (1,2-Dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfolina) e pelo copolímero tribloco F127. As vesículas obtidas apresentaram diâmetros inferiores a 130 nm, baixa polidispersão ($<0,30$), potencial zeta entre ± 10 mV e elevadas eficiências de encapsulamento ($>99\%$). A caracterização espectroscópica confirmou a síntese e incorporação fotoinduzida de AgNPs ao sistema lipossomal. Além disso, os parâmetros de ligação demonstraram a forte interação entre lipossomas-CUR em sua forma monomérica, potencializada pela presença de AgNPs. Os estudos de Stern-Volmer permitiram estimar a localização da CUR na bicamada lipídica, dependente da temperatura por um mecanismo de supressão estático. A temperatura de transição de fase (T_m) dos lipossomas obtidos foi determinada por DSC (45-56 °C) e a interação entre os componentes da formulação investigada por FTIR. Os parâmetros fotofísicos demonstraram uma diminuição no rendimento quântico de fluorescência da CUR, ideal para a TFD, a qual foi acompanhado pela elevada geração de oxigênio singleto e efetivo efeito MEO. Os estudos de viabilidade celular das formulações em células cancerígenas de melanoma B16-F10, mostraram a eficiência das formulações, principalmente contendo CUR e AgNPs. Por fim, os experimentos de permeação *ex vivo* mostraram aumento da retenção da CUR na derme e epiderme mediante incorporação em lipossomas.

Palavras-chave: Curcumina; Nanopartículas de Prata; Lipossomas; Terapia Fotodinâmica; Oxigênio Singleto.

ABSTRACT

Malignant melanoma, a cutaneous neoplasm notorious for its high lethality, has exhibited a significant increase in incidence over the years. Despite considerable efforts dedicated to extending the survival of patients, it is observed that complete and lasting remissions are rare when the disease reaches its metastatic phase. Historically, the use of plants and plant extracts has been a common practice in the therapeutic field; however, efficacy is not always guaranteed when resorting to the application of pure active principles. Curcumin (CUR), a natural polyphenol, is known for its broad range of pharmacological activities, including anticancer effects. Nevertheless, it exhibits low bioavailability, limiting its application. The emergence of customized CUR formulations and new delivery systems, such as polymeric nanoparticles and liposomes, has contributed to increasing its bioavailability. In addition to this, CUR can be used as an active photosensitizer (PS) in Photodynamic Therapy (PDT), a minimally invasive procedure with discreet side effects. When a PS is excited by an appropriate light source in the presence of molecular oxygen ($^3\text{O}_2$), cytotoxic species such as singlet oxygen ($^1\text{O}_2$) are formed, capable of inducing photo-induced cellular damage. Furthermore, its combination with silver nanoparticles (AgNPs) may lead to an increase in $^1\text{O}_2$ generation due to the metal-enhanced singlet oxygen generation (MEO) effect. In this scenario, CUR and AgNPs were incorporated into polymeric-lipid hybrid liposomes formed by DPPC (1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine) and the triblock copolymer F127. The obtained vesicles had diameters below 130 nm, low polydispersity (<0.30), zeta potential between ± 10 mV, and high encapsulation efficiencies ($>99\%$). Spectroscopic characterization confirmed the synthesis and photoinduced incorporation of AgNPs into the liposomal system. Additionally, binding parameters demonstrated the strong interaction between liposomes and CUR in its monomeric form, potentiated by the presence of AgNPs. Stern-Volmer studies allowed estimating the location of CUR in the lipid bilayer, temperature-dependent through a static quenching mechanism. The phase transition temperature (T_m) of the obtained liposomes was determined by DSC (45-56 °C), and the interaction between the formulation components was investigated by FTIR. Photophysical parameters demonstrated a decrease in the fluorescence quantum yield of CUR, ideal for PDT, accompanied by high singlet oxygen generation and an effective MEO effect. Viability studies of the formulations in B16-F10 melanoma cancer cells showed the efficiency of formulations, particularly those containing CUR and AgNPs. Finally, ex vivo permeation experiments showed an increase in CUR retention in the dermis and epidermis through incorporation into liposomes.

Keywords: Curcumin; Silver Nanoparticles; Liposomes; Photodynamic Therapy; Singlet Oxygen.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática da progressão do Melanoma.....	7
Figura 2. Diagrama de Jablonski simplificado e sua relação com TFD.....	10
Figura 3. Representação esquemática dos três mecanismo de morte celular da TFD in vivo: (1) morte direta de células tumorais, (2) dano a vasculatura e (3) inflamação e respostas imunológicas.	12
Figura 4. Ressonância plasmônica de superfície em nanopartículas metálicas	21
Figura 5. Espectro UV-Vis de AgNPs com diferentes tamanhos. No inserto, é possível observar as diferentes colorações para AgNPs.	22
Figura 6. Diagrama do mecanismo para o efeito de acoplamento ressonante entre a banda SPR da nanopartícula metálica com os níveis HOMO-LUMO de um fotossensibilizador.....	24
Figura 7. Estrutura dos fosfolipídios, bicamada lipídica e lipossoma.	26
Figura 8. Figura mostrando os diferentes tipos de lipossomas.	27
Figura 9. Estrutura química dos Plurônicos®.	29
Figura 10. Montagem do aparato óptico.....	38
Figura 11. Sobreposição espectral da emissão do LED azul com a absorção molecular das amostras (A) ACN-CUR, (B) DPPC-F127-CUR e (C) DPPC-F127-AgNPs-CUR.....	38
Figura 12. Espectro de absorção do ABDA antes e após a iluminação com LED azul.....	39
Figura 13. Representação esquemática da célula de difusão de Franz.	41
Figura 14. Distribuição dos diâmetros médios dos lipossomas formados a 25,0 °C.	43
Figura 15. Espectros de absorção eletrônica da curcumina (1×10^{-6} mol L ⁻¹) em meio aquoso, DMSO e incorporada aos lipossomas.....	45
Figura 16. Espectros de absorção das dispersões lipossomais. [CUR]= 1×10^{-6} mol L ⁻¹ AgNPs 1×10^{-4} mol L ⁻¹	47
Figura 17. Espectros de emissão de fluorescência da curcumina em água e incorporada nas dispersões lipossomais. [CUR]= 1×10^{-6} mol L ⁻¹ AgNPs 1×10^{-4} mol L ⁻¹	47
Figura 18. Diâmetro médio e PDI dos sistemas lipossomais armazenas em solução a 5 °C.....	49
Figura 19. Espectros UV-Vis para estabilidade das amostras.	50
Figura 20. Microscopia eletrônica de transmissão de vesículas de DPPC-F127	51
Figura 21. Microscopia eletrônica de transmissão para as diferentes formulações lipossomais (A) DPPC-F127 (B) DPPC-F127-CUR (C) DPPC-F127-AgNPS (D) DPPC-F127-AgNPS-CUR	52
Figura 22. Imagens de microscopia de transmissão da amostra DPPC-F127-AgNPs; (B) Distribuição de tamanhos obtida por meio das imagens de microscopia.	53

Figura 23. A) Espectros de emissão de fluorescência para a titulação com dispersão lipossomal DPPC-F127 de [CUR]= $1,0 \times 10^{-6}$ mol L ⁻¹ em água. B) Intensidade de emissão no comprimento de onda de $\lambda_{\max}=495$ nm nas temperaturas de 20, 25 e 37°C.....	55
Figura 24. A) Espectros de emissão de fluorescência para a titulação com dispersão lipossomal DPPC-F127-AgNPs de [CUR]= $1,0 \times 10^{-6}$ mol L ⁻¹ em água. B) Intensidade de emissão no comprimento de onda de $\lambda_{\max}=495$ nm nas temperaturas de 20, 25 e 37°C.....	55
Figura 25. A) Espectros de emissão de fluorescência da amostra DPPC-F127-CUR com adições de alíquotas de solução de KI (1,0 mol L ⁻¹) a 20 °C; B) <i>Plots</i> de Stern-Volmer para as temperaturas de 20, 25 e 37°C.	59
Figura 26. Representação da bicamada lipídica na ausência e na presença da curcumina (em baixas concentrações molares).	60
Figura 27. A) Fluorescência da amostra DPPC-F127-AgNPs-CUR em 475 nm para as adições de alíquotas de solução de KI (1,0 mol L ⁻¹); B) <i>Plots</i> de Stern-Volmer para as temperaturas de 20, 25 e 37°C.....	61
Figura 28. Calorimetria diferencial de varredura - DSC para os lipossomas de DPPC convencional obtido a partir da referência ²⁵²	63
Figura 29. Calorimetria diferencial de varredura - DSC para as formulações preparadas neste trabalho.	64
Figura 30. Termograma da CUR pura.....	65
Figura 31. Espectros de FTIR para DPPC, F127 e para a formulação DPPC-F127.	67
Figura 32. Espectros FTIR para CUR e para as formulações DPPC-127; DPPC-127-CUR; DPPC-127-AgNPs e DPPC-127-AgNPsCUR.	68
Figura 33. Cinéticas na presença de luz para a análise da sonda ABDA com A) CUR-ACN B) DPPC-F127-CUR e C) DPPC-F127-AgNPs-CUR.	70
Figura 34. Viabilidade celular das diferentes formulações lipossomais contra as células cancerígenas do tipo melanoma B16-F10.....	72
Figura 35. Imagens de microscopia para as diferentes formulações na presença e ausência de luz...	74
Figura 36. Quantidade de CUR em permeada por grama de pele (ng g ⁻¹) através da pele humana na epiderme e derme. Os valores são representados como média \pm DP (n = 2).....	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Ocupação dos orbitais moleculares antiligantes para os estados eletrônicos do oxigênio..	12
Tabela 2. Diâmetro hidrodinâmico (DH), índice de polidispersidade (PDI) e potencial zeta dos lipossomas preparados.	42
Tabela 3. Constantes de ligação da CUR (Kb) com os lipossomas híbridos de DPPC-F127 e lipossomas híbridos contendo nanopartículas de prata DPPC-F127-AgNPs e coeficientes de correlação (R^2) para as temperaturas de 20, 25 e 37°C.	57
Tabela 4. Constantes de ligação (Kb) e parâmetros termodinâmicos associados para a interação da CUR com lipossomas de DPPC-F127 e DPPC-F127-AgNPs.	58
Tabela 5. Constante de Stern-Volmer para a amostra DPPC-F127-CUR após supressão de fluorescência com o íon iodeto.	60
Tabela 6. Constante de Stern-Volmer para a amostra DPPC-F127-AgNPs-CUR após supressão de fluorescência com o íon iodeto.	62
Tabela 7. Análises térmicas para as diferentes formulações liofilizadas.	65
Tabela 8. Eficiência de encapsulamento da CUR no sistema lipossomal.	69
Tabela 9. Parâmetros cinéticos e fotofísicos obtidos por meio da reação entre o 1O_2 e o ABDA. [CUR] = $1,0 \times 10^{-6}$ mol L $^{-1}$; pH 7,4 e 25,0 °C.	70
Tabela 10. Rendimento quântico de fluorescência (ϕ_F) para a CUR encapsulada em lipossomas revestidos constituídos por DPPC e F127. [CUR]= $1,0 \times 10^{-6}$ mol L $^{-1}$	71
Tabela 11. Ação fotodinâmica com os valores de concentração citotóxica de 50% das células obtidas a partir do ajuste de dados não linear.	73

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Tautomerismo ceto-enol da Curcumina.	16
Esquema 2. Espécies desprotonadas da curcumina.	16
Esquema 3. Reação Diels-Alder entre o ABDA e o $^1\text{O}_2$	37

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABC	<i>Accelerated Blood Clearance</i>
ABDA	9,10-antracenediil-bis(metileno)dimalônico
Abs_{FS}	Absorbância do FS
Abs_p	Absorbância do padrão
ACN	Acetonitrila
AgNPs	Nanopartícula de prata
C₅₀	Concentração Citotóxica 50%
CDAMPs	<i>Cell death-associated molecular patterns</i>
CI	Conversão Interna
CIS	Conversão Intersistema
CMC	Concentração Micelar Crítica
CUR	Curcumina
DAMPs	<i>Damage-associated molecular patterns</i>
DDS	<i>Drug delivery system</i>
DH	Diâmetro Hidrodinâmico
DLS	Espalhamento de Luz Dinâmico
DLVO	Deryagin, Landau, Verwey e Overbeek
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPBF	1,3-Difenil-isobenzofurano
DPH	1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene
DPPC	1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina
DSC	Calorimetria Diferencial de Varredura
EE	Eficiência de encapsulamento
EPR	Efeito de Permeabilidade e Retenção
EROS	Espécies Reativas de Oxigênio
F127	Copolímero tribloco F127
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FS	Fotossensibilizador
FTIR-ATR	Espectroscopia de refletância atenuada por infravermelho com transformada de Fourier
GUV	<i>Giant Vesicles</i>
k_{ABDA}	Constante de velocidade reação ABDA
K_b	Constante de Ligação
k_{FB}	Constante de fotodegradação
K_{SV}	Constante de Stern-Volmer
LCME	Laboratório Central de Microscopia Eletrônica
LDLs	Lipoproteínas de baixa densidade
LED	Diodo emissor de luz
LSPR	Ressonância plasmônica de superfície localizada
LUV	<i>Large Unilamellar Vesicles</i>
mAbs	Anticorpos monoclonais
MDR	Resistência a Múltiplos Fármacos
ME¹O₂	<i>Metal Enhanced Singlet Oxygen Generation</i>

MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MVL	<i>Multivesicular Vesicles</i>
N_{abs}	Número de fótons absorvidos
NP	Nanopartícula
PDI	Índice de Polidispersividade
PEG	Poli(etilenoglicol)
PEO	Poli(óxido de etileno)
PG	Propileno glicol
PO	Óxido de Propileno
PPO	Poli(óxido de propileno)
RV	Relaxamento Vibracional
SPR	Ressonância Plasmônica de Superfície
SRB	Sulforrodamina B
SRE	Sistema reticuloendotelial
SUS	Sistema Único de Saúde
TFD	Terapia Fotodinâmica
T_m	Temperatura de transição de fase

LISTA DE SÍMBOLOS

$1S$	Estado Fundamental
$1S^*$	Primeiro Estado Excitado Singleto
1O_3	Oxigênio Tripleto
1O_2	Oxigênio Singleto
$\phi\Delta^1O_2$	Rendimento Quântico de Oxigênio Singleto
$\tau_{1/2}$	Tempo de meia-vida
λ	Comprimento de onda
λ_{emiss}	Comprimento de onda de emissão
λ_{exc}	Comprimento de onda de excitação
ϵ	Absortividade Molar
ϵ_{app}	Absortividade Molar Aparente
ϕF	Rendimento Quântico de Fluorescência
ϕP	Rendimento de Fluorescência do padrão
ζ	Potencial Zeta
γ_{Δ}	Eficiência Fotodinâmica Química

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	3
2	REVISÃO DA LITERATURA	5
2.1	CÂNCER	5
2.1.1	Melanoma	6
2.2	TERAPIA FOTODINÂMICA	8
2.3	CURCUMINA.....	15
2.4	NANOTECNOLOGIA NA BIOMEDICINA.....	19
2.5	NANOPARTÍCULAS DE PRATA	20
2.6	LIPOSSOMAS	25
3	OBJETIVOS	31
3.1	OBJETIVO GERAL	31
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
4	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	32
4.1	MATERIAIS	32
4.2	MÉTODOS	32
4.2.1	Preparação dos lipossomas híbridos polimérico-lipídicos	32
4.2.2	Síntese e incorporação de nanopartículas de prata (AgNPs) ao sistema lipossomal	32
4.2.3	Incorporação de Curcumina ao sistema	33
4.3	MÉTODOS E INSTRUMENTAÇÃO	33
4.3.1	Espalhamento de luz dinâmico - DLS	33
4.3.2	Espectroscopia de Absorção Eletrônica	34
4.3.3	Espectroscopia de Fluorescência	34
4.3.4	Estudos de estabilidade	34
4.3.5	Microscopia eletrônica de transmissão (MET)	34
4.3.6	Determinação da constante de ligação (K_b) da curcumina com os lipossomas	35
4.3.7	Estudos de supressão de fluorescência: ajustes de Stern-Volmer (K_{sv})	35
4.3.8	Calorimetria diferencial de varredura - DSC	35
4.3.9	Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier- FTIR	36
4.3.10	Eficiência de encapsulamento	36
4.3.11	Rendimento quântico de fluorescência	37
4.3.12	Cinética de degradação do ABDA: Rendimento Quântico de oxigênio singleto	37
4.3.13	Análise da viabilidade celular das formulações contra células cancerígenas do tipo melanoma B16-F10	40
4.3.14	Permeação <i>ex vivo</i> de Curcumina e Nanopartículas de Prata	40

5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
5.1	CARACTERIZAÇÃO DOS LIPOSSOMAS FORMADOS	42
5.1.1	Análises de DLS.....	42
5.1.2	Caracterização Espectroscópica- UV-Vis.....	44
5.1.3	Estabilidade.....	48
5.2	TEM	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
5.3	DETERMINAÇÃO DA CONSTANTE DE LIGAÇÃO (KB) DA CURCUMINA COM OS LIPOSSOMAS 53	
5.4	ESTUDOS DE SUPRESSÃO DE FLUORESCÊNCIA: AJUSTES DE STERN-VOLMER (K_{SV})	58
5.5	ANÁLISE DA TEMPERATURA DE TRANSIÇÃO DE FASE DOS SISTEMAS	62
5.6	ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER- FTIR	66
5.7	EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAMENTO	68
5.8	PROPRIEDADES FOTOFÍSICAS	69
5.8.1	Cinética de degradação do ABDA: Rendimento Quântico de oxigênio singleto e Rendimento quântico de fluorescência	69
5.9	ANÁLISE DA VIABILIDADE CELULAR DAS FORMULAÇÕES CONTRA CÉLULAS CANCERÍGENAS DO TIPO MELANOMA B16-F10.....	72
5.10	PERMEAÇÃO <i>EX VIVO</i> DE CURCUMINA E NANOPARTÍCULAS DE PRATA.....	74
6	CONCLUSÃO	77
	REFERÊNCIAS.....	78
	ANEXOS.....	98

1 INTRODUÇÃO

O elevado índice de novos casos de câncer é preocupante. De acordo com a Organização Mundial da Saúde, são estimados 28 milhões de novos casos a cada ano até 2040.¹ Se destaca nesse caso o melanoma, um câncer de baixa incidência, mas que causa preocupações devido sua agressividade e capacidade de disseminação para outros órgãos.² Diante disso, o desenvolvimento de fármacos e terapias mais eficazes no tratamento do câncer tem sido um dos principais campos de investimentos da pesquisa científica nos últimos anos. Nesse cenário, os produtos de origem natural têm desempenhado uma importante vertente na indústria farmacêutica, principalmente devido às suas atividades biológicas multimecanísticas, disponibilidade, sustentabilidade e segurança.³

A Curcumina (CUR) é um composto polifenólico natural extraído do rizoma do açafrão. Tem sido amplamente utilizada como corante alimentício, além de ser considerada segura pela FDA (do inglês: *Food and Drug Administration*), sendo esta uma de suas principais vantagens. No que concerne às suas aplicações, tem mostrado uma ampla gama de atividades biológicas, incluindo o potencial anticancerígeno em uma grande variedade de linhagens celulares.⁴ Outra importante característica da CUR é a sua capacidade de superar o efeito MDR (do inglês: *Multidrug Resistance*) em muitos tumores.⁵ No entanto, apesar dos excelentes resultados *in vitro* sua aplicação é limitada devido à sua elevada hidrofobicidade e rápida eliminação da corrente sanguínea, levando a uma baixa biodisponibilidade do possível fármaco.⁶

Para contornar este problema algumas estratégias promissoras têm sido empregadas no intuito de aumentar a biodisponibilidade e viabilizar o biotransporte e o acúmulo preferencial da CUR no tecido tumoral. Sistemas de formulação em escala nanométrica, como os lipossomas, além de carrearem os fármacos incorporados através da corrente sanguínea, também podem se acumular preferencialmente no tecido neoplásico. Isso se deve ao efeito de permeabilidade e retenção aumentados ou efeito EPR (do inglês: *Enhanced Permeability and Retention Effect*), favorecendo o acúmulo de nanopartículas em tecidos tumorais.⁴

Lipossomas são vesículas formadas por fosfolípidios. Em meio aquoso e mediante processamento adequado, os fosfolípidios são capazes de se organizar na forma de uma bicamada lipídica, apresentando um núcleo aquoso interno e uma membrana hidrofóbica. No geral, lipossomas formados apenas por fosfolípidios, são pouco estáveis e eliminados rapidamente da corrente sanguínea.⁷ No entanto, quando são combinados com copolímeros tribloco como o Pluronic® F-127 do tipo PEO-PPO-PEO, se tornam mais estáveis em solução e tem seu tempo de circulação sanguínea significativamente aumentado, viabilizando a sua aplicação biomédica.⁸

Aliado à incorporação dos fármacos em sistemas lipossomais polimérico-lipídicos, outra estratégia que visa potencializar a atividade anticancerígena da CUR é a sua combinação com doses de

luz visível, coerentes com seu espectro de absorção e na presença de oxigênio molecular ($^3\text{O}_2$). Esse procedimento terapêutico é chamado de Terapia Fotodinâmica (TFD) e está intrinsecamente relacionada à geração de oxigênio singleto ($^1\text{O}_2$) e outras espécies reativas de oxigênio (EROs) pela espécie fotossensibilizada. Em geral, a TFD vem sendo estudada como uma alternativa menos invasiva para o tratamento de câncer. Nela a fotoativação dos fármacos fotossensibilizadores (FS) leva à formação de espécies citotóxicas, as quais causam danos às células cancerígenas.⁹

Com relação aos efeitos fotodinâmicos da CUR, que atuam em colaboração com os seus efeitos anticancerígenos intrínsecos, estudos têm sido realizados com o intuito de aumentar o seu rendimento quântico de oxigênio singleto ($\Phi_{\Delta^1\text{O}_2}$).¹⁰ Dentre as técnicas envolvidas, destaca-se a combinação do fármaco com nanopartículas metálicas, especialmente as de prata (AgNPs), cujas propriedades antimicrobianas e anticancerígenas têm sido relatadas. Essa combinação é responsável pelo efeito ME^1O_2 (“*metal enhanced singlet oxygen generation*”) que atua na potencialização da geração de $^1\text{O}_2$ pelo FS.¹¹ Nesse contexto, a hipótese deste estudo sugere que a incorporação da CUR em um sistema nanocarreador e a sua combinação com doses de luz, na presença de nanopartículas metálicas, pode resultar em uma melhoria na sua biodisponibilidade e um aprimoramento de sua atividade anticancerígena. Sendo assim, o presente estudo busca avaliar a formulação da CUR em sistemas lipossomais polimérico-lipídicos e a sua interação com nanopartículas de prata para aplicações no tratamento do câncer.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 CÂNCER

O câncer é uma das causas primárias de mortes em países industrializados, englobando um conjunto de mais de cem doenças onde a característica comum entre estas é o crescimento desordenado de células, que tendem a invadir tecidos e órgãos vizinhos.¹² No ano de 2020 foram registrados 19,3 milhões de novos casos e 10,0 milhões de mortes associadas às neoplasias malignas no mundo.¹³ No cenário brasileiro o INCA (Instituto Nacional de Câncer) estima que no período entre 2023-2025 o Brasil apresentará 704 mil casos novos de câncer.¹⁴

As células que constituem os tecidos do corpo humano normalmente se reproduzem por meio de um processo contínuo e natural. A maioria delas cresce, se multiplica e morre de maneira regulada, embora possam ocorrer variações nesse ciclo conforme a função celular. Em contraste, as células cancerosas experimentam um crescimento desordenado, resultando na formação de novas células anormais.¹⁵

O crescimento descontrolado de células cancerosas leva à formação de tumores. O estágio seguinte é caracterizado pela displasia, onde ocorre o crescimento descontrolado destas células acompanhado por alterações celulares anormais. No terceiro estágio ocorrem mudanças adicionais, onde células anormais passam a se espalhar por uma maior área de tecido e não cumprem mais sua função original, sendo chamadas de células anaplásicas. A última etapa ocorre quando as células tumorais sofrem metástase e passam a invadir tecidos próximos, podendo invadir a corrente sanguínea e ocupar outros órgãos. Nem todos os tumores progridem até a metástase, no entanto este é o tipo de tumor mais grave devido a sua característica invasiva.^{15,16,17}

O câncer não invasivo ou carcinoma *in situ* é o primeiro estágio de classificação de um câncer. Neste estágio as células cancerosas estão presentes apenas na camada de tecido onde se desenvolveram, ainda não se espalham para outras camadas do órgão de origem. Neste caso, a maioria dos cânceres *in situ* é curável se for tratado antes de progredir para a fase de câncer invasivo. No câncer invasivo, as células cancerosas invadem outras camadas celulares do órgão, chegando à corrente sanguínea ou linfática e, portanto, possuem a capacidade de se disseminar para outros órgãos. Este estágio ocorre apenas com células cancerosas que progridem até o processo de metástase.¹⁵

Um estudo realizado pelo INCA tratando de previsões relativas à incidência de Câncer no Brasil estimou para o triênio de 2023-2025 cerca de 704 mil novos casos de câncer. Com exceção do câncer de pele não melanoma, sendo este o mais incidente no país, os tipos de câncer mais incidentes corresponderão a cerca de 70,0% de todos os casos. Os cânceres de mama feminina e próstata

representam aproximadamente 15,0% dos casos novos cada um, seguidos do câncer de cólon e reto (9,4%), traqueia, brônquio e pulmão (6,7%), estômago (4,4%) e colo do útero (3,5%).¹⁸ O câncer de pele não melanoma, embora seja o mais incidente, é o menos preocupante por ser facilmente tratável e ter uma baixa taxa de mortalidade. O melanoma, embora menos comum e representando apenas 5% de todos os cânceres de pele, é reconhecido pela sua agressividade e capacidade de metastização, sendo atribuído a este a maioria das mortes relacionadas ao câncer de pele.¹⁹

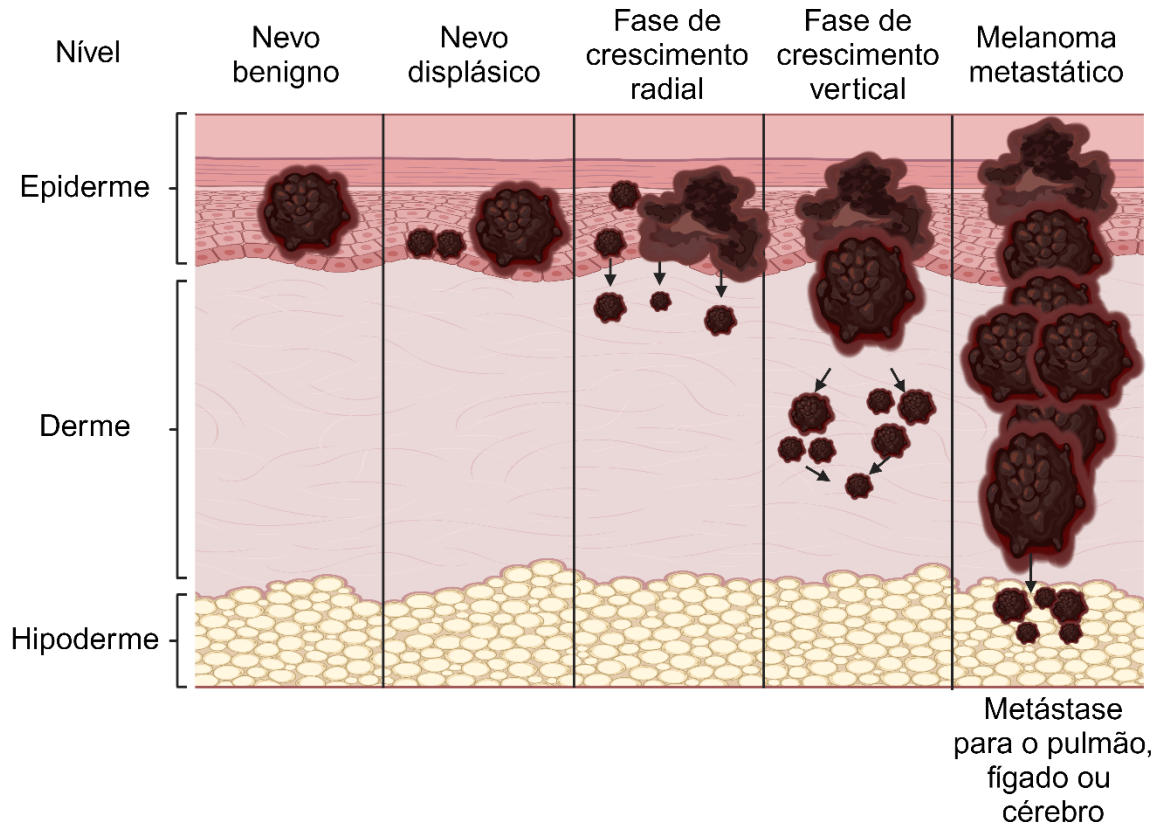
2.1.1 Melanoma

O melanoma é um tipo de câncer de pele que tem origem nas células produtoras de melanina, os melanócitos, tendo predominância em adultos brancos. O surgimento de melanomas está associado a riscos constitucionais e ambientais, como a pele com fototipos mais claros, presença de nevos (pequenas manchas pigmentadas regulares na pele, popularmente conhecidos como sinais ou pintas) e histórico familiar de melanoma estão entre os principais fatores constitucionais para seu desenvolvimento.²⁰ Ainda, estudos demonstram a relação direta entre radiação ultravioleta e o desenvolvimento de melanomas, onde a radiação ultravioleta gera a indução de mutações e a formação de espécies radicalares que causam alterações no sistema imune.^{21, 22}

Em 1968, Clark *et al.*²³ aprimoraram o sistema de microestadiamento relativo ao surgimento de melanomas em uma organização que ficou conhecida como Níveis de Clark e foi posteriormente aperfeiçoado por Breslow. O modelo de Clark representa a proliferação de melanócitos no processo de formação dos nevos, estágio inicial, até a metástase, estágio avançado da doença.

Na fase inicial ocorre a formação de nevos benignos através da proliferação de melanócitos, conforme pode-se visualizar na Figura 1.²² Em seguida esses nevos crescem e se transformam em estruturas planas e com diâmetro superior a 5 mm, apresentando bordas irregulares e pigmentação variável. Posteriormente ocorre o crescimento horizontal, onde há a proliferação na epiderme. A partir disto, com a invasão dessas estruturas na derme sucede-se o crescimento vertical para camadas mais internas da pele, sendo um indicativo do potencial metastático da célula anormal.^{22, 24, 25}

Figura 1. Representação esquemática da progressão do Melanoma.



Fonte: Adaptado de Khan *et al.*²² Criado utilizando Biorender.com

O crescimento tumoral requer nutrientes, provindos do abastecimento por meio dos vasos capilares. A rápida multiplicação celular que gera o desenvolvimento tumoral necessita de uma quantidade maior de nutrientes que é fornecida pela vascularização normal. Portanto, a fim de suprir essa deficiência as células induzem a formação de novos vasos sanguíneos capilares, através do processo de angiogênese.²⁶ Os vasos sanguíneos tumorais formados tendem a apresentar arquitetura anormal, incluindo células endoteliais defeituosas com amplas fenestrações e presença de poros. Além disso, apresentam alinhamento vascular irregular, escassez da camada de músculo liso e inervação, além de um sistema linfático pouco definido e funcional.²⁷

A presença de camadas de músculo liso na vasculatura de tecidos normais os torna impermeáveis a moléculas com tamanhos inferiores a quatro nanômetros, fazendo com que nanopartículas nessa escala sejam mantidas em circulação. No entanto, o tecido neoplásico não apresenta células musculares lisas. Desta forma, macromoléculas de até 600 nm conseguem atravessar a circulação e passam a ficar retidas no tecido tumoral, gerando o fenômeno de aumento de permeabilidade e retenção, efeito EPR. Quando se trata de células cancerosas o efeito EPR pode ser utilizado de forma a fornecer o direcionamento passivo, ou seja, a entrega preferencial ao tecido atingido, proporcionando um acúmulo maior do fármaco desejado no tumor em detrimento dos

tecidos saudáveis. Assim, a nanotecnologia surge como uma alternativa para a entrega seletiva ou preferencial de fármacos em tecidos cancerosos.^{28,29}

Como citado anteriormente, o câncer se mostra como uma das grandes preocupações quanto à saúde pública mundial. Os tratamentos convencionais, como a quimioterapia, cirurgia e radioterapia possuem diversos problemas a serem melhorados. A baixa biodisponibilidade dos fármacos, não especificidade dos agentes antitumorais e o desenvolvimento de resistência a múltiplos fármacos, Efeito MDR, estão ligados a falhas de ação desses tratamentos.³⁰

O tratamento para o melanoma depende das características do tumor, incluindo a localização, o estágio e o perfil genético. A excisão cirúrgica é uma das opções terapêuticas mais utilizadas no tratamento do melanoma. O método ocorre pela remoção da lesão e de suas margens laterais, as quais são compostas por tecido saudável, a fim de garantir que todas as células cancerosas sejam retiradas. No entanto, é recomendado para casos iniciais, nos quais os tumores não são suficientemente profundos e não sofreram metástase. A fim de melhorar a eficácia esse método é comumente aplicado em conjunto com terapias adjuvantes, como a terapia direcionada e a imunoterapia.³¹

A quimioterapia foi a primeira opção de tratamento para o melanoma avançado. A utilização de diferentes fármacos evoluiu com o passar dos anos, no entanto a sobrevida não mostrou melhora, estando diretamente relacionada ao desenvolvimento de resistência aos fármacos quimioterápicos direcionados ao melanoma.^{32,33} Em 1974 a Dacarbazina, um agente alquilante, foi o primeiro fármaco aprovado pela FDA para o tratamento de melanoma, se tornando o ativo quimioterápico padrão para o melanoma metastático. Estudos relataram que uma resposta completa foi alcançada em menos de 5% dos casos e um aumento da sobrevida em torno de 2%–6% dos pacientes.³⁴ Na sequência, a Temozolomida, um pró-fármaco oral do metabólito ativo da Dacarbazina, passou a ser usado para o tratamento de melanoma avançado. Comparado à dacarbazina, mostrou uma melhora discreta na sobrevida livre de progressão mediana, mas não foram observadas diferenças na sobrevida global ou taxa de resposta objetiva.³⁵

Nesse contexto, a terapia à base de luz, chamada Terapia Fotodinâmica (TFD), é uma alternativa promissora e pode ser uma opção de tratamento adequada para pacientes com melanomas cutâneos, incluindo os metastáticos em estágio III/IV.³⁶

2.2 TERAPIA FOTODINÂMICA

A Terapia Fotodinâmica (TFD) se apresenta como uma alternativa minimamente invasiva e que pode ser utilizada para o tratamento de diversas doenças, como degeneração macular da retina³⁷, doenças causadas por bactérias³⁸, fungos³⁹, vírus⁴⁰, dentre outras.⁴¹ Vale destacar que, para além de todas as aplicações supracitadas, o câncer tem sido o principal alvo da TFD.⁴² Isso se deve,

principalmente, ao fato de que quando comparada às técnicas tradicionais de tratamento oncológico, como radioterapia e quimioterapia, a TFD ganha destaque devido sua elevada seletividade, ausência de resistência e efeitos colaterais mínimos.⁴³

A utilização da luz em aplicações medicinais possui registros anedóticos há mais de 4000 anos em diversas civilizações como Egito, Grécia e Índia. Inicialmente, atribuíam-se à luz solar a cura de doenças como vitiligo e psoríase.⁴⁴ A partir disso, com estudos mais aprofundados, notou-se que o efeito terapêutico era obtido sempre a partir da ingestão de plantas seguida pela exposição solar, e, portanto, estava relacionado aos pigmentos presentes nas plantas ingeridas.⁴⁵

Um marco importante ocorreu em 1900, quando Raab avaliou a letalidade do corante vermelho de acridina sobre o protozoário causador da malária (*Paramecium caudatum*). Raab percebeu que em dias ensolarados a letalidade era significativamente superior à letalidade em dias nublados.⁴⁶ Dessa forma, verificou a influência da presença da luz, nesse caso a solar, na indução da morte do microrganismo. Em 1903, Tappeiner e Jesionek reportaram a primeira utilização de um corante no tratamento de tumores, a partir da eosina.⁴⁷

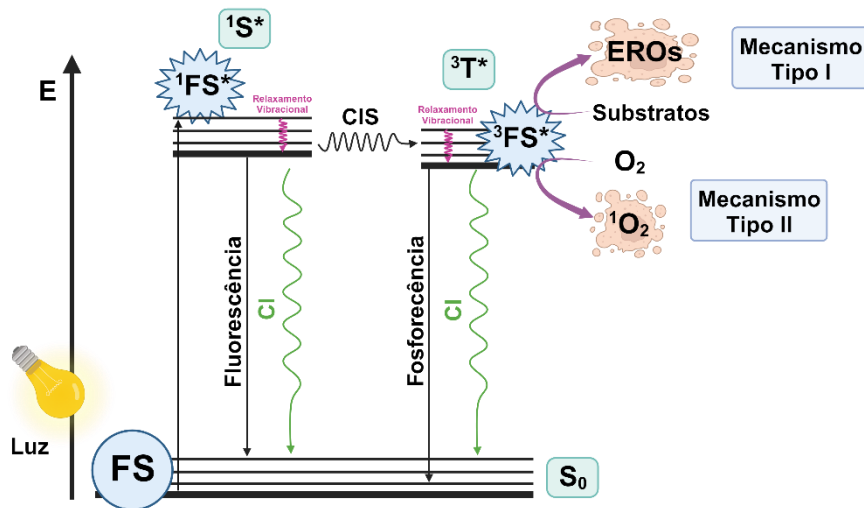
A partir da década de 60 novos estudos passaram a ser desenvolvidos, quando Lipson, com o uso de metodologias desenvolvidas por Sam Schwartz para um derivado da hematoporfirina (Hpd), começou a estudar sua fluorescência em uma variedade de tumores sólidos como um possível meio de detecção de tumores.⁴⁸ Na década de 70 o primeiro fotossensibilizador (FS) foi autorizado pelos órgãos governamentais, Photofrin®, derivado de trabalhos de Thomas J. Dougherty sobre derivados hematoporfirínicos.⁴⁹ Nos anos seguintes, a partir de modificações químicas na estrutura das porfirinas, foi desenvolvida a segunda geração de fármacos para a TFD. Dois novos fármacos foram aprovados pela FDA: Levulan® Kerastick, um pró-fármaco utilizada para lesões de pele que leva a síntese endógena de Protoporfirina IX, e o Visudyne®, que possui o princípio ativo derivado de benzoporfirina da classe das clorinas.^{50, 51}

Atualmente, no Brasil, a TFD é empregada em centros oncológicos como o Hospital Amaral Carvalho de Jaú⁵², em diversos centros oftalmológicos para o tratamento de degeneração macular da retina, em centros odontológicos para eliminação de bactérias relacionadas a infecções endodônticas e periodontais⁵³, no tratamento contra cáries⁵⁴ e em implantes dentários.⁵⁵ A TFD também já é utilizada em tratamentos dermatológicos para doenças de pele como as ceratoses e carcinomas basocelulares⁵⁶ e no tratamento de úlceras em pacientes diabéticos.^{57,58} Recentemente, em 2023, a TFD foi incorporada pelo SUS para o tratamento de pacientes com câncer de pele do tipo basocelular superficial e nodular, com o uso de metilaminolevulinato, um pró-fármaco que é metabolizada em protoporfirina IX.⁵⁹

A TFD se baseia na fotoativação de um composto fotossensibilizador (FS), geralmente um corante capaz de absorver radiação na região visível do espectro eletromagnético, a partir de uma

fonte de iluminação com emissão na faixa de comprimento de onda adequado, na presença de oxigênio molecular ($^3\text{O}_2$).⁶⁰ A absorção da radiação eletromagnética promove o FS para seu primeiro estado singleto excitado ($^1\text{S}^*$), como pode-se visualizar na Figura 2, sendo este altamente instável e de curta duração. A partir deste estado excitado o FS tende a retornar rapidamente ao seu estado fundamental (S_0), através de vias de desativação não radiativas (relaxamento vibracional – RV, conversão interna - CI) ou radiativa (emissão de fluorescência).⁶¹ Determinadas condições podem favorecer o cruzamento intersistemas (CIS), que acontece através da transferência do elétron do primeiro estado singleto excitado ($^1\text{S}^*$) para o primeiro estado tripleto excitado ($^3\text{T}^*$), o qual possui maior tempo de meia vida, com inversão de spin. Neste estado, o FS pode retornar ao estado fundamental pelas vias não radiativas ou pela via radiativa, no último caso chamada de fosforescência.⁶⁰ Para a efetividade da TFD, é crucial a ocorrência do CIS, visto que é a partir do estado $^3\text{T}^*$ que o FS pode interagir com as moléculas de oxigênio ($^3\text{O}_2$) e/ou as biomoléculas presentes, gerando espécies reativas de oxigênio, dando origem aos efeitos fotodinâmicos por meio de dois tipos de reações: mecanismo do tipo I e tipo II.⁶²

Figura 2. Diagrama de Jablonski simplificado e sua relação com TFD, onde S_0 : Estado fundamental, RV: Relaxamento vibracional, CI: Conversão interna, CIS: Cruzamento intersistemas, $^1\text{S}^*$: Primeiro estado singleto excitado, $^3\text{T}^*$: Primeiro estado tripleto excitado, FS: Fotossensibilizador.



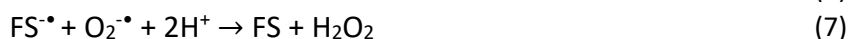
Fonte: Adaptado de Heidelberg *et al.*⁴⁵ Criado utilizando BioRender.com

Como mostrado na Equação 1, após a iluminação com comprimento de onda adequado o FS pode ser excitado para um estado eletrônico de maior energia. No geral, este FS passa ao estado singleto excitado $^1\text{FS}^*$, o qual possui tempo de vida na casa de nanossegundos e é altamente instável, podendo perder energia na forma de fluorescência ou calor. Ainda, pode ocorrer o cruzamento intersistemas, formando um estado tripleto excitado $^3\text{FS}^*$ (Equação 2), o qual é mais estável devido a

ocorrência da inversão de spin do elétron. Assim, este estado $^3\text{FS}^*$ possui longa duração, na faixa de segundos, existindo por tempo suficiente para desencadear reações fotoquímicas subsequentes.⁶³

O mecanismo do Tipo II ocorre a partir da transferência de energia do FS no estado tripleto excitado para o estado fundamental do oxigênio molecular (Equação 3), também tripleto, retornando o FS para o estado fundamental e levando o oxigênio ao estado singleto excitado $^1\text{O}_2$, altamente citotóxico. Por outro lado, o mecanismo do Tipo I é mais complexo. Acredita-se que inicialmente ocorra uma etapa de transferência de um elétron para a produção do ânion radical do FS, conforme a Equação 4. Este pode reagir com o oxigênio para produzir o ânion radical superóxido (O_2^-), como mostrado na Equação 5. Além disso, tanto o efeito de dismutação de O_2^- (H_2O_2), Equação 6, quanto outra redução de um elétron, Equação 7, podem produzir peróxido de hidrogênio, no qual o radical hidroxila HO^\bullet , com alto poder oxidante, é obtido (Equação 8).^{64, 65}

A partir da descrição acima, é fácil concluir que, em comparação com o Tipo I, as espécies reativas de oxigênio (ERO) geradas através da reação fotoquímica do Tipo II são muito mais simples, o que também está envolvido na maioria dos processos de TFD anticâncer.⁶⁶



Tendo em vista os mecanismos de ação do tipo I e II, fica evidente que a eficiência da TFD depende da tríade: FS, luz e oxigênio molecular. É bem conhecido que alguns FS são capazes de atuar por ambos os mecanismos, contudo, quando se refere à TFD, a espécie citotóxica de maior referência é sempre o $^1\text{O}_2$.

No estado fundamental, de acordo com a Teoria do Orbital Molecular (TOM), o oxigênio, $^3\text{O}_2$, possui dois elétrons desemparelhados ocupando os orbitais antiligantes duplamente degenerados π^*_x e π^*_y .⁶⁷ Como citado anteriormente, a espécie $^1\text{O}_2$ é formada mediante a ocorrência do mecanismo do tipo II.⁶⁵ A denominação $^1\text{O}_2$ refere-se aos três estados eletronicamente excitados, imediatamente superiores ao $^3\text{O}_2$ no estado fundamental.⁶⁷ Além disso, o $^1\text{O}_2$ apresenta duas formas com simetrias distintas, uma de menor energia, $^1\Delta_g$, duplamente degenerada ($^1\Delta_x$ e $^1\Delta_y$; 92,4 kJ mol⁻¹), e outra ($^1\Sigma_g$; 159,6 kJ mol⁻¹) de energia maior, Tabela 1.

Tabela 1. Ocupação dos orbitais moleculares antiligantes para os estados eletrônicos do oxigênio.

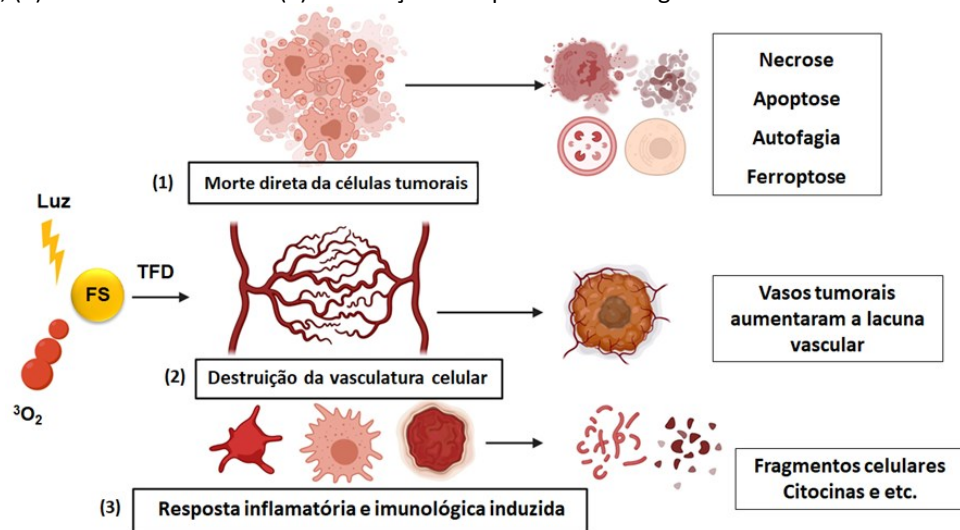
Estado	Orbital molecular anti-ligante	Energia [#] (kJ mol ⁻¹)
$^3\Sigma_g$	$[\uparrow]\pi_x^*[\uparrow]\pi_y^*$	0
$^1\Delta_x$	$[\uparrow\downarrow]\pi_x^*[\uparrow\downarrow]\pi_y^*$	92,4
$^1\Delta_y$	$[\uparrow\downarrow]\pi_x^*[\uparrow\downarrow]\pi_y^*$	92,4
$^1\Sigma_g$	$[\uparrow]\pi_x^*[\downarrow]\pi_y^*$	159,6

Fonte: Adaptado de Shriver e Atkins.⁶⁷

O estado $^1\Delta_g$ apresenta tempo de vida na faixa de 10^{-6} segundos, suficiente para permitir a oxidação de moléculas orgânicas adjacentes. Por outro lado, o tempo de vida do estado de maior energia ($^1\Sigma_g$) é bastante curto (10^{-11} segundos), pois é rapidamente desativado para o estado $^1\Delta_g$, processo favorável devido à mesma multiplicidade de *spin*.⁶⁸

Dada a elevada reatividade do oxigênio singleto, seu tempo de vida é bastante curto, estando na ordem de 4,0 μ s em meio aquoso e 68 μ s em D₂O.⁶⁹ Por outro lado, em solventes orgânicos ou em ambiente lipídico seu tempo de vida pode chegar a 100 μ s.⁷⁰ Dessa forma, a elevada reatividade associada ao curto tempo de vida limita a ação do oxigênio singleto. Assim, os tratamentos da TFD estão localizados no ponto de geração de 1O_2 , fazendo-se necessário que a sua geração seja no tecido alvo “*in situ*”.

Sem dúvidas, uma das principais vantagens da TFD é a ausência de resistência tanto em tratamentos microbianos como anticancerígenos.^{71,72} Essa característica tem sido associada à sua ampla gama de mecanismos de morte celular incluindo necrose, apoptose, danos vasculares, resposta imune e inflamatória, conforme representado na Figura 3.⁷³

Figura 3. Representação esquemática dos três mecanismos de morte celular da TFD *in vivo*: (1) morte direta de células tumorais, (2) dano à vasculatura e (3) inflamação e respostas imunológicas.

Fonte: Traduzido de Tan *et al.*⁷³

O mecanismo de morte celular na TFD relaciona-se à capacidade das EROs em oxidar as organelas celulares e lesionar a sua microvasculatura envolvendo a morte celular não programada ou a

morte celular programada.⁷³ A literatura reporta que a necrose, modalidade de morte celular não programada, é induzida pela aplicação de altas doses do FS, estresse físico ou pela utilização de elevadas doses de luz.⁷⁴ Por outro lado, a apoptose, mecanismo de morte celular programada, é favorecida em aplicações envolvendo baixas doses de luz e baixas concentrações do FS. A Ferroptose, descrita em 2012 por Brent Stockwell e Scott J. Dixon, é um outro tipo de morte celular programada, resultado do acúmulo de ferro e da peroxidação lipídica nas células.⁷⁵ A ferroptose é iniciada pela falha das defesas antioxidantes dependentes da glutatona, resultando em peroxidação lipídica descontrolada e eventual morte celular.⁷⁶

Para além dos mecanismos de morte direta das células tumorais, os danos à vasculatura e a inibição da neovascularização tem efeitos significativos na proliferação tumoral.⁷⁷ Como dito anteriormente, as células tumorais apresentam uma estrutura vascular incomum, com elevadas fenestrações e irregularidades, favorecendo o acúmulo de partículas em escala nanométrica, aumentando a afinidade dos FS pela vasculatura tumoral. De acordo com os estudos anteriores, os danos vasculares desencadeados pela TFD iniciam-se pela agregação plaquetária, formação de edema, formação de trombos, liberação de tromboxano e contração dos vasos.⁷⁸ Além disso, a TFD atua no bloqueio de células endoteliais liberando óxido nítrico (NO) e promovendo ainda mais a vasoconstrição, o que levará à morte celular relacionada à isquemia.

Por fim, uma terceira via de morte celular atrelada à TFD é a inflamação e resposta imunológica. De fato, após os danos ocasionados pela TFD, são gerados sinais de “perigo”, chamados de padrões moleculares associados a danos (do inglês: *Damage-associated molecular patterns* - DAMPs) ou padrões moleculares associados à morte celular (do inglês: *Cell death-associated molecular patterns* - CDAMPs) que servem como sinais de alerta na imunidade.⁷⁹ Os DAMPs são moléculas intracelulares endógenas normalmente “escondidas” nas células, que após exposição de células mortas e/ou danificadas, adquirem propriedades imunoestimulantes. Acredita-se que os DAMPs sejam os principais mediadores da imunogenicidade das células tumorais mortas pela TFD via necrose ou apoptose. Assim, o sistema imunológico os reconhece e desencadeia uma resposta imunológica vigorosa. Além disso, o estresse oxidativo induzido pela TFD pode aumentar a liberação de fatores de transcrição inflamatórios e citocinas inflamatórias.⁸⁰

Vale destacar que, por conta da necessidade da presença de luz a TFD permite a focalização no sítio desejado, minimizando lesões em tecidos saudáveis, fazendo desta uma terapia amplamente seletiva e minimamente invasiva. Um aspecto crucial para a efetividade da TFD é associado à escolha do FS. Um fármaco FS ideal deve apresentar elevado rendimento quântico de oxigênio singleto ($\Phi_{\Delta} \text{}^1\text{O}_2$), facilidade de obtenção, elevado índice de pureza, ausência de toxicidade “no escuro”, alta afinidade, seletividade pelas células tumorais e ativação em comprimentos de onda com luz de ótima penetração em tecidos (janela fototerapêutica, 600-800 nm).⁸¹ Esta absorção na chamada “janela fototerapêutica”

é interessante, pois quanto maior o comprimento de onda de luz incidente, maior será sua penetração no tecido. Entretanto, em comprimentos de onda acima de 800 nm ocorre a absorção da radiação infravermelha por moléculas de água presentes no corpo. Por outro lado, fármacos com menores comprimentos de onda de absorção, mesmo abaixo de 600 nm, podem ser utilizados na TFD para o tratamento de doenças em regiões superficiais, tumores alocados em regiões de menor profundidade ou através da utilização de fibra óptica, por exemplo, na região do cólon ou na cavidade bucal e esôfago.⁹

Outro fator importante para a escolha de um FS é seu grau de hidrofobicidade, o qual pode ser analisado a partir do coeficiente de partição, $\log K_p$, expresso através do logaritmo da concentração do FS em octanol e em água. Compostos que apresentam características hidrofóbicas tendem a se acumular preferencialmente em membranas celulares, sendo estes particularmente interessantes para a TFD.⁸² No entanto, para a aplicação final é necessário que o FS esteja em solução aquosa, por conta de sua biocompatibilidade com fluidos biológicos. Porém, compostos hidrofóbicos quando em água podem sofrer processos de auto-agregação, diminuindo a solubilidade do fármaco e causando diminuição do tempo de vida do estado tripleto através de fenômenos de auto-supressão, o que se torna indesejável para a TFD.⁴⁴

De um modo geral, os FS podem ser categorizados em três gerações distintas. Sendo assim, os FS de primeira geração foram desenvolvidos na década de 70 e incluem basicamente compostos porfirínicos, incluindo o Photoprin®, o primeiro fármaco FS aprovado para uso em humanos. No início dos anos 80, motivados por entraves associados à baixa absorção de luz na janela terapêutica, toxicidade, fotossensibilidade e baixa pureza dos FS de primeira geração, os pesquisadores deram início ao desenvolvimento dos FS de segunda geração. Nesse cenário, FS com maior absorvidade molar na região do vermelho, elevada geração de oxigênio singleto, maior seletividade/penetração em tecidos cancerígenos, redução nos efeitos colaterais e farmacocinética aprimorada foram desenvolvidos. Dentre os representantes comerciais dos FS da segunda geração, pode-se destacar o Tookad®, utilizado no tratamento do câncer de próstata.⁸³ Os FS de segunda geração incluem ainda, o ácido 5-aminolevulínico (5-ALA ou ALA), as benzoporfirinas, as clorinas, as bacterioclorinas, as ftalocianinas, os xantenos, as fenotiazinas, as cianinas, os curcuminóides, dentre outros.

Por fim, nos últimos anos deu-se início ao desenvolvimento dos FS de terceira geração, basicamente versões modificadas de FS de primeira e segunda geração, sendo conjugados a transportadores de fármacos e outras moléculas capazes de direcionar passiva ou ativamente os FS ao tecido alvo. Dentre as principais vertentes destacam-se os sistemas de transporte de liberação de fármacos (do inglês: *Drug delivery system* – DDS) como lipossomas, micelas, ciclodextrinas e dendrímeros. Esses sistemas podem ser conjugados a anticorpos monoclonais (mAbs), monossacarídeos, lipoproteínas de baixa densidade (LDLs), peptídeos e etc. Essas modificações buscam

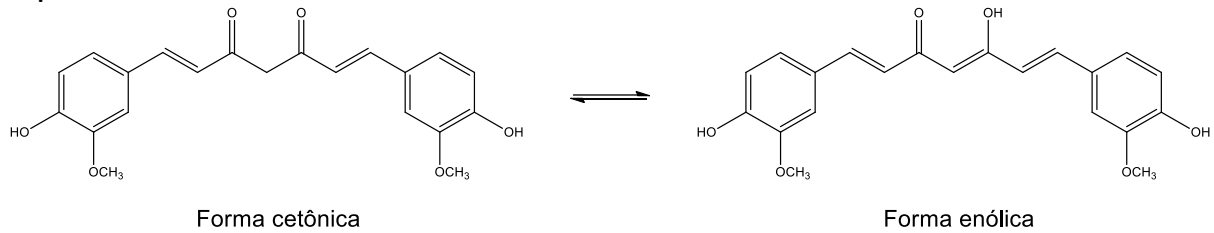
aumentar a especificidade em direção ao tumor, visando atingir seletivamente as células cancerígenas.⁸⁴

A partir das informações acima citadas sobre a escolha de um FS ideal, optou-se neste trabalho pela utilização da Curcumina (CUR), a qual será melhor explorada no tópico a seguir.

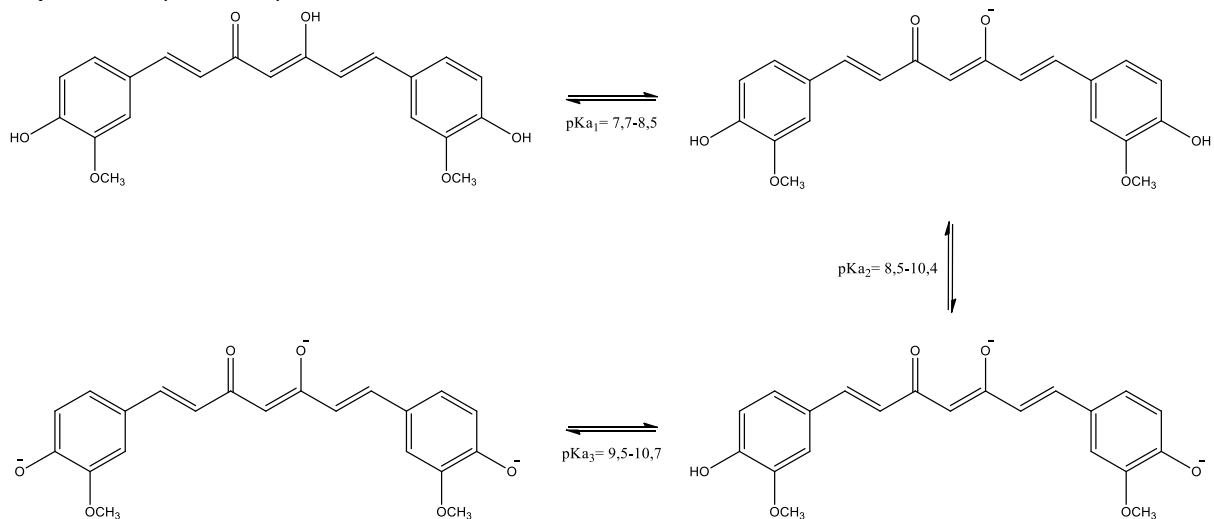
2.3 CURCUMINA

A curcumina (CUR) é um pigmento amarelo extraído do açafrão da terra (*Curcuma longa*), obtido através da desidratação ou trituração de seu rizoma. Foi descoberta por Vogel e Pelletier, em 1815 nos laboratórios de Harvard.⁸⁵ Em 1842, Vogel Jr. isolou a CUR essencialmente pura, no entanto sua estrutura química foi definida apenas em 1910, por Milobedzka e Lampe.⁸⁶ Nomeada pela IUPAC de (1E,6E)-1,7-bis(4-hidroxi-3-metoxifenil)-1,6-heptadieno-3,5-diona, com massa molar de 368,38 g mol⁻¹. Apresenta dois anéis aromáticos com grupamentos fenólicos e orto-metóxi ligados simetricamente e conjugados, possuindo absorção da luz máximo no comprimento de onda de 430 nm.⁸⁵ Apesar de sua absorção máxima estar localizada em uma faixa de baixa penetração tecidual, possui alta energia, sendo adequada para o tratamento de lesões superficiais, controle de microrganismos e neoplasias malignas cutâneas.⁸⁷

A CUR é composta por três grupos funcionais reativos: um dicetona e dois o-metóxi-fenólicos. Dependendo da polaridade e do pH em que a molécula está inserida, o grupo dicetona sofre tautomerização espontânea, gerando três estruturas químicas possíveis: o tautômero dicetona e dois equivalentes tautoméricos ceto-enol, como apresentados no Esquema 1. Em solventes apolares a CUR tem seu equilíbrio deslocado preferencialmente para a forma ceto (pH 3-9), já em solventes polares e apróticos, se apresenta na forma enólica. Em solventes polares próticos pode ocorrer a interação com o hidrogênio presente no enol, resultando no rompimento da ligação de hidrogênio intramolecular e, portanto, na conversão da forma enólica para ceto.^{88, 89, 90} Por conta da presença de uma ligação de hidrogênio intramolecular e de sua planaridade, a forma enol se torna mais estável energeticamente. Esta geometria molecular facilita a sobreposição de elétrons π e, portanto, a ressonância dos elétrons conjugados.^{89,91} A máxima absorção da forma enol no comprimento de onda entre 420-440 nm é atribuída às transições eletrônicas $\pi-\pi^*$ do sistema conjugado de sua estrutura. Para a forma diceto o máximo de absorção desloca-se para o azul em comparação à forma enol, isso porque, a estrutura da dicetona é torcida e a conjugação é diminuída.⁹²

Esquema 1. Tautomerismo ceto-enol da Curcumina.

Por conta da presença de hidrogênios ácidos em sua estrutura, suas propriedades físico-químicas estão diretamente relacionadas ao pH do meio, podendo existir em diferentes estados de protonação. Na faixa de pH entre 3 e 7 ocorre o equilíbrio tautomérico ceto-enólico, sendo deslocado preferencialmente no sentido enol devido a formação de ligação de hidrogênio intramolecular.⁹² Os hidrogênios mais ácidos da CUR são os adjacentes às duas carbonilas, com pKa na faixa de 7,7-8,5, conforme demonstrado no Esquema 2, ocorrendo a mudança de coloração de amarelo para vermelho. Em meio alcalino a desprotonação das hidroxilas de sua estrutura causa o aumento da solubilidade em meio aquoso de sua forma aniônica, tornando-se mais reativa e podendo sofrer hidrólise devido aos íons de OH⁻ em solução.⁹³

Esquema 2. Espécies desprotonadas da curcumina.

Fonte: Adaptado de *Priyadarsini*⁹³

A CUR é utilizada como tempero em diversas culturas e como corante alimentício, além disso é aprovada pela FDA, podendo ser administrada em doses de até 12 g por dia.⁹⁴ Apresenta atividade biológica contra diversas doenças crônicas, como diabetes tipo II, doença de Alzheimer, esclerose múltipla e artrite reumatóide. Possui atividade antioxidante, anti-inflamatória, antibacteriana e antifúngica.⁹⁵

Para além da gama de efeitos acima reportados, a CUR também tem apresentado resultados promissores na prevenção e no tratamento de variados tipos de câncer.⁹⁶ Seu efeito vai além do tratamento, agindo também na forma de um quimiopreventivo nos estágios iniciais de crescimento

excessivo de células cancerosas.⁹⁶ Quanto a sua ação como quimioterápico, apresenta atividade antiangiogênica, sendo essa uma propriedade importante para evitar o crescimento, a sobrevivência e a metástase de células cancerosas.^{89, 97}

Além de impedir a replicação celular e a disseminação metastática, a CUR também tem sido reconhecida por promover a apoptose ao modular diversos fatores pró-inflamatórios, incluindo quinases, citocinas, enzimas e fatores de crescimento.⁹⁸ Uma outra característica que vale ser destacada, é a capacidade da CUR em superar o efeito MDR em muitos tumores.⁹⁹

No que se refere especificamente ao melanoma, a CUR tem sido investigada em uma ampla gama de linhagens cancerígenas (C32, G-361, WM 266-4, M21, SP6.5, A375, dentre outras) e as evidências científicas são promissoras. Os estudos indicam que ela é capaz de afetar várias vias moleculares e celulares envolvidas na patogênese do melanoma, como MST1, JNK, Foxo3, Bim-1, Mcl-1, Bcl-2, Bax e JAK-2/STAT-354-56, tornando-a um agente terapêutico promissor para ser empregado contra esse tipo de câncer.^{100, 101}

Apesar dos potenciais resultados *in vitro*, a aplicação clínica da CUR é limitada devido a sua solubilidade aquosa extremamente baixa ($0,6 \mu\text{g mL}^{-1}$), instabilidade, baixa biodisponibilidade oral, baixa penetração tecidual, rápido metabolismo e eliminação da corrente sanguínea.¹⁰² Nesse cenário, algumas alternativas têm surgido a fim de mitigar essas desvantagens. Dentre as vertentes, pode-se destacar a utilização da CUR como FS na TFD, possibilitando a obtenção de efeitos anticancerígenos e antimicrobianos em menores concentrações.¹⁰

Nesse sentido, pesquisas vêm demonstrando que a combinação da CUR, em baixas concentrações, com luz visível é capaz de inibir a proliferação e induzir a apoptose em células cancerígenas.¹⁰³ Estudos *in vivo* também mostraram que a ativação de pequenas concentrações da CUR com doses de luz foi suficiente para diminuir o crescimento tumoral em várias linhagens celulares de câncer, como HaCaT, HeLa, MCF-7, HepG2, MDA-MB-231, dentre outras. Além disso, verificou-se que a CUR não inibiu o crescimento de fibroblastos L-929, indicando a sua citotoxicidade seletiva para as células cancerígenas sem danificar as células normais.¹⁰⁴

Os efeitos da CUR aplicada na TFD também tem sido demonstrados em linhagens cancerígenas do câncer de pele. No estudo realizado por Szlasa *et al.*¹⁰⁵ avaliaram a ação da CUR em água contendo $4 \times 10^{-4}\%$ (Volume:Volume) de DMSO (na incubação) como agente FS no tratamento *in vitro* de linhas celulares de melanoma melanótico (A375) e amelanótico (C32), queratinócitos (HaCat) e fibroblastos (HGF). Para a iluminação das amostras, utilizou-se uma lâmpada de luz azul polarizada com 20 mW/cm^2 (Optel, Polônia). Os autores verificaram a dependência da concentração do FS e do tempo de incubação na taxa de sobrevivência das células de melanoma. Além disso, a TFD com a CUR aumentou o número de células apoptóticas e necróticas em comparação à incubação com o composto sem irradiação. O estudo também demonstrou que a TFD induziu superexpressão de caspase-3 e clivagem de DNA nas

linhagens celulares estudadas. No entanto, embora eficaz, a TFD usando a CUR em misturas de água/DMSO permanece não seletiva para células de melanoma, afetando também as células saudáveis.

Fadeel *et al.*¹⁰⁶ desenvolveram nanocarreadores lipídicos PEGuilados (PLN3) carregados com CUR almejando o tratamento do câncer de pele por TFD. Para isso, os estudos celulares foram realizados em uma linhagem celular de câncer de pele humana (A431) utilizando-se a irradiação com luz azul de 300 mW/cm² (Photon scientific, Cairo, Egito) por 4 min. Os resultados obtidos mostraram que em todas as concentrações testadas, a viabilidade das células tratadas com CUR incorporada em PLN3 foi significativamente menor do que aqueles tratados com CUR em água. Além disso, a quantidade do FS extraído da pele de camundongos tratados com PLN3 foi duas vezes maior que o de camundongos tratados com solução aquosa do mesmo.

Wozniak *et al.*¹⁰⁷ avaliaram lipossomas de fosfatidilcolina de soja incorporados com CUR em linhagens celulares de melanoma (MugMel2), carcinoma de células escamosas (SCC-25) e queratinócitos humanos normais (HaCaT). A avaliação da viabilidade foi realizada após exposição à irradiação de luz azul após 4 h de pré-incubação com CUR livre e encapsulada. As células malignas revelaram aumento da fototoxicidade após a terapia em comparação às células normais. Além disso, a TFD à base de CUR em lipossomas mostrou uma proporção aumentada de células apoptóticas e necróticas. Diante disso, nota-se que a incorporação do FS em um sistema lipossomal favoreceu a seletividade em relação às células cancerígenas.

Diante dos resultados reportados, fica evidente que a utilização da CUR como FS em TFD traz potenciais benefícios no tratamento do câncer de pele. Além disso, deixa claro a necessidade de incorporação em sistemas *drug delivery*. Uma série de outros estudos envolvendo CUR em TFD tem sido reportados nos últimos anos, sendo sumarizados nos trabalhos de Xie *et al.*¹⁰⁸ e Kah *et al.*³.

Apesar dos bons resultados apresentados pela CUR na TFD, já foi demonstrado que seu rendimento quântico de oxigênio singleto (Φ^1O_2) é muito reduzido quando comparado a outros fármacos FS. Em água, etanol e dimetilformamida seu Φ^1O_2 é inferior a 0,01, em acetonitrila chega a 0,11.¹⁰⁹ Contudo, são valores muito pequenos quando comparados, por exemplo, à Rosa de Bengala cujo Φ^1O_2 chega a 0,75 em meio aquoso.¹¹⁰ E mesmo assim, a CUR tem se mostrado muito mais efetiva em aplicações envolvendo TFD do que em terapias convencionais (ausência de luz). Diante disso, um dos grandes desafios para potencializar o desempenho da CUR na TFD relaciona-se ao aumento de geração de 1O_2 , levando a melhores resultados terapêuticos. Dentre as técnicas empregadas, uma que vem se destacando atualmente é a combinação de fármacos FS com nanopartículas metálicas. Os estudos tem mostrado que a combinação de FS com nanopartículas metálicas, especialmente as de prata, acarretam em um significativo aumento na geração de oxigênio singleto. A esse fenômeno foi dado o nome de melhoria na geração de oxigênio singleto por metais (ME¹O₂ - *metal enhanced singlet oxygen generation*).^{111, 112}

Esse efeito foi atribuído à presença de nanopartículas metálicas nas proximidades do FS, estando intimamente relacionado à distância e a superposição espectral entre o FS e as nanopartículas, elevando significativamente a geração $^1\text{O}_2$. A potencialização na produção de $^1\text{O}_2$ se manifesta como resultado de um aumento da população do estado singleto/triplete do FS devido a um aumento líquido geral da sua absorção.^{11, 113} Esse aumento de absorção resulta do acoplamento entre o momento de dipolo do FS e o campo elétrico próximo à superfície das nanopartículas metálicas, permitindo que o FS "sinta" um campo elétrico maior.¹¹⁴

Nesse sentido, a combinação da CUR com nanopartículas metálicas, como, por exemplo, nanopartículas metálicas de prata (AgNPs), são promissoras no aumento da produção de $^1\text{O}_2$ pela CUR, consequentemente potencializando sua atividade fotodinâmica.

Além da utilização da CUR como FS na TFD, é crucial a utilização de sistemas de incorporação, biotransporte e biodisponibilização.¹¹⁵ Diversos estudos reportam o encapsulamento da CUR a fim de melhorar a sua solubilidade e aumentar a sua biodisponibilidade. Khan *et al.* utilizaram nanopartículas de PLGA-poli(ácido lático-co-glicólico) carregadas de CUR, as quais demonstraram uma diminuição da viabilidade celular em células de câncer de pulmão.¹¹⁶ Ainda, Sheikhpour *et al.* relatou diminuição da viabilidade celular e aumento de apoptose em células de câncer de pulmão para CUR encapsulada em lipossomas de fosfatidilcolina e 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina estabilizados com PEG e colesterol.¹¹⁷ Lu *et al.* demonstrou o aumento da permeabilidade de CUR na pele a partir de seu encapsulamento em lipossomas.¹¹⁸

Diante do exposto anteriormente, verifica-se que a combinação da CUR com doses de luz pela TFD mediada pelas vantagens da nanotecnologia tem se destacado como uma estratégia promissora na melhoria de suas propriedades anticancerígenas. Assim, nanopartículas metálicas, como as AgNPs, podem potencializar a geração de oxigênio singleto e sistemas de *drug delivery* podem corroborar na sua estabilização, biotransporte e biodisponibilização. Essas vertentes serão discutidas a seguir.

2.4 NANOTECNOLOGIA NA BIOMEDICINA

O termo nanotecnologia passou a ser popularmente difundido a partir da conferência dada por Richard Feynman em 1959, intitulada como "*There's Plenty of Room at the Bottom*", a qual ficou conhecida devido a sua proposta de escrever a Enciclopédia Britânica na cabeça de um alfinete. Na verdade, ele estava propondo algo até então inexplorado, para isso seria necessário a manipulação de matéria na escala atômica.¹¹⁹

As nanopartículas apresentam propriedades térmicas, mecânicas, magnéticas e óticas diferentes das encontradas nos materiais em macroescala.¹²⁰ Na aplicação biomédica, o estudo de nanocarreadores têm levado a inovações no tratamento de doenças.^{121,122} Sua utilização como

sistemas de entrega de fármacos (do inglês, “*drug delivery system*”) busca a entrega seletiva e melhorada de moléculas bioativas. Além disso, o uso de sistemas de *drug delivery* apresenta resultados de melhoria na biodistribuição, aumento do tempo de circulação do fármaco no organismo, liberação prolongada e elevada biodisponibilidade.^{123, 124}

Para aplicações biomédicas, um nanocarreador ideal busca atingir o tecido alvo de forma seletiva, no intuito de diminuir a toxicidade dose-limitante e os efeitos colaterais ao paciente.^{125, 126} Além disso, para que a entrega seletiva possa ocorrer, a nanopartícula não deve ser reconhecida pelo sistema imunológico do paciente. O sistema fagocitário mononuclear, ou sistema reticuloendotelial (SRE), atua na defesa do organismo, eliminando nanopartículas através do processo de opsonização. A opsonização ocorre por meio da ligação entre as opsoninas do sangue à superfície das nanopartículas, induzindo a fagocitose e gerando acúmulo renal e posterior eliminação do sistema.¹²⁷ Pesquisas mostram que sistemas furtivos (do inglês, *stealth liposomes*), que não são captados pelo sistema SRE, devem apresentar diâmetros menores que 200 nm, superfícies hidrofílicas e baixa carga superficial (potencial zeta entre -10 mV a + 10 mV).^{127, 128, 129}

Quanto à estrutura de nanopartículas aplicadas à biomedicina, estas são bastante variáveis, podendo ser utilizadas micelas, pontos quânticos, nanopartículas metálicas, nanofibras, lipossomas, entre outros.¹³⁰ No presente estudo, serão empregados dois tipos distintos de nanopartículas, almejando objetivos diferentes. Em um primeiro momento, apresentaremos as nanopartículas metálicas (item 2.5), especificamente as AgNPs, aqui empregadas com o intuito de aumentar a geração de oxigênio singleto pela CUR. Trata-se, portanto, de um “possível fármaco coadjuvante” nas formulações que serão obtidas. Na sequência será abordado o sistema de carregamento escolhido para a incorporação dos possíveis fármacos estudados (CUR e AgNPs), os lipossomas. As vesículas lipossomais se destacam como as primeiras nanopartículas terapêuticas clinicamente aprovadas pela FDA para o tratamento do câncer.¹³¹ Além disso, pesquisas científicas têm evidenciado a eficácia do efeito EPR em nanopartículas lipossomais.^{132, 133}

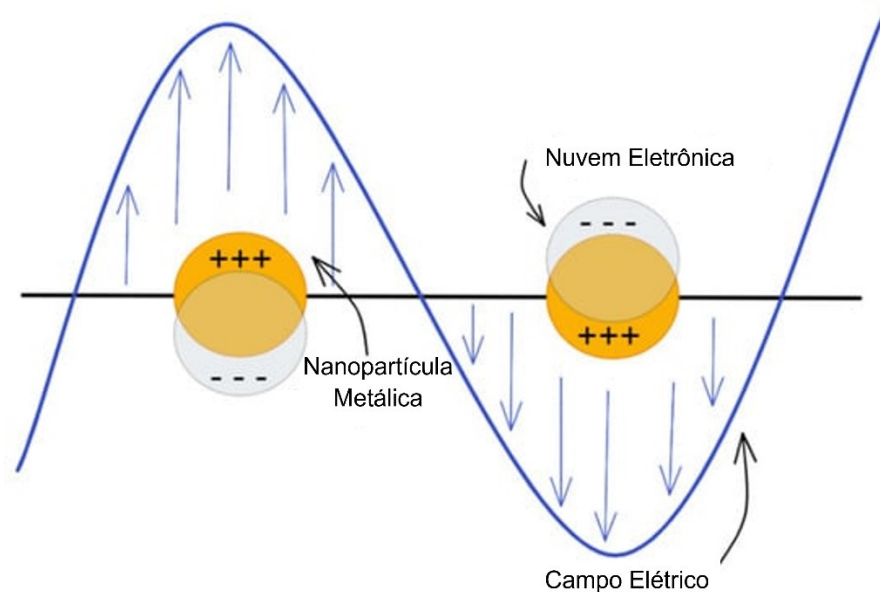
2.5 NANOPARTÍCULAS DE PRATA

Nanopartículas metálicas têm fascinado cientistas por mais de um século e atualmente são muito utilizadas nas ciências biomédicas e engenharias. Este interesse está relacionado às propriedades físicas, químicas e biológicas que estes materiais apresentam quando estão na forma de nanopartículas e que são diferentes das propriedades apresentadas pelo material em macroescala. A ciência atual permite que esses materiais sejam sintetizados e modificados com vários grupos químicos funcionais, permitindo a conjugação com anticorpos, ligantes e medicamentos de interesse. Isso abre

um amplo leque de aplicações potenciais em biotecnologia, separação magnética, entrega direcionada de fármacos e em imagens diagnósticas.¹³⁴

Nanopartículas metálicas possuem geralmente tamanhos entre 1-100 nm e apresentam uma banda de absorção na região do visível (entre 400-800 nm). Esta absorção ocorre devido à ressonância plasmônica, na qual ocorrem interações eletrônicas da banda de condução do metal com a radiação eletromagnética, assim os elétrons de condução atuam como osciladores harmônicos em resposta ao campo oscilante e os elétrons livres do metal formam uma nuvem eletrônica que oscila coletivamente, conforme representado na Figura 4, sendo tais oscilações denominadas de ressonância plasmônica de superfície (SPR).^{135, 136} A ressonância plasmônica de superfície localizada (LSPR) é um fenômeno óptico gerado a partir da interação entre a luz incidente e os elétrons da superfície em uma banda de condução em nanopartículas. Esta interação produz oscilações plasmônicas localizadas e coerentes com uma frequência ressonante que depende fortemente da composição, tamanho, geometria, ambiente dielétrico e distância de separação partícula-partícula dos NPs.¹³⁷

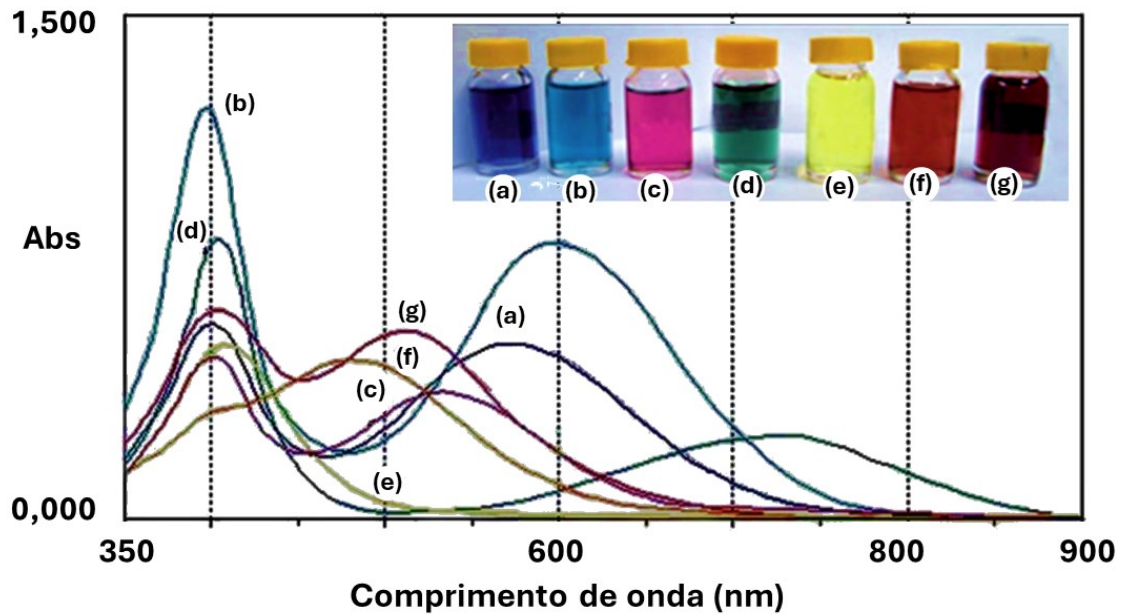
Figura 4. Ressonância plasmônica de superfície em nanopartículas metálicas



Fonte: Adaptada de Serafinelli *et al.*¹³⁸

As nanopartículas de prata (AgNPs) se destacam devido às suas propriedades elétricas, térmicas e ópticas. As AgNPs absorvem na região do visível, apresentando diversas colorações conforme o tamanho das nanopartículas. Com isso, é possível estimar seu tamanho a partir de análises de espectroscopia de absorção UV-Vis, conforme pode ser observado na Figura 5. Além disso, podem apresentar diferentes morfologias conforme o método de preparo.¹³⁹

Figura 5. Espectro UV-Vis de AgNPs com diferentes tamanhos: (a) violeta (b) azul (c) roxo (d) verde (e) amarelo (f) laranja e (g) vermelho. No inserto, é possível observar as diferentes colorações para AgNPs.



Fonte: Adaptada de *Mendis et al.*¹⁴⁰

Diversas técnicas são utilizadas para a síntese de AgNPs, podendo ser mediadas por processos químicos, físicos, fotoquímicos e biológicos. A síntese química envolve um agente redutor e o uso de estabilizantes para a nanopartícula formada. A síntese física inclui os métodos de decomposição térmica e evaporação/condensação. Nas sínteses chamadas de biossíntese são utilizados bactérias, fungos e extratos de plantas para a obtenção de nanopartículas. Já uma reação fotoquímica envolve a fotorredução de um precursor metálico, geralmente na forma de sal, por uma fonte de luz para a obtenção das nanopartículas.^{141, 142}

A síntese de AgNPs a partir da indução da reação de redução com citrato de sódio através de iluminação UV já foi previamente reportada.¹⁴³ O uso de um agente estabilizante para controlar a formação homogênea de nanopartículas com o tamanho e forma esperados é importante, assim como para ajudar a prevenir a aglomeração e possível precipitação das nanopartículas metálicas.¹⁴⁴ Uma vasta gama de reagentes pode ser utilizada como estabilizante, o principal deles é o citrato de sódio (TSC, $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$). No entanto o TSC apresenta uma desvantagem por ser considerado um agente redutor fraco, dificultando a obtenção de uma síntese monodispersa. Apesar disso, a síntese fotoquímica de nanopartículas utilizando o TSC como agente de revestimento tem sido amplamente investigada, pois resulta na formação de complexos relativamente estáveis de maneira simples.¹⁴⁵

Além disso, a utilização de luz na obtenção de nanopartículas metálicas evita a utilização de altas temperaturas durante a síntese, tornando a metodologia mais simples e rápida.

Além disso, estudos mostram a produção de nanopartículas metálicas utilizando polímeros, como o Pluronic F127, que atuam como agente redutor e estabilizante da nanopartícula, através de um processo de oxirredução. Alexandridis *et al.*¹⁴⁶ propuseram diferentes mecanismos para a síntese de AgNPs a partir da redução de Ag^+ por copolímeros em bloco PEO-PPO em solução aquosa. O mecanismo mais provável ocorre a partir da redução de íons Ag^+ ligados com cavidades (estrutura de éter pseudocoroa) através da oxidação de segmentos de oxietileno e oxipropileno pelo centro metálico.¹⁴⁷ O poli(óxido de etileno) (PEO) forma uma conformação semelhante aos éteres coroa (estrutura de éter pseudocoroa) ligando-se a íons metálicos em solução aquosa devido às interações íon-dipolo entre os íons metálicos e os pares solitários de elétrons das ligações de óxido de etileno.

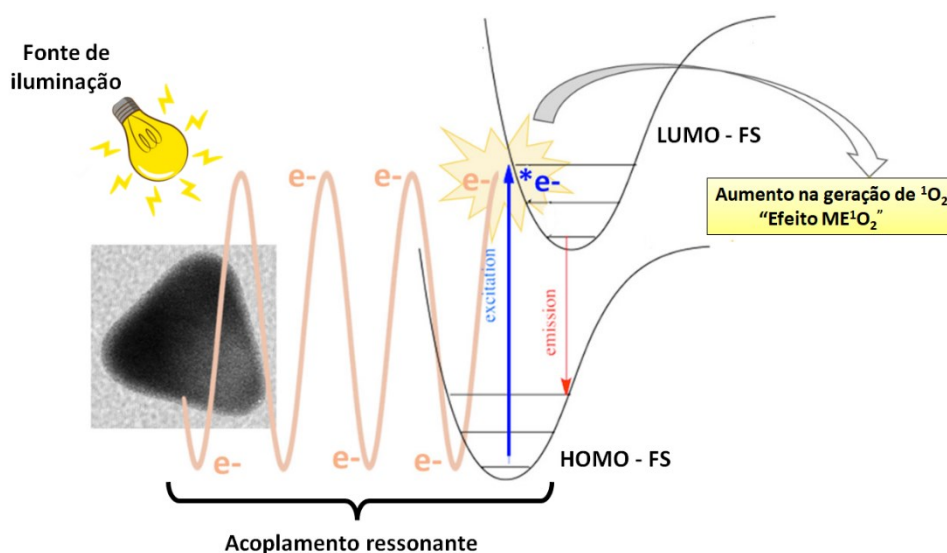
Quanto às suas aplicações, as AgNPs possuem excelente atividade antimicrobiana e já são utilizadas em diversos produtos incluindo instrumentos cirúrgicos e para manipulação de alimentos, roupas, cosméticos, produtos odontológicos, cateteres e curativos.¹⁴⁸ No campo biomédico estas têm sido empregadas no diagnóstico para contraste em imagens biológicas.¹⁴⁹ As AgNPs também atuam como agentes antitumorais, causando uma diminuição progressiva de células tumorais.¹⁵⁰ Isto pode ser devido às suas ações inibitórias em vários mecanismos de sinalização responsáveis pelo desenvolvimento e patogênese do câncer. Em conjunto, essas informações sugerem que as AgNPs podem induzir citotoxicidade nas células cancerosas e inibir a progressão do tumor sem serem letais para as células normais.¹⁵¹ A toxicidade das AgNPs está ligada à sua produção de EROs, as quais podem causar danos ao DNA, lipídios e proteínas. O estudo sobre os efeitos prejudiciais dessas nanopartículas em células hepáticas e fibroblastos primários, realizado por Arora *et al.*¹⁵², revelou que AgNPs ativam mecanismos antioxidantes nas mitocôndrias. Além disso, várias publicações mostram a correlação entre a concentração de espécies reativas de oxigênio (EROs) e danos mitocondriais. A superprodução de EROs pode desnaturar diversas proteínas antiapoptóticas e iniciar a expressão de proteínas pró-apoptóticas.¹⁵³

Como supracitado, a combinação de nanopartículas metálicas com FS tem potencial para conduzir a um aumento significativo na geração de oxigênio singleto, efeito ME^1O_2 .¹⁵⁴ A presença de nanopartículas metálicas próximas ao FS leva a um aumento populacional do estado singleto/tripletto excitado do FS, por conta do aumento líquido geral de sua absorção, que ocorre devido ao acoplamento entre o momento de dipolo do FS e o campo elétrico próximo à superfície das nanopartículas.¹⁵⁵

A combinação AgNPs/FS se torna efetiva quando as moléculas do FS se aproximam suficientemente da nanopartícula metálica.¹⁵⁶ Além disso, quanto maior for a área de contato entre a AgNPs e o FS, maiores serão os efeitos observados. Um outro aspecto crucial para a efetividade da

combinação é a possibilidade de utilização da mesma fonte de iluminação. Nesse sentido, já foi demonstrado na literatura que o aumento da sobreposição espectral entre a banda de absorção eletrônica do FS e a banda plasmônica da nanopartícula metálica favorece a formação de oxigênio singlete.¹⁵⁷ Como discutido anteriormente, metais como Au e Ag são capazes de utilizar a luz visível devido ao seu efeito LSPR, altamente dependente do tamanho e formato do NP.¹⁴⁰ Quando a energia para a excitação LSPR é semelhante às diferenças de energia dos orbitais HOMO-LUMO do FS (Figura 6), o acoplamento ressonante é mais eficiente. Dessa maneira, o campo magnético próximo à superfície da nanopartícula metálica aumenta a população de estado singlete excitado do FS ($^1\text{FS}^*$).

Figura 6. Diagrama do mecanismo para o efeito de acoplamento ressonante entre a banda SPR da nanopartícula metálica com os níveis HOMO-LUMO de um fotossensibilizador.



Fonte: Adaptado a partir de Silva *et al.*¹⁵⁸

Sendo assim, a migração de elétrons quentes da AgNPs para as moléculas de FS é fortemente dependente de sobreposição espectral, ou seja, quanto maior a sobreposição espectral, maior o acoplamento ressonante e maior será a população do estado excitado singlete do FS. Assim, aumentando a população de $^1\text{FS}^*$, tende-se também a observar o aumento no estado tripleto excitado e, por consequência, um aumento na sua geração de oxigênio singlete.

Dada a possibilidade de melhoria das propriedades fotofísicas dos FS, vários estudos têm sido direcionados a essa vertente. Wang *et al.*¹⁵⁹ demonstrou a eficácia de nanoestruturas híbridas constituídas por AgNPs revestidas por sílica mesoporosa incorporada com hematoporfirina IX (Ag@mSiO₂@HPIX). Os autores observaram que a excitação dos híbridos Ag@mSiO₂@HPIX com luz azul (400 nm) exibiu uma maior geração de $^1\text{O}_2$ com um fator de aprimoramento de 3,1 em comparação com HPIX livre.

No estudo realizado por Silva *et al.*¹⁶⁰ foram obtidos nanohíbridos AgNPs e azul de metileno incorporados e micelas de Pluronic® F127. Os resultados demonstraram que a modulação de distância AgNP-MB na matriz Pluronic® é um parâmetro relevante no aprimoramento das propriedades fotofísicas. Da mesma forma, nanocarreadores híbridos de FS e nanopartículas de ouro (AuNPs) revestidos com SiO₂ incorporada com azul de metileno¹⁶¹, nanoestrelas de Au revestidas de sílica incorporadas com MB¹⁶², nanobastões de ouro revestidos com sílica ligados a ftalocianina (AlC4Pc)¹⁶³, AuNPs conjugadas com ácido 5-aminolevulínico¹⁶⁴, AuNPs conjugadas com ftalocianina¹⁶⁵, exibiram aumento na geração de ¹O₂ resultando em efeitos fotodinâmicos aprimorados. Outros estudos foram realizados envolvendo a CUR combinada com AgNPs.

Ghasemi *et al.*¹⁶⁶ analisaram a inativação fotodinâmica a partir da combinação entre nanopartículas de CUR e prata, mostrando que a combinação reduziu o número de bactérias nas formas planctônica e de biofilme de *Pseudomonas aeruginosa*. A combinação de CUR-AgNPs também mostrou resultados efetivos para a redução da viabilidade celular de células cancerosas.¹⁶⁷ Diante dos dados acima sumarizados, acredita-se que a combinação de AgNPs com CUR seja uma alternativa promissora para o aumento de sua atividade fotodinâmica. Contudo, para que os fármacos possam ser efetivamente combinados, estabilizados e biotransportados, é crucial a utilização de um sistema de carregamento comum a ambos. Por essa razão, no presente estudo optou-se por empregar sistemas lipossomais, capazes de incorporar simultaneamente tanto a CUR como as AgNPs, cujas peculiaridades serão abordadas no item a seguir.

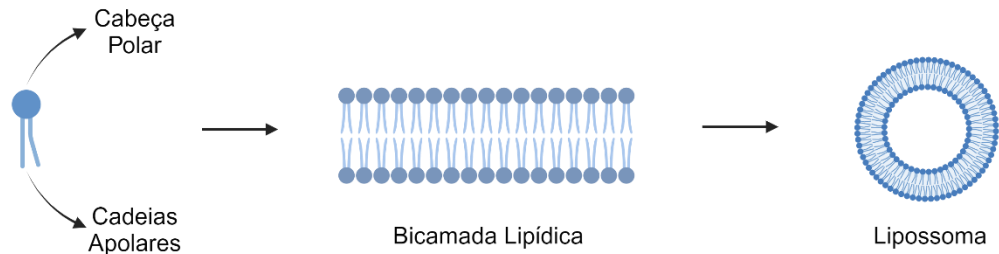
2.6 LIPOSSOMAS

Lipossomas são estruturas vesiculares formadas a partir de fosfolipídios, os quais estão presentes em células animais e são os principais constituintes das membranas plasmáticas.¹³² Os fosfolipídios são constituídos por uma cabeça polar, um grupo glicerol e duas caudas hidrofóbicas, formadas por ácidos graxos saturados ou insaturados. Em meio aquoso estes se orientam gerando uma bicamada lipídica, que apresenta em seu centro uma cavidade aquosa, conforme mostrado na Figura 7. Os sistemas lipossomais destacam-se como sistemas carreadores de fármacos devido à possibilidade de carrear tanto fármacos hidrofóbicos, na bicamada lipídica, como fármacos hidrofílicos, no poço aquoso interno.

Além disso, possuem a vantagem de serem sistemas altamente versáteis e biocompatíveis. Assim, suas características como tamanho, lamelaridade, superfície, composição lipídica, volume e composição do meio aquoso interno podem ser manipuladas de acordo com a aplicação almejada.¹⁶⁸ Ainda, os lipossomas possuem a vantagem de compartilhar semelhanças estruturais com as membranas biológicas. Essa notável semelhança estrutural resulta em uma interação mais significativa

com as membranas celulares. Dentre os mecanismos propostos para a interação e penetração das células, destacam-se a adsorção, a endocitose, a troca lipídica e a fusão como os mais relevantes.⁷

Figura 7. Estrutura dos fosfolipídios, bicamada lipídica e lipossoma.



Fonte: Adaptado de De Freitas.¹⁶⁹ Criado utilizando BioRender.com

Os fosfolipídios utilizados para a formação de lipossomas podem apresentar natureza catiônica, zwitteriônica ou aniônica. A presença da carga nos fosfolipídios gera uma repulsão eletrostática entre os lipossomas formados, criando um potencial de superfície ζ , o qual dificulta a agregação e floculação do sistema.¹⁷⁰ Os lipídios zwitteriônicos vêm sendo usados para reduzir a adsorção de proteínas em lipossomas e prolongar seu tempo de circulação.¹⁷¹

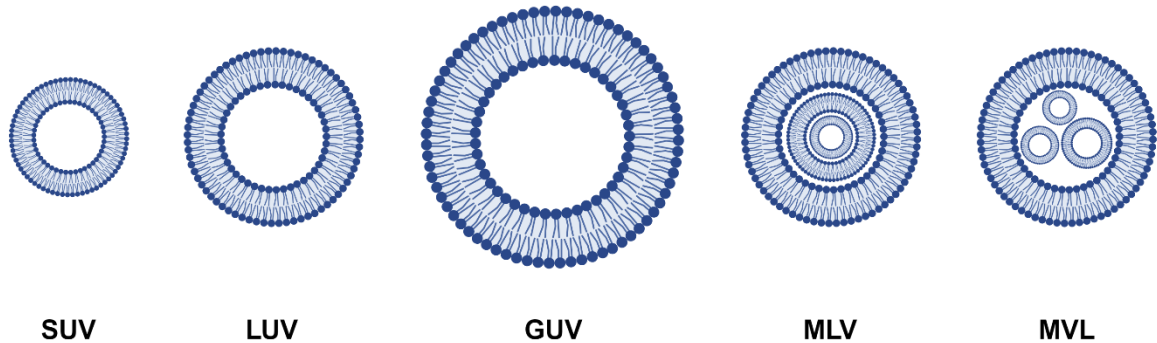
Os lipossomas carregados negativamente são geralmente constituídos por lipídios aniônicos. Dados da literatura mostram que os lipossomas carregados negativamente, devido às suas propriedades eletrostáticas, são menos estáveis que os lipossomas neutros e positivos quando injetados na circulação sanguínea. Lipossomas aniônicos interagem rapidamente com o sistema biológico após sua opsonização. Esta interação leva a duas consequências: são rapidamente absorvidos pelo sistema reticuloendotelial (SER) e leva a efeitos tóxicos, com a aparição de vasoconstrição, hipertensão pulmonar e queda no número de plaquetas e leucócitos circulantes.¹⁷²

Os lipossomas catiônicos são normalmente utilizados para entrega de genes, devido a interação eletrostática entre lipídios carregados positivamente e ácidos nucléicos carregados negativamente.¹⁷³ São constituídos por fosfolipídios neutros naturais e lipídios carregados positivamente. Estes são amplamente aplicados na literatura, devido sua biocompatibilidade e resultados promissores *in vitro* e *in vivo*.¹⁷⁴

Quanto à estrutura lipossomal os fosfolipídios podem se organizar em duas classes distintas: unilamelares, formando uma bicamada lipídica única ou multilamelares, formando bicamadas múltiplas com um compartimento aquoso central e com diâmetros que variam de 500 a 3500 nm. Os lipossomas unilamelares, Figura 8, podem também ser classificados de acordo com seu tamanho, vesículas unilamelares pequenas (do inglês, *Small Unilamellar Vesicles- SUV*) apresentam diâmetros entre 20 e 100 nm e as vesículas unilamelares grandes (do inglês *Large Unilamellar Vesicles-LUV*) apresentam diâmetros que variam entre 100 e 1000 nm. Vesículas com tamanhos superiores a 1,0 μm

são descritas como vesículas unilamelares gigantes (do inglês *Giant Vesicles- GUV*). Por outro lado, as vesículas multilamelares (*Multilamellar Vesicles, MLV*) são constituídas por bicamadas fosfolipídicas concêntricas intercaladas por compartimentos aquosos. Por fim os lipossomas também podem se apresentar em forma de múltiplas vesículas não concêntricas, chamados de lipossomas multivesiculares (do inglês, *Multivesicular Vesicles-MVL*).¹⁶⁸

Figura 8. Figura mostrando os diferentes tipos de lipossomas.



Fonte: Adaptado de De Freitas.¹⁶⁹. Criado utilizando BioRender.com

A literatura fornece diversos métodos de preparo para lipossomas, sendo as mais comuns descritas a seguir. A injeção etanólica consiste na dissolução dos lipídios em etanol seguido por sua injeção rápida em água aquecida em excesso e por fim, a remoção do solvente orgânico.¹⁷⁵ Na evaporação por fase reversa os lipídios são solubilizados em meio orgânico e a adição de água e sonicação ao meio favorece a formação de micelas reversas. Em seguida, a evaporação do solvente orgânico provoca o colapso de várias micelas, resultando na formação de um organogel de elevada densidade. Assim, os fosfolipídios em excesso formam uma bicama ao redor das micelas resíduas, gerando os lipossomas.¹⁷⁶ A via microfluídica é uma tecnologia emergente para a obtenção de lipossomas, pois permite o controle preciso do processo de hidratação lipídica, sendo que este controle das condições de fluxo e mistura tem sido aplicados para alterar o tamanho das partículas e a fim de melhorar a homogeneidade de sistemas.¹⁷⁷ No entanto, o método mais utilizado na literatura ainda é a dispersão sólida. Neste método os fosfolipídios são dissolvidos em um solvente orgânico, o qual é posteriormente eliminado através da evaporação à pressão reduzida. Após a completa eliminação do solvente o filme fino é hidratado, sob agitação vigorosa, gerando os lipossomas. As vesículas obtidas apresentam diferentes tipos e tamanhos e comumente são aplicados processos de uniformização, sendo a extrusão mecânica através de membranas o mais comum.^{178, 179}

As vesículas formadas apresentam uma temperatura de transição de fase (T_m). Em temperaturas inferiores à T_m as nanoestruturas formam uma fase gel, onde as cadeias carbônicas dos lipídios apresentam uma conformação *trans* e estes possuem certa rigidez. Em temperaturas iguais ou

superiores à T_m os lipídios passam a se comportar de forma fluida, tendo liberdade de movimento. Nesta forma, a bicamada lipídica se encontra na fase cristal-líquido e com conformação gauche. A temperatura de transição de fase dos fosfolipídios é influenciada pelo comprimento e saturação da cadeia, sendo um dos fatores avaliados na escolha do fosfolipídio ideal para o sistema carreador. Na fase gel os lipossomas apresentam baixa permeabilidade, preservando o fármaco interno, porém dificultando sua internalização em sistemas biológicos. Quando em temperaturas próximas à T_m , a bicamada lipídica possui alta permeabilidade por conta da região interfacial de coexistência das fases gel e cristal-líquido.¹⁸⁰

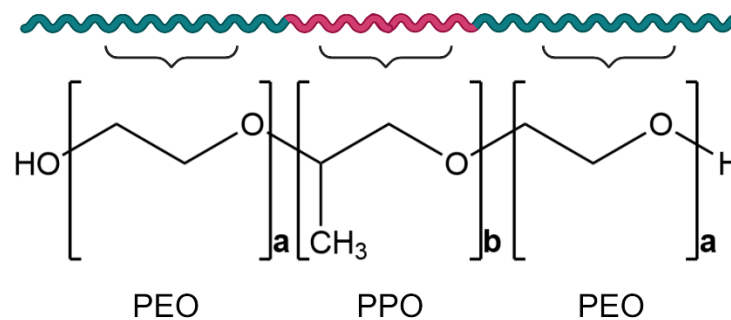
Lipossomas convencionais são compostos por uma bicamada lipídica que pode ser composta por fosfolipídios catiônicos, aniônicos ou zwitteriônicos. Seu potencial clínico passou a ser estudado a partir de 1980 quando foram utilizados para melhorar a farmacocinética de fármacos como Doxorubicina e Anfotericina.^{181, 182} Os lipossomas convencionais apresentaram bons resultados em termos de redução da toxicidade dos compostos *in vivo* e melhoria na biodistribuição. No entanto, como citado anteriormente, estes são rapidamente eliminados através do sistema reticuloendotelial (SRE). O aperfeiçoamento de lipossomas pode ser feito pelas modificações em suas características estruturais, alterando a sua composição lipídica e também na carga superficial pela utilização de ligantes de revestimento.¹²⁵ Assim, houve o surgimento de lipossomas teranósticos, sítio-específicos e de longa circulação.

A fim de melhorar a estabilidade dos sistemas lipossomais e aumentar seu tempo de circulação no sangue são desenvolvidos os lipossomas de longa-circulação, nos quais a presença de um ligante em sua superfície causa um efeito estérico, melhorando assim sua estabilidade.^{183, 184} Na literatura a modificação mais utilizada é a do polímero polietilenoglicol (PEG). Por conta de sua hidrofiliabilidade ocorre a formação de uma zona de hidratação em torno dos lipossomas, fazendo com que a adsorção de proteínas em sua superfície seja dificultada.¹²⁵ O revestimento com PEG mostra resultados quanto à prolongação dos tempos de circulação na corrente sanguínea, chegando a tempos de 45 horas em humanos e variando conforme o tamanho das partículas e características do revestimento polimérico.^{185, 186} No entanto lipossomas peguilados demonstram uma redução em sua habilidade de interagir com os tecidos alvos.¹⁸⁷ Além disso, estudos mostram que a partir da injeção de uma segunda dose estas partículas passam a sofrer reconhecimento pelo SRE e sofrem de um efeito chamado de Depuração Sanguínea Acelerada (do inglês, *Accelerated Blood Clearance*), diminuindo a eficácia das formulações.¹⁸⁸

A partir das dificuldades encontradas quanto a aplicação de lipossomas peguilados, busca-se alternativas para o aumento da estabilidade lipossomal. Os copolímeros tribloco do tipo ABA, comercializados principalmente como Plurônic® ou Poloxamer, passam a se destacar nesta função. Estes são constituídos por dois grupos hidrofílicos poli(óxido de etileno) (PEO) e um grupo hidrofóbico

poli(óxido de propileno) (PPO) ligados em sequência (EO)_a(PO)_b(EO)_a, conforme demonstrado na Figura 9. Plurônicos são polímeros comerciais aprovados pela FDA para uso humano. Quando em solução, acima de sua concentração micelar crítica (CMC) e temperatura micelar crítica (TMC) se auto-organizam formando micelas poliméricas do tipo *core-shell*. Quando em concentrações abaixo de sua CMC se apresentam na forma de monômeros, de forma que podem ser adicionados à preparação de lipossomas.¹⁸⁹

Figura 9. Estrutura química dos Plurônicos®.



Fonte: Adaptado a partir de Yu *et al.*¹⁹⁰

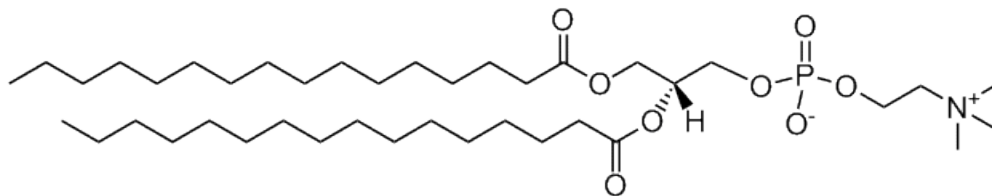
Estudos já publicados mostram a formação de lipossomas híbridos polimérico-lipídicos, os quais se mostram muito mais estáveis em solução que lipossomas convencionais. Destaca-se dentro deste grupo o Plurônico® F127 (EO)₁₀₆(PO)₇₀(EO)₁₀₆. Este polímero apresenta alta biocompatibilidade e acelera o mecanismo de translocação lipídica transmembrana.¹⁹¹ Freitas *et al.*⁸ demonstraram que o copolímero F127 é capaz de interagir com o fosfolípido dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfolina (DPPC) levando à formação de lipossomas híbridos polimérico-lipídicos altamente estáveis em relação aos lipossomas convencionais. Estes lipossomas são obtidos a partir de uma metodologia simples e rápida, através do método de dispersão sólida aliado à sonicação, não apresentando a necessidade da etapa de extrusão.⁸ A utilização de copolímeros tribloco apresenta maior interação com a bicamada lipídica do lipossoma, devido à unidade central hidrofóbica que pode se orientar em conjunto com os fosfolípidos na construção da bicamada.¹⁹² O mecanismo de formação dos lipossomas pode ser descrito através do modelo “*Budding Off*”, onde as cadeias de PEO desempenham um papel importante na formação de vesículas “filhas” (vesículas finais – SUVs) a partir de vesículas “mães” (vesículas iniciais – LUVs).⁸

Um fator crucial na obtenção de lipossomas híbridos constituídos por fosfolípidos e Plurônicos é a relação entre as concentrações de ambos e o efeito da temperatura. Assim, dada a possibilidade de formação de micelas por esses copolímeros, é de suma importância que as concentrações empregadas sejam inferiores à sua CMC. Ademais, a mudança de temperatura (dada a aplicação no organismo) deve manter as nanoestruturadas na forma de vesículas. Estudos anteriores realizados por Pedrozo *et al.*¹²⁵ investigaram a faixa de concentração permitida para a formulação

DPPC-F127. No estudo, a TMC do copolímero na presença de lipossomas em fase gel foi avaliada em função da variação de anisotropia de fluorescência da sonda 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene (DPH) (rDPH). Assim, quando o DPH se encontrava exclusivamente na presença de lipossomas o valor de rDPH era superior a 0,2. No entanto, uma queda drástica nos valores de rDPH era observada com a formação de micelas em decorrência da mudança de temperatura do meio, dada a partição do DPH, previamente carregado nos lipossomas, em micelas formadas. Os autores verificaram que concentrações inferiores a $2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (0,025% m/V) do Pluronic® F127 eram ideais e seguras para a obtenção de lipossomas variando-se a temperatura de 25 a 40 °C.

A partir disso optou-se neste trabalho por empregar lipossomas híbridos polimérico-lipídicos descrito acima a fim de incorporar CUR e AgNPs. O DPPC (**Figura 10**) é um fosfolípido zwitteriônico, que está presente no corpo humano atuando como surfactante pulmonar. Possui cadeia saturada e sua temperatura de transição de fase é de 41,4 °C.¹⁹³

Figura 10. Estrutura química do fosfolípido DPPC.



3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Preparar, caracterizar e aplicar os sistemas lipossomais híbridos polimérico-lipídicos à base de DPPC (1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina) e copolímero tribloco Pluronic® F-127, incorporando curcumina e nanopartículas de prata para a aplicação em Terapia Fotodinâmica.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- i. Preparar o sistema lipossomal híbrido polimérico-lipídico de DPPC e Pluronic® F-127 e avaliar sua estabilidade;
- ii. Carregar o sistema lipossomal de DPPC e Pluronic® F-127 com curcumina (CUR) e nanopartículas de prata (AgNPs) e avaliar a sua estabilidade, características espectroscópicas e eficiência de encapsulamento.
- iii. Caracterizar os sistemas por espalhamento de luz dinâmico, potencial zeta (ζ) e microscopia eletrônica de transmissão.
- iv. Caracterizar e avaliar a interação entre a CUR com o sistema lipossomal, através de análises de UV-Vis e fluorescência, assim como sua constante de ligação ao sistema;
- v. Avaliar a temperatura de transição de fase (T_m) dos lipossomas híbridos polimérico-lipídicos na ausência e na presença de CUR e AgNPs.
- vi. Avaliar as interações existentes entre os constituintes das formulações por espectroscopia na região do infravermelho.
- vii. Analisar a supressão de fluorescência da CUR ao sistema lipossomal almejando estimar a sua localização na bicamada lipídica;
- viii. Determinar as propriedades fotofísicas da CUR incorporada ao sistema híbrido polimérico-lipídico na presença de AgNPs;
- ix. Examinar a citotoxicidade e fototoxicidade nas formulações obtidas em células cancerígenas células de câncer de melanoma B16-F10;
- x. Realizar ensaios de permeação *ex vivo* das formulações em pele humana empregando a célula de Franz e quantificar por fluorescência e Espectroscopia de Absorção Atômica.

4 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

4.1 MATERIAIS

O fosfolipídio 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DPPC, $M = 734,04 \text{ g mol}^{-1}$, >99%) foi adquirido da Avant Polar Lipids (Alabama, EUA). O Pluronic® F127 ($M = 12.600 \text{ g mol}^{-1}$), nitrato de prata, iodeto de potássio, citrato de sódio, ácido 9,10-antracenoil-bis(metileno)dimalônico (ABDA), e curcumina (CUR, 67%) foram obtidos da Sigma Aldrich. Todos os solventes empregados eram de grau analítico e foram usados sem purificação adicional. A água utilizada foi ultrapura.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Preparação dos lipossomas híbridos polimérico-lipídicos

Os lipossomas polimérico-lipídicos constituídos por DPPC e F127 (DPPC-F127) foram obtidos conforme De Freitas *et al.*¹⁹⁴, adaptando-se a metodologia de dispersão sólida para formação de filme fino.¹⁹⁵

O lipídio DPPC na concentração de $1,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e o copolímero F127 na concentração $1,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (0,02% m:V) foram dissolvidos em clorofórmio e metanol, respectivamente. Na sequência, as soluções foram misturadas em uma proporção 4:1 (V:V). Em seguida, o solvente foi removido em um evaporador rotativo à vácuo até a completa evaporação do solvente, em temperatura de 40 °C com o balão suspenso em relação ao banho. Esse cuidado foi tomado para evitar a rápida evaporação do solvente que levaria à formação de um filme fino desuniforme. O sistema foi deixado em dessecador sob vácuo durante 24 horas para garantir a completa eliminação do solvente. O filme fino seco e devidamente uniforme foi então hidratado com 10,0 mL de água ultrapura com aquecimento em torno de 40-45 °C e sonicação em ultrassom de bancada (Cristófoli Equipamentos de Biossegurança LTDA, com frequência de 42 kHz) durante aproximadamente 15 minutos. A formação dos lipossomas foi acompanhada por espalhamento de luz dinâmica (DLS). Destaca-se que não foi necessário realizar nenhum método de uniformização, como por exemplo a extrusão, para a obtenção de lipossomas uniformes.

4.2.2 Síntese e incorporação de nanopartículas de prata (AgNPs) ao sistema lipossomal

As nanopartículas de prata foram geradas *in situ* a partir da redução de sal de prata (AgNO_3) utilizando-se citrato de sódio ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) em água com iluminação UV-Vis (com comprimento de onda variando de 370 a 435 nm, $\lambda_{\text{max}} = 400 \text{ nm}$ e $I = 67,48 \text{ W m}^{-2}$).^{196, 197, 198} A fonte de luz empregada para a síntese foi um LED, com comprimento de onda de emissão e potências determinados em esfera

integradora, no Laboratório de Optoeletrônica Orgânica e Sistemas Anisotrópicos (LOOSA). É importante salientar que a faixa de emissão na região do UV, maior energia, é que levará ao processo de síntese das nanopartículas por “fotoindução”.

Em um béquer foram adicionados 5,0 mL da dispersão lipossomal, 50 μL de uma solução estoque de AgNO_3 na concentração $1 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ e 50 μL de uma solução estoque de $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ de mesma concentração. O sistema foi mantido com agitação constante e iluminação UV durante 30 minutos. Vale destacar que a síntese foi realizada em condição de temperatura ambiente. Ao final do tempo é possível verificar a mudança de coloração da solução para alaranjado claro. As amostras obtidas foram denominadas DPPC-F127-AgNPs.

4.2.3 Incorporação de Curcumina ao sistema

A incorporação de CUR ao sistema lipossomal de DPPC-F127 e DPPC-F127-AgNPs foi realizada pelo método de adição passiva.¹⁹⁹ É importante deixar claro que se optou pela incorporação passiva devido à síntese fotoinduzida nas AgNPs na amostra DPPC-F127-AgNPs-CUR. Assim, caso a incorporação ativa fosse realizada, a CUR passaria pela exposição à radiação UV-Vis de alta intensidade e certamente sofreria fotobranqueamento. Nessa metodologia, uma alíquota 10 μL de uma solução de CUR em DMSO ($1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) previamente padronizada ($\epsilon = 58,547 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ²⁰⁰) através de análises UV-vis, foi adicionada à dispersão previamente preparada contendo os lipossomas já prontos e uniformizados e devidamente homogeneizada. Vale destacar que a porcentagem de DMSO na dispersão lipossomal final foi de $9,99 \times 10^{-2} \% \text{ (V:V)}$, não influenciando na estrutura dos lipossomas. Por fim, o conjunto de amostras obtidas, DPPC-F127, DPPC-F127-AgNPs, DPPC-F127-CUR e DPPC-F127-AgNPs-CUR, foi devidamente caracterizado como descrito a seguir.

4.3 MÉTODOS E INSTRUMENTAÇÃO

4.3.1 Espalhamento de luz dinâmico - DLS

O diâmetro hidrodinâmico (DH), o índice de polidispersividade (PDI) e o potencial de superfície Zeta (ζ) dos lipossomas formados foram obtidos através de medidas DLS em um Zetasizer Nano Series modelo SZ (Malvern Instruments, Reino Unido) disponível no Grupo de Estudo em Materiais Poliméricos (POLIMAT). As medidas foram realizadas a $25,0 \text{ }^\circ\text{C}$ operando a 173° e comprimento de onda de 632,8 nm, fornecido por um laser de He-Ne de estado sólido de 4 mV. Todas as medidas foram realizadas em triplicata.

4.3.2 Espectroscopia de Absorção Eletrônica

Os espectros de absorção eletrônica da CUR, bem como os espectros de absorção plasmônica das AgNPs nas dispersões lipossomais foram realizados em um espectrofotômetro Varian Cary® 50 Bio disponível no laboratório de catálise e fenômenos interfaciais, LACFI, no departamento de química da UFSC.

O coeficiente de absorvidade molar da curcumina em DMSO em 435 nm foi obtido da literatura $\varepsilon = 58.547 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ²⁰⁰ e utilizado através da lei de Lambert-Beer (Equação 9) para padronizar periodicamente a solução estoque de CUR em DMSO. Onde A é a intensidade de absorção em 435 nm, b é o caminho óptico da cubeta (1 cm), C é a concentração de curcumina (mol L^{-1}), e ε é o coeficiente de absorvidade molar ($\text{L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

$$A = b \times C \times \varepsilon \quad (9)$$

4.3.3 Espectroscopia de Fluorescência

As medidas de emissão de fluorescência foram realizadas em espectrofotômetro de fluorescência Varian Cary Eclipse, localizado no laboratório LACFI, no departamento de Química da UFSC.

Para as amostras DPPC-F127-CUR e DPPC-F127-AgNPs-CUR empregou-se o comprimento de onda de excitação em 420 nm com faixa de leitura de 440-700 nm e *slits* de 5 nm, assim como para CUR em acetronitrila (ACN).

4.3.4 Estudos de estabilidade

A estabilidade das formulações no estado líquido foi monitorada por espectroscopia de absorção eletrônica em um equipamento UV- Vis da marca Kasuabi B-500 com 1 nm de intervalo de leitura. Além disso, as amostras também foram monitoradas por e DLS, nesse caso, almejando a obtenção de seu diâmetro hidrodinâmico e PDI, conforme o tópico 4.3.1.

4.3.5 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

A morfologia e os diâmetros das nanopartículas foram avaliados através da microscopia eletrônica de transmissão (MET) utilizando um microscópio JEM 1011 operando a uma voltagem de aceleração de 80 kV disponível no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica da UFSC. O preparo do *grid* ocorreu 24 h antes da análise, para isso 100 μL da dispersão lipossomal foram diluídos em 1,0 mL de água ultrapura. Em seguida, 10 μL desta solução foi depositada em *grid* de cobre recoberto com filme de carbono/Formvar e o excesso removido com papel absorvente. O processo foi repetido três vezes.

As análises de tamanho foram realizadas utilizando o software livre ImageJ 1.8.0 para construção do gráfico de distribuição normal dos tamanhos.

4.3.6 Determinação da constante de ligação (K_b) da curcumina com os lipossomas

A constante de ligação K_b da CUR aos sistemas lipossomais de DPPC-F127 e DPPC-F127-AgNPs foi determinada a partir de uma solução inicial de CUR em água na concentração de $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. Essa concentração foi empregada com o intuito de evitar o efeito de filtro interno nas análises por fluorescência. Em seguida, essa solução foi titulada com cada uma das dispersões lipossomais. Após cada alíquota adicionada aguardou-se um período de 5 minutos a fim de atingir a ligação do FS ao sistema. Após a estabilização de cada alíquota adicionada, os espectros de emissão de fluorescência foram registrados na faixa de 440 nm até 700 nm, empregando um $\lambda_{\text{exc}} = 420 \text{ nm}$ e *slits* de 5 nm. Os estudos foram realizados em três temperaturas: 20, 25 e 37 °C a fim de se avaliar os parâmetros termodinâmicos de ligação.

4.3.7 Estudos de supressão de fluorescência: ajustes de Stern-Volmer (K_{SV})

A supressão de fluorescência da CUR nos sistemas lipossomais, na concentração de $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, foi avaliada utilizando-se íon iodeto como agente supressor aquo-solúvel (iodeto de sódio). Nesse experimento, 2,0 mL da amostra foram adicionados em uma cubeta de fluorescência e sucessivas adições de uma solução de KI (1 mol L^{-1}), devidamente protegida da luz, foram realizadas até um volume final de 4,0 mL. Após cada adição, aguardou-se um intervalo de 5 minutos e registrou-se os espectros de emissão de fluorescência na faixa de 440 nm até 700 nm, empregando um $\lambda_{\text{exc}} = 420 \text{ nm}$ e *slits* de 5 nm. O fator de diluição foi corrigido para que pudesse ser avaliado apenas o efeito da supressão. A constante de Stern-Volmer (K_{SV}) foi calculada através da Equação 10, na qual F_0 e F são as intensidades de fluorescência na ausência e presença do supressor, respectivamente, e $[I^-]$ é a concentração de iodeto. Os estudos foram realizados em três temperaturas: 20, 25 e 37 °C com o objetivo de avaliar o mecanismo de supressão (estático ou dinâmico).

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{SV} [I^-] \quad (10)$$

4.3.8 Calorimetria diferencial de varredura - DSC

A calorimetria diferencial de varredura foi empregada para a determinação da temperatura de transição de fase (T_m) dos lipossomas híbridos polimérico-lipídicos e para a avaliação da influência da incorporação de CUR e AgNPs nestes. As curvas de calorimetria foram realizadas no equipamento de calorimetria diferencial de varredura DSC-50 Shimadzu, disponível na Central de Análises do

Departamento de Química da UFSC, utilizando atmosfera de nitrogênio, na faixa de temperatura de 10 a 100 °C a uma taxa de varredura de 2,5 °C min⁻¹ em atmosfera de argônio (50 mL min⁻¹).

Os resultados obtidos pelo equipamento são fornecidos em potência (mW) e são transformados em capacidade calorífica molar para a obtenção dos valores de temperatura de transição (T_m). Além disso, parâmetros termodinâmicos envolvidos nesta transição, como a variação de entalpia (ΔH), podem ser obtidos a partir do termograma, utilizando-se o Software gratuito TA Universal Analysis. A variação de entalpia da transição (ΔH) é calculada a partir da área sob o pico, a partir da integral do calor específico ΔC_p , conforme demonstrado na Equação 11, onde T_i e T são as temperaturas que definem os limites de integração.

$$\Delta H(T) = \int_{T_i}^T \Delta C_p(T) dT \quad (11)$$

4.3.9 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier- FTIR

A análise de FTIR foi utilizada para verificar as modificações nas formulações a partir da incorporação de F127, CUR e AgNPs aos lipossomas. As análises foram conduzidas em um espectrofotômetro marca Shimadzu modelo IRPrestige-21, do Grupo de Estudos em Materiais Poliméricos (Polimat/UFSC). Para tal, as amostras foram previamente liofilizadas, primeiramente sendo congeladas em nitrogênio líquido e realizou-se a liofilização em um equipamento da marca EDWARDS Modelo Micro Modulyo por um período de 48 horas. As amostras liofilizadas foram analisadas pelo modo de reflectância total atenuada ATR. A faixa selecionada foi de 4000 a 400 cm⁻¹ com 40 *scans* e resolução de 1 cm⁻¹.

4.3.10 Eficiência de encapsulamento

A eficiência de encapsulamento da CUR e das AgNPs aos lipossomas híbridos foi quantificada utilizando filtros de centrifugação Microcon-10KDa. Foram adicionados 500 uL das formulações com concentrações de [CUR]=100 μmol L⁻¹ e [AgNPs]= 1,5x10⁻⁴ mol L⁻¹ ao microtubo contendo o filtro e em seguida as amostras foram centrifugadas a 13.000 rpm por 45 minutos. A solução que permeou o filtro foi liofilizada e solubilizada em 1,0 mL de acetonitrila. O FS livre foi quantificado por emissão de fluorescência e as AgNPs não incorporadas por espectroscopia de absorção atômica em um espectrômetro de absorção atômica AAnalyst 100 (Perkin Elmer), equipado com forno de grafite HGA 800 e dispensador automático AS-72 - as quais ainda estão sendo quantificadas por um laboratório parceiro. Os experimentos foram realizados em triplicata. Ressalta-se que durante o processo, as amostras foram devidamente protegidas da luz ambiente.

4.3.11 Rendimento quântico de fluorescência

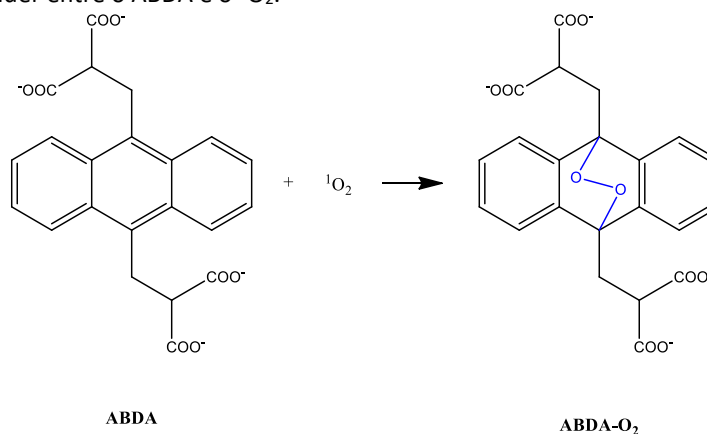
Os valores de rendimento quântico de fluorescência (ϕ_F) da CUR nas vesículas lipossomais foram obtidos por metodologia indireta utilizando-se como padrão a CUR em clorofórmio ($\phi_F=0,154^{201}$). Os valores foram calculados a partir da Equação 12, onde Abs_P é a absorbância do padrão e Abs_{FS} é a absorbância do FS no comprimento de onda de excitação, n é índice de refração do meio, F_P e F_{FS} são respectivamente a área do espectro de emissão de fluorescência do padrão e do FS e ϕ_P é o rendimento de fluorescência do padrão.

$$\phi_F = \frac{Abs_P F_{FS} n^2}{Abs_{FS} F_P n_{FS}^2} \phi_P \quad (12)$$

4.3.12 Cinética de degradação do ABDA: Rendimento Quântico de oxigênio singlete

O rendimento quântico de oxigênio singlete ($\phi_{\Delta^1O_2}$) foi determinado por meio de método indireto usando o ácido 9,10-antraceniídiil-bis(metileno)dimalônico (ABDA) como sonda. O ABDA é um derivado do antraceno que pode ser convertido em seu endoperóxido (Esquema 3) correspondente após reação com o 1O_2 , o que pode ser acompanhado pela redução na absorbância nos comprimentos de onda de 340, 355, 378 e 399 nm.

Esquema 3. Reação Diels-Alder entre o ABDA e o 1O_2 .



Os experimentos foram realizados em uma cubeta de quartzo (1,0 cm de caminho óptico) contendo uma solução aquosa de ABDA ($8,7 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) e a amostra ($[CUR] = 1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$). Para amostras contendo lipossomas, o ABDA foi deixado em contato sob agitação com a amostra no escuro por 30 minutos antes do início da iluminação. Em experimentos de irradiação, a evolução da fotodegradação do ABDA foi avaliada durante 1.400 minutos em espectrofotômetro Varian Cary-60 por varredura no modo cinético. A iluminação foi realizada com um sistema de iluminação equipado com LEDs de emissão no azul ($4,46 \text{ W m}^{-2}$ de irradiância e distância de 1,0 cm da superfície do líquido). Como o espectrofotômetro opera no modo de fase modulada, a incidência de luz externa não interfere

nas medições, Figura 11. A sobreposição da emissão de LED com os espectros de absorção da CUR nos diferentes meios avaliados é apresentada na Figura 12.

Figura 11. Montagem do aparato óptico.

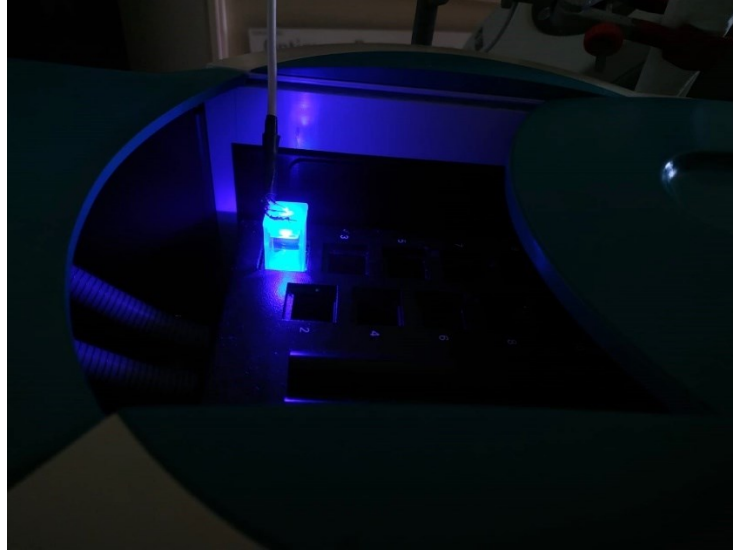
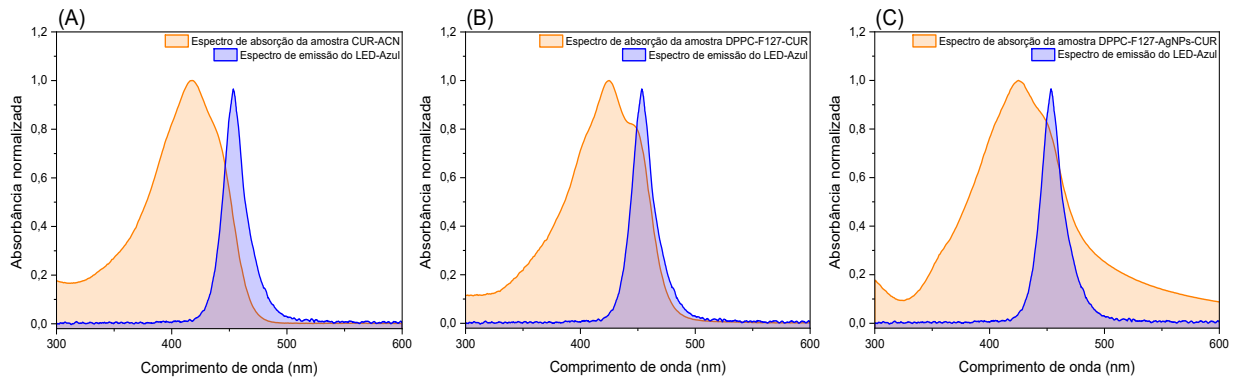
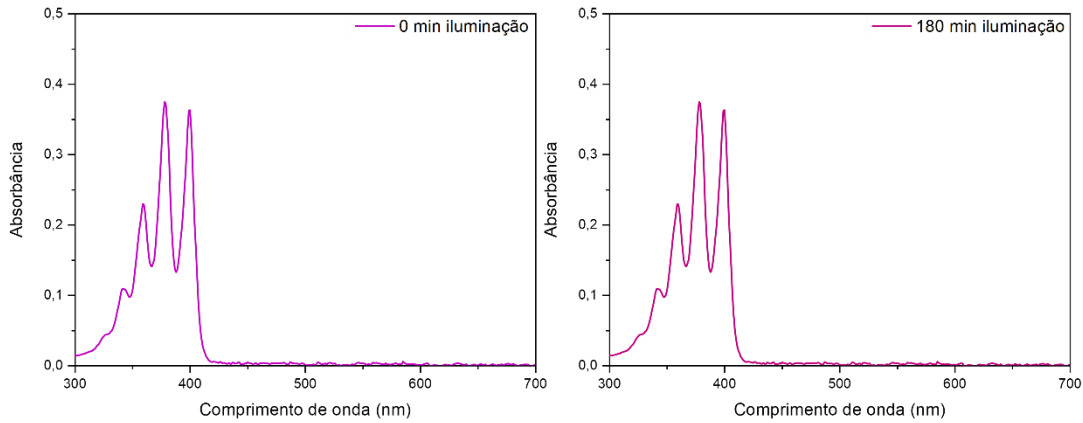


Figura 12. Sobreposição espectral da emissão do LED azul com a absorção molecular das amostras (A) ACN-CUR, (B) DPPC-F127-CUR e (C) DPPC-F127-AgNPs-CUR.



É importante destacar que a emissão da fonte de luz não afeta à absorção do ABDA, conforme representado pela Figura 13.

Figura 13. Espectro de absorção do ABDA antes e após a iluminação com LED azul.



A cinética de fotodegradação foi avaliada em diferentes comprimentos de onda ($\lambda = 340$ nm, 355 nm, 378 nm e 399 nm) e uma equação mono-exponencial de pseudo-primeira ordem foi ajustada aos dados experimentais obtendo-se a constante de velocidade desta reação (k_{ABDA}). A cinética de fotobranqueamento da CUR foi realizado no λ_{max} de absorção em cada meio, obtendo-se assim a constante de fotodegradação (k_{FB}).

A fim de calcular o $\phi_{\Delta}^1O_2$, uma série de equações foi utilizada conforme já descrito na literatura.^{202, 203} Primeiramente, é necessário encontrar o número de fótons absorvidos pela CUR durante o tempo de iluminação (t) por meio da Equação 13.

$$N_{ABS} = \frac{1}{hcN_a} \int_0^t \int_{\lambda_i}^{\lambda_f} P_e(\lambda) (1 - 10^{-Abs(\lambda)}) e^{-k_{PB} t} \lambda d\lambda dt \quad (13)$$

onde h é a constante de Planck, c é a velocidade da luz, N_a é o número de Avogadro, I é a irradiância da fonte de luz (em $mW\ cm^{-2}$), e λ_f e λ_i são os comprimentos de onda final e inicial, respectivamente. Com o valor de N_{ABS} é possível determinar a Eficiência Fotodinâmica Química (γ_{Δ}) pela Equação 14 e finalmente, o rendimento quântico de oxigênio singleto pela Equação 15.^{202, 203}

$$\gamma_{\Delta} = \frac{k_{ABDA}}{N_{ABS}} \quad (14)$$

$$\phi_{\Delta}^1O_2 = \frac{\phi_{\Delta}^{Standard}}{\gamma_{\Delta}^{Standard}} \gamma_{\Delta}^{sample} \quad (15)$$

A CUR em ACN foi utilizada como sistema padrão, apresentando $\phi_{\Delta}^1O_2$ igual a 0,11.²⁰⁴

4.3.13 Análise da viabilidade celular das formulações contra células cancerígenas do tipo melanoma B16-F10

O ensaio de sulforrodamina B (SRB) foi utilizado para determinação da densidade celular, a partir da medição do conteúdo de proteína celular.²⁰⁵ Inicialmente, células de câncer de melanoma B16-F10 foram plaqueadas em placas de 96 poços (5.000 células/poço) por 24 h. Em seguida as células foram pré-incubadas com formulações em diferentes por 15 min. A fim de avaliar a ação das formulações nessa linhagem de células cancerígenas todas as formulações foram testadas nas concentrações 50,0; 25,0; 10,0 e 5,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em relação à CUR enquanto a concentração de AgNPs iniciou em $1,0 \times 10^{-4}$, variando a $5,0 \times 10^{-5}$, $2,5 \times 10^{-5}$, $1,0 \times 10^{-5}$ e $5,0 \times 10^{-6}$ mol L^{-1} , sendo todos os sistemas testados com e sem iluminação. Para as células expostas à luz, a iluminação ocorreu com uma fonte branco quente por 30 minutos (PWM80, 35 mW cm^{-2}) em cabine de segurança biológica a temperatura ambiente (25 °C), utilizando equipamento fornecido pelo Prof. Dr. Luís Carlos Malacarne (Centro de investigação da Interação Luz-Matéria, Departamento de Física da Universidade Estadual de Maringá), especificamente, para iluminação de placas de cultivo celular. As placas de controle foram tratadas nas mesmas condições no escuro. O espectro de irradiância da fonte de iluminação utilizada está disposto no Anexo A, assim como a sobreposição entre as amostras estão dispostas no Anexo B.

As células foram incubadas por mais 24 horas em uma incubadora umidificada a 37 °C e depois foram fixadas utilizando-se 100 μL de ácido tricloroacético a 10% gelado por 1 hora a 4 °C. As placas foram então lavadas cinco vezes com água fria e deixadas secar durante a noite. Uma solução de SRB (0,057% de SRB em 1% de ácido acético) foi adicionada a cada poço e incubada durante 30 min à temperatura ambiente. As células foram então lavadas 4 vezes com ácido acético a 1% e secas ao ar. Em seguida, foram adicionados 100 μL de base Tris 10 mM (pH 10,5) para solubilizar o corante. As placas foram agitadas suavemente durante 20 min e a absorbância foi lida a 510 nm num leitor de microplacas. A densidade celular foi calculada como a absorbância percentual (% de células) em comparação com a absorbância dos controles não tratados.

A densidade celular também foi analisada através de microscopia objetiva. As células coradas com SRB, conforme descrito anteriormente, foram analisadas utilizando um Microscópio Invertido Olympus IX83 disponível no Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB) com taxa de aumento de 100 vezes.

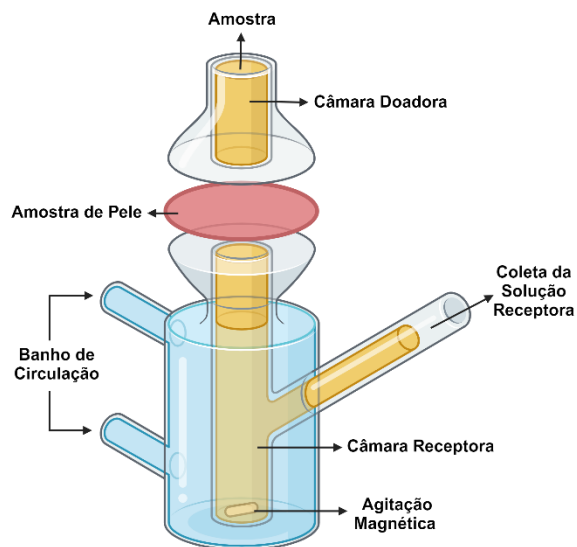
4.3.14 Permeação *ex vivo* de Curcumina e Nanopartículas de Prata

Os estudos de permeação *ex vivo* foram realizados no Laboratório de Farmacotécnica e Cosmetologia do Departamento de Farmácia da UFSC.

Pele abdominal humana (espessura total), obtida de um hospital de Florianópolis por doação espontânea e anônima de pacientes durante casos de cirurgia abdominal, foi empregada para os ensaios de permeação *ex vivo* da CUR e AgNPs a partir das diferentes formulações preparadas. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade (número CAE: 87349418.7.0000.0121).

As amostras de pele foram colocadas entre as duas câmaras de vidro da célula de difusão de Franz, conforme a Figura 14. O fluido receptor é composto por solução tampão PBS de pH igual a 7,4 contendo 30% V/V de etanol a fim de manter a condição *sink* durante o experimento. Para controle foram utilizados 2,0 mL de solução de CUR ($1,2 \text{ mg mL}^{-1}$) em propileno glicol (PG). As formulações e a solução controle (2,0 mL) foram depositadas acima do extrato córneo da pele em cada câmara doadora. Ao final de 7 horas de experimento foram retiradas amostras da câmara receptora e da pele, as quais foram tratadas adequadamente com acetonitrila. Por fim, as soluções foram quantificadas de acordo com a curva de calibração fluorimétrica disponível no Anexo G.

Figura 14. Representação esquemática da célula de difusão de Franz.



5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO DOS LIPOSSOMAS FORMADOS

5.1.1 Análises de DLS

Os valores de diâmetro hidrodinâmico (DH), índice de polidispersidade (PDI) e potencial zeta (ζ) dos lipossomas preparados são apresentados na Tabela 2, assim como a distribuição de diâmetros encontrados para os lipossomas preparados na Figura 15.

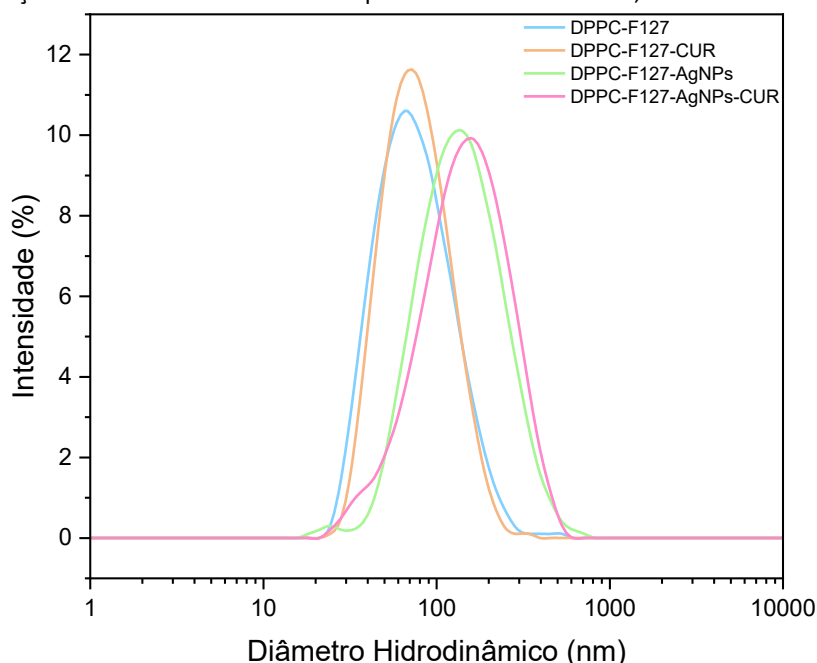
De um modo geral, as distribuições apresentadas na Figura 15 demonstram a presença de uma única população de nanopartículas em todos os casos. A análise das amostras por distribuição de intensidades possibilitaria a fácil visualização de partículas com tamanhos superiores, mesmo que em mínima quantidade. Isso deve ao maior espalhamento de luz atrelado a partículas com tamanhos superiores. A redução na intensidade da luz espalhada é de aproximadamente um fator de 10^6 . Isso implica que uma partícula de 100 nm teria uma intensidade de dispersão de luz um milhão de vezes menor em comparação com uma partícula de 1.000 nm.²⁰⁶ Vale destacar que os lipossomas foram obtidos apenas por sonicação em banho ultrassônico sem qualquer método de uniformização posterior. Além disso, as análises em DLS foram realizadas sem nenhum tipo de filtração.

O diâmetro hidrodinâmico médio encontrado para o lipossoma misto de DPPC-F127 está de acordo com o encontrado por De Freitas *et al.*⁸ A partir da incorporação de CUR ao sistema é possível verificar o aumento discreto do diâmetro hidrodinâmico, indicando a incorporação de CUR ao sistema.

Tabela 2. Diâmetro hidrodinâmico (DH), índice de polidispersidade (PDI) e potencial zeta dos lipossomas preparados.

Amostra	DH \pm DP (nm)	PDI \pm DP	Potencial Zeta $\zeta \pm$ DP (mV)
DPPC-F127	70,34 \pm 0,24	0,24 \pm 0,01	8,17 \pm 1,18
DPPC-F127-CUR	75,88 \pm 0,59	0,25 \pm 0,01	9,31 \pm 0,24
DPPC-F127-AgNPs	120,30 \pm 1,01	0,24 \pm 0,01	-2,32 \pm 0,14
DPPC-F127-AgNPs-CUR	125,90 \pm 1,83	0,25 \pm 0,01	-1,76 \pm 0,32

Figura 15. Distribuição dos diâmetros médios dos lipossomas formados a 25,0 °C.



Por outro lado, a amostra DPPC-F127-AgNPs apresenta um aumento substancial no DH (~ 50 nm). Esse elevado aumento traz consigo um forte indício da eficiente síntese *in situ*/incorporação das AgNPs na estrutura lipossomal. A amostra completa, contendo ambos, CUR e AgNPs, apresentou tamanho compatível com o esperado. Além disso, todas as amostras apresentaram PDI inferior a 0,30 sugerindo um sistema monodisperso.

O potencial zeta caracteriza a dupla camada elétrica sendo medido no plano de cisalhamento entre a camada interna de íons (camada de Stern) e a camada difusa. A medida é feita em comparação com um ponto no seio ou “*bulk*” da amostra, afastado da interface.²⁰⁷ A partir deste é possível obter informações sobre estabilidade, tempo de circulação, interações proteicas, permeabilidade e biocompatibilidade das nanopartículas. A medida do potencial zeta é influenciado pela temperatura, viscosidade do solvente, pH, força iônica do meio e características da superfície da nanopartícula. A literatura trata habitualmente que formulações com medidas de potencial zeta entre 30 e 60 mV indicam nanopartículas com excelente estabilidade. Nanopartículas com potencial zeta superiores a +30 mV ou inferiores a -30 mV indicam formulações estáveis, monodispersas e sem agregados, enquanto valores de potencial zeta em torno de ± 20 mV indicam formulações com estabilidade de curto prazo e por fim, valores menores de 5 mV indicam formulações que tendem a se agregar rapidamente, já que possuem pouca repulsão eletrostática entre si. No entanto, não é possível avaliar a estabilidade das nanopartículas formadas apenas pelo valor de potencial zeta, já que esta depende de outras características da formulação, como diâmetro hidrodinâmico e PDI.²⁰⁸

De acordo com a literatura lipossomas tradicionais formados por DPPC apresentam potencial zeta em torno de $-11,00 \pm 0,40$ mV.¹⁶⁹ Os valores encontrados para o lipossoma misto de DPPC-F127

estão de acordo com a literatura, apresentando potencial zeta positivo, o qual pode ser explicado pela presença dos grupos EO do copolímero na superfície lipossomal.¹⁶⁹ A incorporação de CUR ao sistema levou a um pequeno aumento no potencial zeta. Campani *et al.*²⁰⁹, em lipossomas formados por DPPC, observou valores de zeta mais negativos conforme o aumento de concentração de CUR no sistema indicando com o aumento da concentração as moléculas passam a se acomodar parcialmente na superfície do lipossoma, contribuindo para a carga superficial do sistema. Portanto, a pequena variação da carga superficial avaliada pode ser considerado um indicativo que a maior parte das moléculas de CUR presentes na concentração utilizada se encontram devidamente incorporadas na bicamada lipídica. Assim, os resultados indicam a eficiente incorporação passiva da CUR dada a sua favorável interação pela bicamada lipídica. Além disso, estudos experimentais²¹⁰ e computacionais²¹¹ já demonstraram a forte interação da CUR pelos Pluronic, principalmente envolvendo a região mais hidrofóbica PPO, intercalada à bicamada lipídica. A síntese *in situ*/incorporação de AgNPs ao sistema lipossomal mostra variações maiores quanto ao potencial zeta. Yusuf *et al.*²¹² obteve valores de potencial zeta de -30,8 mV em lipossomas formados por DPPC e colesterol. Como dito anteriormente, a maior alteração no potencial zeta pode ser um indício que as AgNPs se encontram na camada mais externa no lipossoma, onde se encontra o copolímero F127. Vale destacar que os Pluronic® são capazes de agir como agentes redutores e estabilizante das nanopartículas metálicas.²¹³

Por fim, a amostra “completa”, DPPC-F127-AgNPs-CUR apresentou potencial zeta compatível com o anterior. Dessa forma, os resultados obtidos indicam a incorporação da CUR na bicamada lipídica híbrida e a presença de AgNPs, possivelmente alocadas mais externamente na estrutura lipossomal, como será melhor discutido adiante. Como já demonstrando na literatura, a presença das cadeias hidrofílicas PEO corroboram com a estabilidade, tornando-a superior aos lipossomas convencionais, viabilizando a sua utilização.

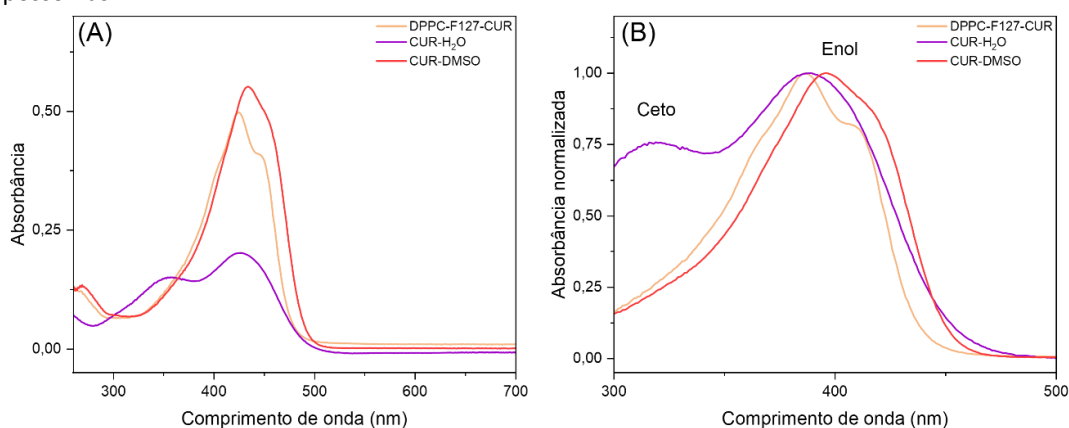
5.1.2 Caracterização Espectroscópica- UV-Vis

A caracterização espectroscópica da CUR e das AgNPs é essencial na avaliação da incorporação ao sistema lipossomal. Ademais, a análise permite avaliar a presença das espécies na forma monomérica, garantindo a atividade fotodinâmica. Para isso, as medidas de absorção eletrônica da CUR incorporada aos lipossomas de DPPC-F127 se encontram na Figura 16A. Adicionalmente, para fins de comparação, também foram registrados os espectros de absorção da CUR em água ultrapura e em DMSO. A CUR apresenta uma intensa absorção de luz na região do azul do espectro eletromagnético na faixa entre 350 e 500 nm, com um máximo de absorção em torno de 420-440 nm em diferentes solventes polares.⁸⁸ Em DMSO este máximo apresenta um deslocamento batocrômico (*red shift*), possuindo um ombro em torno de 450 nm. A banda em 420 nm é característica da forma

enol da CUR. Em DMSO espera-se que a CUR se encontre em sua forma enólica, por conta da transferência intramolecular de um átomo de hidrogênio para um dos oxigênios da dicetona.⁸⁹ Em meio aquoso, a CUR possui um pico em 430 nm e um ombro em 360 nm, sendo este característico da forma ceto da molécula.²¹⁴ Os solventes polares próticos, como a água, podem interagir com o hidrogênio do enol, rompendo a ligação de hidrogênio intramolecular e resultando na conversão da forma enólica para ceto. Além disso, a baixa solubilidade da CUR em água pode levar à autoagregração, diminuindo sua intensidade de absorção, fato indesejado na TFD.²¹⁴ As formas ceto e enol da CUR nos diferentes solventes avaliados pode ser mais bem visualizada nos espectros de absorção eletrônica normalizados (Figura 16B).

Comparando com a CUR encapsulada em lipossomas, DPPC-F127-CUR, observa-se um máximo de absorção em 425 nm e um ombro em 450 nm, Figura 16A. A banda de absorção com máximo em 360 nm observada em água desaparece (Figura 16B), revelando que a interação entre o fosfolípido-CUR e copolímero-CUR diminui as interações entre água-CUR, favorecendo a forma enólica da molécula.²¹⁵ O aumento na absorbância da CUR incorporada ao lipossoma quando comparada à CUR em água provavelmente ocorre devido ao maior distanciamento entre as moléculas do FS e moléculas de água, já que a água atua como um agente supressor colisional do estado excitado.²¹⁶ Ainda, comparando o espectro da amostra DPPC-F127-CUR com o de CUR-DMSO é possível perceber sua semelhança, indicando a presença de espécie majoritariamente na forma enólica, sendo esta a mais estável e indicada para a TFD (absorção mais intensa e deslocada para maiores comprimentos de onda). Esta semelhança também pode indicar a incorporação do FS ao sistema em sua forma monomérica, a qual é de extrema importância para a aplicação em TFD. A partir dos dados espectrais também foi possível estimar a absorvidade molar aparente (ϵ_{app}) da CUR incorporada, sendo igual a 49.370,00 L mol⁻¹ cm⁻¹ em 425 nm. Por fim, a maior resolução vibracional do espectro em ambiente lipossomal é um outro indicativo da incorporação eficiente da CUR. Assim, a interação do cromóforo com o solvente, especialmente os polares, tende a suprimir a sua resolução vibracional.²¹⁷

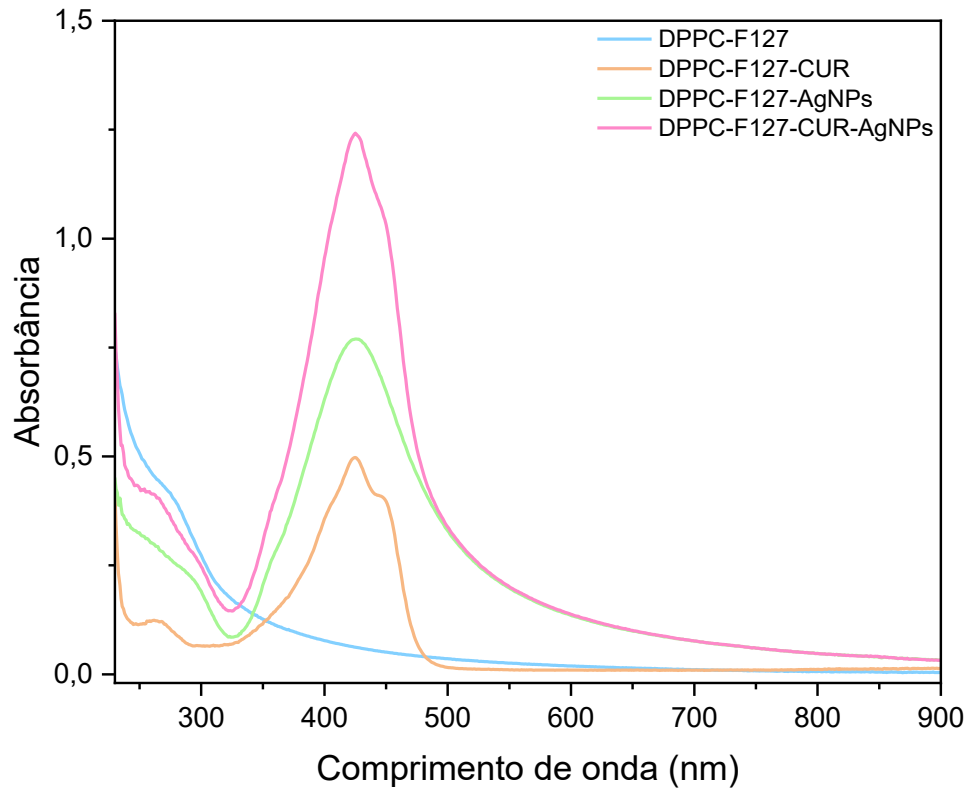
Figura 16. Espectros de absorção eletrônica da curcumina (1×10^{-6} mol L⁻¹) em meio aquoso, DMSO e incorporada aos lipossomas.



Os espectros das demais dispersões lipossomais podem ser visualizados na Figura 17. A síntese *in situ*/incorporação de AgNPs aos lipossomas mostrou no espectro UV-Vis uma banda de absorção plasmônica com comprimento de onda máximo em 425 nm. Como citado anteriormente, após a iluminação, observou-se o surgimento de uma coloração amarelada na dispersão lipossomal. Essa coloração é atribuída à ressonância plasmônica de superfície das AgNPs.¹³⁹ Em nanopartículas metálicas a banda de condução e a banda de valência se tornam muito próximas, permitindo que os elétrons transitem livremente entre elas. O campo elétrico de uma onda que chega induz a polarização dos elétrons em relação ao núcleo iônico das AgNPs, causando uma oscilação dipolar em fase com os elétrons (Figura 4). Quando a frequência do campo eletromagnético incidente se torna ressonante com o movimento coerente dos elétrons ocorre uma forte absorção, dando origem à cor observada.²¹⁸ O comprimento da banda de absorção plasmônica pode ser utilizado para estimar o tamanho de uma partícula, por exemplo partículas esféricas e menores de 20 nm possuem uma única banda plasmônica de superfície perto de 400 nm.²¹⁸ Portanto, pode-se observar que a incorporação de AgNPs nos lipossomas leva a um pequeno deslocamento para comprimentos de ondas maiores. Moors *et al.*²¹⁹ observou comportamento semelhante para AgNPs encapsuladas em lipossomas formados por DPPC e colesterol, atribuindo este deslocamento à diminuição no número de elétrons livres disponíveis para ressonância e a alteração no tamanho das partículas esféricas de AgNPs devido à encapsulação. É importante ressaltar que a utilização do copolímero F127 na síntese e estabilização das AgNPs não mostra deslocamentos significativos na banda plasmônica.^{220, 221}

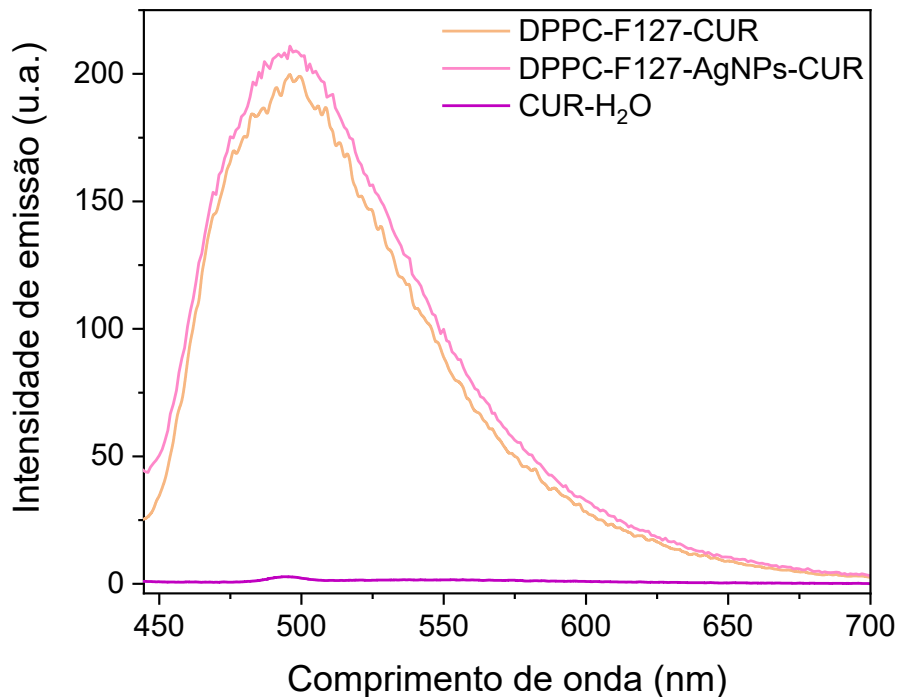
Por fim, para a formulação DPPC-F127-CUR-AgNPs verifica-se a sobreposição das bandas de CUR e AgNPs com aumento no valor da intensidade de absorvância, podendo-se visualizar ainda a permanência da banda característica de CUR na forma enólica conforme descrito anteriormente. Em resumo, a caracterização espectroscópica das amostras contendo CUR e AgNPs mostra a eficiente sobreposição espectral das bandas de absorção ($\lambda_{\text{max}} = 425 \text{ nm}$), assim como almejado para o aprimoramento das propriedades fotofísicas.

Figura 17. Espectros de absorção das dispersões lipossomais. [CUR]= 1×10^{-6} mol L⁻¹ AgNPs 1×10^{-4} mol L⁻¹



Avaliou-se também os espectros de emissão de fluorescência da CUR em meio às dispersões lipossomais, conforme representado na Figura 18. A amostra DPPC-F127-AgNPs não apresentou emissão de fluorescência, fato atrelado à sua tendência em sofrer desativação não radiativa.

Figura 18. Espectros de emissão de fluorescência da curcumina em água e incorporada nas dispersões lipossomais. [CUR]= 1×10^{-6} mol L⁻¹ AgNPs 1×10^{-4} mol L⁻¹.



Para fins de comparação, o espectro de emissão da CUR em água também foi incluído. Nota-se em meio aquoso a quase total supressão de fluorescência do FS. Segundo a literatura, a ínfima emissão de fluorescência da CUR em meio aquoso pode estar relacionada a três processos competitivos: (i) diminuição da absorvidade molar; (ii) moléculas de água atuando como agente supressor da CUR no estado eletrônico excitado; e (iii) a formação de espécies autoagregadas não fluorescentes da mesma.^{217, 222}

Por outro lado, quando na presença das dispersões lipossomais, uma intensa emissão de fluorescência foi observada, semelhante àquela obtida em diferentes solventes orgânicos capazes de a solubilizar eficientemente.²²³ Dessa maneira, evidencia-se a incorporação da CUR na forma monomérica aos sistemas lipossomais. Ademais, nota-se que a emissão de fluorescência foi similar para as amostras lipossomais na ausência e na presença de AgNPs. Esse resultado indica que a presença das nanopartículas metálicas não prejudica a incorporação da CUR ao sistema.

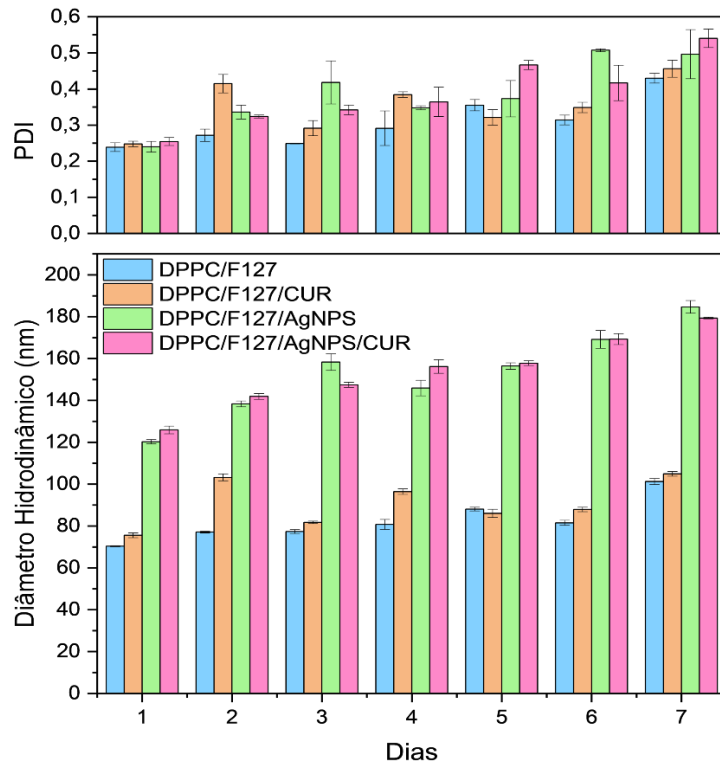
5.1.3 Estabilidade

A aplicação de sistemas lipossomais enfrenta problemas devido à baixa estabilidade dos lipossomas convencionais. Pesquisas indicam que a estabilidade de lipossomas convencionais é inferior a um dia.²²⁴ Os lipossomas convencionais apresentam instabilidade termodinâmica, uma vez que a formação de vesículas unilamelares sempre requer uma fonte adicional de energia, como ultrassonicação, extrusão, entre outros.²²⁵ Com o decorrer do tempo, esses lipossomas tendem a se agregar, fundir e, eventualmente, precipitar. Em um modelo simplificado, cada vesícula na dispersão está associada a um excesso de energia devido à sua curvatura, sendo esse excesso de energia proporcional ao número de lipossomas presentes. Assim, a cada fusão das vesículas, essa energia é reduzida pela metade. Vale ressaltar que esta abordagem desconsidera a contribuição da entropia, a qual favoreceria um número maior de vesículas no meio. Apesar disso, é comum que a energia de curvatura esteja na ordem de ~ 50 kT por vesícula, enquanto as contribuições de entropia são geralmente da ordem de alguns poucos kT.²²⁶

No entanto, lipossomas híbridos poliméricos-lipídicos formados por DPPC-F127 apresentam estabilidade de mais de 60 dias em dispersão aquosa.⁸ Assim, a presença de um segundo componente na estrutura lipossomal leva a alterações na curvatura lipossomal, acarretando em um aumento significativo na estabilidade. Sendo assim, compreender a estabilidade das formulações lipossomais preparadas é crucial, uma vez que mesmo essas estruturas híbridas podem passar por processos como fusão, expansão de membrana ou até mesmo ruptura ao longo do tempo.²²⁷

A estabilidade do sistema foi acompanhada por DLS monitorando-se o diâmetro hidrodinâmico e o índice de polidispersividade, conforme representado na Figura 19.

Figura 19. Diâmetro médio e PDI dos sistemas lipossomais armazenados em solução a 5 °C.



A estabilidade das amostras em dispersão aquosa foi avaliada por sete dias. Como pode ser observado na Figura 19, após o sétimo dia suspendeu-se a análise, pois foram observados precipitados de prata nas amostras. Durante os sete dias de análise, nota-se a manutenção do diâmetro hidrodinâmico e um discreto aumento no PDI. Como supracitado, lipossomas híbridos de DPPC-F127 mantêm-se estáveis, mesmo na presença de fármaco FS pelo menos 60 dias.²²⁸ No entanto, no presente estudo verificou-se o efeito de agregação da AgNPs, possivelmente associado à fração de prata que não se incorporou na estrutura lipossomal. Sendo assim, nesse caso avaliou-se não somente a estrutura lipossomal, mas também a fração de AgNPs não incorporada (ver item 5.2 – TEM). A agregação de partículas em escala coloidal é usualmente explicada à luz da Teoria DLVO (Deryagin, Landau, Verwey e Overbeek), que procura explicar a estabilidade de dispersões coloidais.²²⁹ A teoria se baseia no fato do potencial de interação entre duas nanopartículas ser governado pelo equilíbrio entre as forças atrativas de van der Waals e as forças eletrostáticas repulsivas atuantes entre as duplas camadas elétricas. A existência de uma barreira de energia, resultante da força repulsiva, impede a agregação de duas partículas durante sua aproximação. Partículas que apresentam uma repulsão suficientemente elevada têm a capacidade de evitar a floculação, garantindo assim a estabilidade do sistema coloidal. Nesse contexto, em consonância com os dados de potencial zeta (Tabela 2) pode-se inferir sobre a estabilidade das nanopartículas. Assim, os valores de potencial apresentados referem-

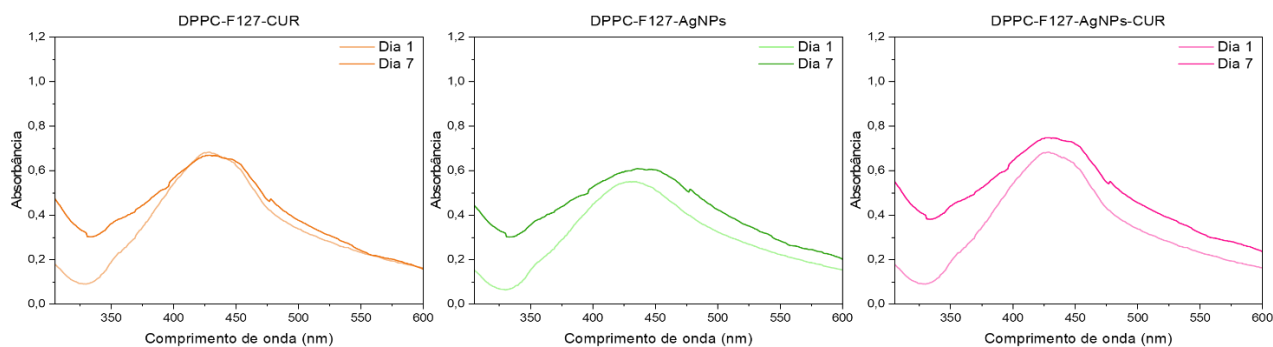
se não somente aos lipossomas, mas trazem efeitos das AgNPs não incorporadas, justificando os dados de estabilidade observados.

Apesar disso, a estabilidade, mesmo nas amostras contendo prata, demonstrou-se superior à reportada para os lipossomas convencionais de DPPC obtidos por dispersão sólida e uniformizados por extrusão em membrana de policarbonato.²²⁸ Além disso, amostras desse tipo são geralmente armazenadas no estado sólido, mediante a liofilização na presença de algum agente crioprotetor.

A liofilização é de fato uma alternativa promissora para a obtenção de formulações no estado sólido capazes de preservar as propriedades dos medicamentos por prolongados intervalos, especialmente para medicamentos contendo fármacos fotoativos. Nesse cenário, estudos anteriores envolvendo os lipossomas híbridos de DPPC-F127 mostraram a eficiente manutenção da formulação por pelos menos 12 meses após o congelamento em nitrogênio líquido na presença de trealose.^{230, 231} Os autores reportaram ainda que o próprio copolímero F127 corrobora na manutenção da estrutura lipossomal durante o rápido congelamento. No presente estudo, algumas tentativas foram realizadas no intuito de avaliar a liofilização das amostras obtidas. No entanto, devido a problemas técnicos operacionais, não obtivemos êxito.

Para além da estabilidade estrutural avaliada por DLS, a estabilidade dos possíveis fármacos também foi investigada, nesse caso por absorção eletrônica, Figura 20.

Figura 20. Espectros UV-Vis para estabilidade das amostras.

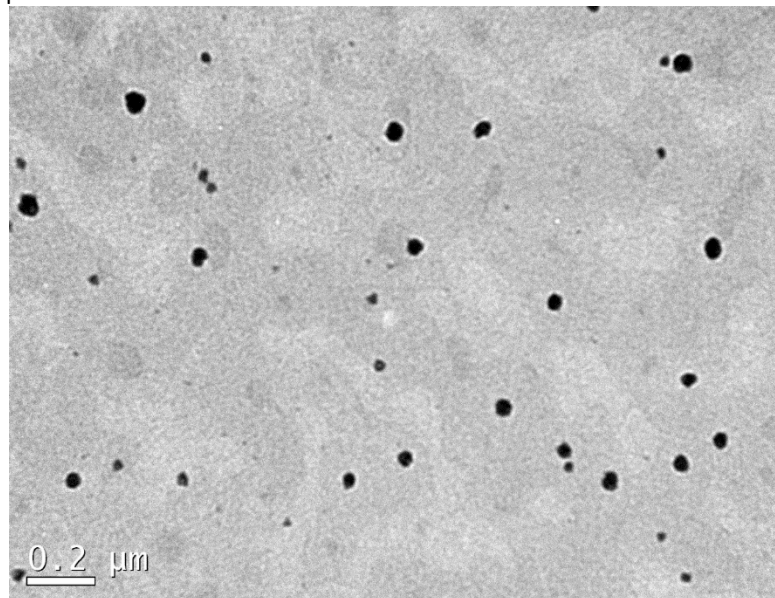


Em geral, os espectros de absorção UV-Vis se mostram pouco alterados durante o período de análise, indicando a estabilidade do encapsulamento e a estabilidade da CUR em seu estado monomérico. É possível verificar para as amostras DPPC-F127-AgNPs e DPPC-F127-AgNPs-CUR um aumento de absorbância na região de 600 nm, o qual pode ser atribuído ao aumento de AgNPs não encapsuladas e a precipitação de prata no sistema.¹⁴⁰ Nota-se também um aumento no espalhamento na região abaixo de 400 nm, mais uma vez, indicando a presença de partículas maiores no meio.

5.2 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)

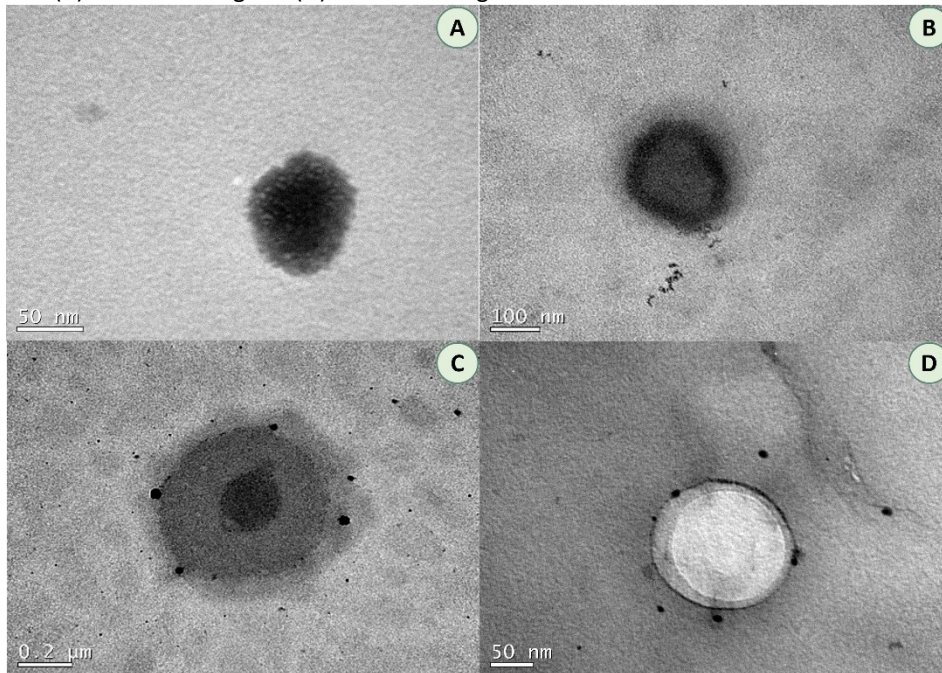
A avaliação da morfologia das vesículas lipossomais foi realizada a partir da microscopia eletrônica de transmissão (MET). De acordo com a Figura 21 a formulação DPPC-F127 mostrou vesículas esféricas de baixa polidispersidade, conforme os dados de espalhamento de luz. A formação de lipossomas híbridos de DPPC-F127 pode ser visualizada a partir de duas regiões distintas nas imagens: uma região interna densa e escura, que corresponde a bicamada lipídica. A presença de uma segunda região em volta da primeira, mais clara e brilhante, corresponde a presença do polímero F127 revestindo-a (blocos PEO), que de acordo com a metodologia empregada tem seu bloco PPO intercalado aos fosfolipídios na bicamada.¹⁶⁹

Figura 21. Microscopia eletrônica de transmissão de vesículas de DPPC-F127



A incorporação de CUR ao sistema, DPPC-F127-CUR (Figura 22B), pode ser visualizada a partir de um escurecimento na região da bicamada lipídica, indicando sua incorporação na região hidrofóbica do lipossoma.

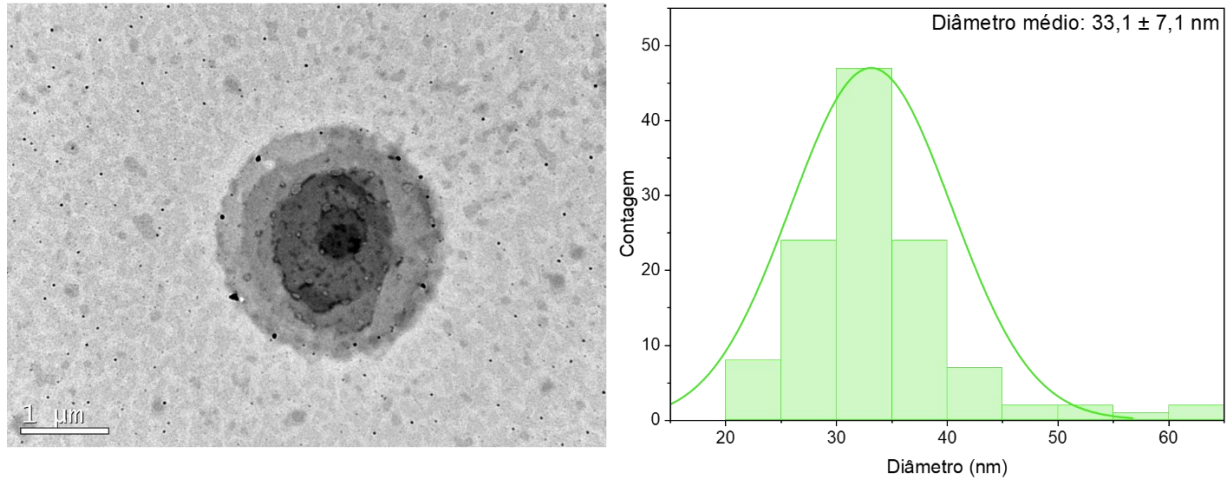
Figura 22. Microscopia eletrônica de transmissão para as diferentes formulações lipossomais (A) DPPC-F127 (B) DPPC-F127-CUR (C) DPPC-F127-AgNPs (D) DPPC-F127-AgNPs-CUR



A Figura 22C mostra informações importantes sobre a incorporação de AgNPs ao sistema. Como pode-se visualizar na imagem de microscopia, as AgNPs não estão totalmente incorporadas ao lipossoma. No entanto, na Figura 22D é possível visualizar a predominância de AgNPs em torno da região onde o copolímero F127 se localiza, indicando que as cadeias do copolímero atuam na estabilização das AgNPs formadas. Nesse cenário, algumas alternativas experimentais foram conduzidas com o intuito de obter um melhor desempenho na incorporação das AgNPs aos lipossomas. Para isso, optou-se por avaliar o efeito da adição prévia tanto do precursor da prata (AgNO_3) como o agente redutor ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$), durante a formação do filme fino. Contudo, a baixa solubilidade dos sais nos solventes utilizados (clorofórmio e metanol), levou a prejuízos na obtenção do filme fino e, portanto, dos lipossomas. Diante disso, optou-se por manter a adição passiva dos sais (aos lipossomas previamente formados). Foi nesse momento, inclusive, que as amostras obtidas foram consideradas viáveis para a aplicação direcionada ao melanoma, visto que, as AgNPs livres (não incorporadas aos lipossomas) não teriam impacto negativo como em uma aplicação endovenosa.

A análise de tamanhos das AgNPs foi realizada a partir da Figura 23, estando demonstrada na Figura 23B. O diâmetro médio encontrado para as AgNPs foi de $33,14 \pm 7,1$ nm, o qual está de acordo com a coloração obtida para sua síntese.²¹⁸

Figura 23. Imagens de microscopia de transmissão da amostra DPPC-F127-AgNPs; (B) Distribuição de tamanhos obtida por meio das imagens de microscopia.



A partir do diâmetro médio das AgNPs foi possível estimar a concentração dos AgNPs sintetizados pelo método descrito por Mariam *et al.*²³² Para tanto, assumiu-se que as AgNPs obtidas apresentavam forma esférica, assim o número de átomos de prata por nanopartícula (N) foi calculado considerando que a razão de volume do átomo de prata para AgNPs é 74,1% na estrutura cúbica. O raio do átomo de prata é 0,144 nm, e, portanto, seu volume igual a 0,0125 nm³. Dessa maneira, para a AgNPs com diâmetro de “d” nm (estimado por TEM), seu volume será dado por $(r/6) d^3$ nm³. Assim, o número de átomos de prata em cada AgNPs seria igual a $\frac{74.1}{100} \times \frac{\pi}{6} d^3 \times \frac{1}{0.0125}$, que de forma simplificada pode ser representado por $31d^3$.

A concentração molar (C) de prata foi determinada dividindo o número total de átomos de prata (N_{total}) equivalente à quantidade inicial de sal de prata adicionado, pelo número médio de átomos de prata por nanopartícula (N) de acordo com a Equação 16, onde V é o volume (L) e N_A é número de Avogadro. Supõe-se que a redução de Ag^+ foi completa.

$$C = \frac{N_{total}}{N V N_A} \quad (16)$$

Como resultado obteve-se que cada AgNPs seria formada por aproximadamente 1×10^6 átomos de prata e a concentração de AgNPs no meio igual a 1×10^{-10} mol L⁻¹.

5.3 DETERMINAÇÃO DA CONSTANTE DE LIGAÇÃO (KB) DA CURCUMINA COM OS LIPOSSOMAS

Os parâmetros de ligação relacionados à interação entre CUR e os lipossomas foram analisados através do experimento de constante de ligação (Kb) nas temperaturas de 20, 25 e 37 °C. As leituras foram analisadas através da titulação de uma solução de CUR em água [CUR]= $1,0 \times 10^{-6}$ mol

L⁻¹ com uma dispersão lipossomal de lipossomas híbridos DPPC-F127 e lipossomas híbridos contendo nanopartículas de prata DPPC-F127-AgNPs.

A CUR em água exibe baixa intensidade de fluorescência com pico máximo em torno de 550 nm, conforme apresentado e discutido na Figura 18. Já foi demonstrado que o coeficiente de partição (K_p) da curcumina varia de 2,3 a 3,2 e, à temperatura ambiente e pH neutro, ela é essencialmente insolúvel em água.²³³ A partir da titulação com dispersão lipossomal é possível visualizar um aumento gradativo na intensidade de emissão da CUR. Em geral, à medida que a concentração de DPPC-F127 aumenta, a sua interação com o FS induz um efeito de desagregação, justificando o aumento em sua intensidade de emissão. Além disso, nota-se que o aumento na emissão é acompanhado por um deslocamento de seu comprimento de onda máximo para regiões de menores comprimentos de onda, configurando um deslocamento hipsocrômico (*"blue shift"*), conforme pode-se visualizar na Figura 24A. Diante disso, pode-se afirmar que os estados eletrônicos da CUR, principalmente o estado excitado, foram desestabilizados no novo meio, já que a transição ocorre agora em uma faixa de maior energia. Este comportamento com o aumento da concentração de dispersão lipossomal sugere que a CUR na presença de lipossomas se desloca para um ambiente apolar, provavelmente se ligando a regiões hidrofóbicas do lipossoma.^{234, 235}

O mesmo comportamento é observado quando ocorre a adição de lipossomas contendo AgNPs, no entanto o aumento na intensidade de emissão é menor do que quando são adicionados apenas lipossomas de DPPC-F127. A interação de moléculas fluorescentes com nanopartículas metálicas pode levar a um aumento ou extinção da fluorescência, dependendo da distância que existe entre a molécula e a superfície metálica, Figura 25A.²³⁶ Estudos mostram que a interação de AgNPs com CUR leva a uma diminuição da fluorescência, que ocorre através de dois mecanismos.

Esta extinção pode ocorrer de maneira estática, através do mecanismo de extinção de fluorescência devido à formação de complexos. Em geral, durante a extinção da fluorescência, um fluoróforo pode formar um complexo estável com outra molécula extintora e, nesse caso, quando o estado fundamental é não fluorescente, o fluoróforo é extinto estaticamente.²³³ Este processo também pode ocorrer de maneira dinâmica, através da supressão colisional. Neste caso ocorre a desativação da fluorescência do estado excitado por colisão do fluoróforo com o agente supressor durante o tempo de vida do estado excitado. Após o contato entre ambos, o fluoróforo regressa ao estado fundamental sem qualquer alteração química das moléculas envolvidas.²³³ Malaeb *et al.*²³⁷ reportaram que a interação entre AgNPs e CUR ocorre a partir de uma combinação entre estes dois mecanismos.

Para melhor avaliar os dados, a intensidade de emissão da CUR em seu comprimento de onda máximo foi plotada em função da concentração de DPPC no meio (Figura 24B e Figura 25B).

Figura 24. A) Espectros de emissão de fluorescência para a titulação com dispersão lipossomal DPPC-F127 de [CUR]= $1,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ em água. B) Intensidade de emissão no comprimento de onda de $\lambda_{\max}=495$ nm nas temperaturas de 20, 25 e 37°C.

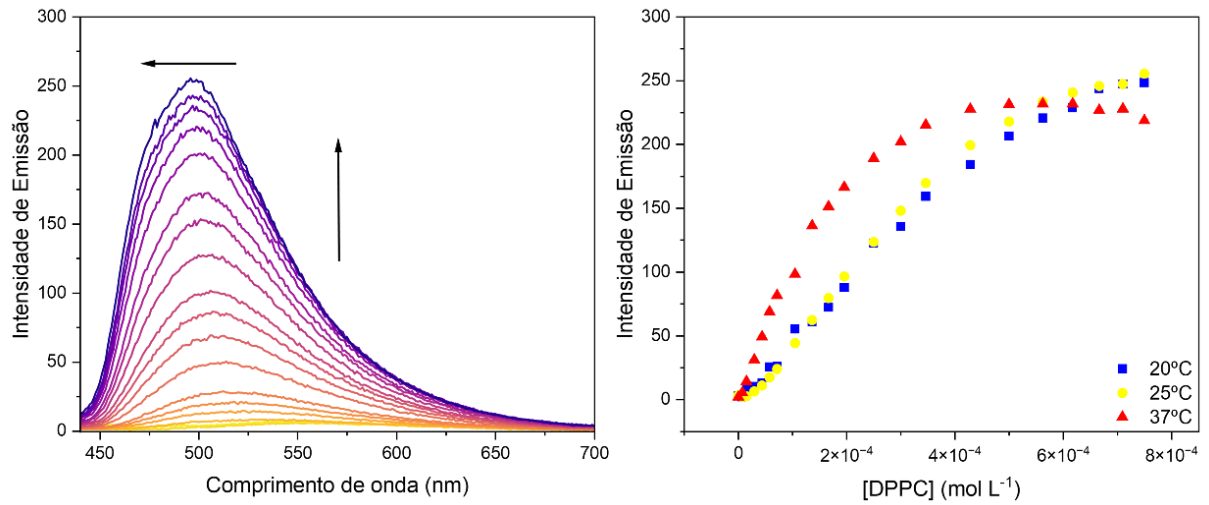
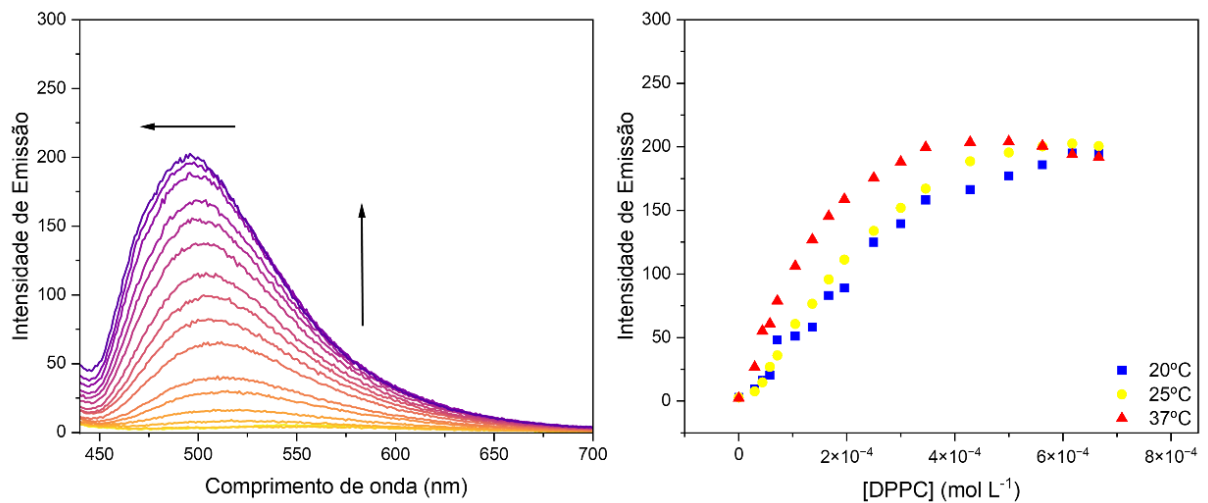


Figura 25. A) Espectros de emissão de fluorescência para a titulação com dispersão lipossomal DPPC-F127-AgNPs de [CUR]= $1,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ em água. B) Intensidade de emissão no comprimento de onda de $\lambda_{\max}=495$ nm nas temperaturas de 20, 25 e 37°C.



Nas Figura 24B e Figura 25B é possível visualizar que a saturação foi atingida mais rapidamente na temperatura de 37°C, enquanto nas temperaturas 20 e 25°C não aparenta ter sido completamente atingida. Esse comportamento indica que com o aumento da temperatura a incorporação da CUR à bicamada lipídica parece ser mais favorável. Vale destacar que ao aumentar a temperatura, as cadeias fosfolipídicas tornam-se mais fluidas até que a transição de fase, T_m , seja atingida. Para a obtenção da constante de ligação entre os lipossomas e a CUR os dados no comprimento de onda máximo de $\lambda_{\max}=495$ nm foram tratados através de duas equações a fim de comparação.

Inicialmente os dados foram ajustados em relação a Equação 17, equação tradicional para a determinação dos parâmetros de ligação em relação às mudanças de fluorescência.²³⁸

$$F = \frac{F_0 + F_{complex} K_b [L]}{1 + K_b [L]} \quad (17)$$

Na qual F_0 é a fluorescência da CUR sem a presença de lipossomas, F a fluorescência a partir da adição de lipossomas, $F_{complex}$ é o valor de saturação, K_b a constante de ligação e $[L]$ a concentração de lipossomas no meio.

Além disso, foram analisados os valores de constante de ligação através da equação modificada para a aplicação em lipossomas, Equação 18:

$$F = F_0 + \frac{F_f - F_0}{\left(\frac{1}{K_b ([S] - CL)^N} + 1 \right)} \quad (18)$$

Na qual F é a intensidade de fluorescência, F_f é a fluorescência do FS ligado às vesículas de DPPC, F_0 é a fluorescência do corante na ausência de vesículas DPPC, $[S]$ é a concentração de fosfolípido (DPPC), N é o número máximo de moléculas do FS por vesícula de DPPC, o qual foi mantido fixo em 1, e CL é a concentração de DPPC livre (não agregado). O valor de CL utilizado aqui foi $0,46 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$ para todos os ajustes, conforme descrito por Avanti® Polar Lipids, Inc.

Os valores obtidos para a Equação 17 e 18 encontram-se na Tabela 3. Para os lipossomas de DPPC-F127 os valores obtidos a partir da Equação 17 e 18 mostram-se iguais, no entanto para os lipossomas DPPC-F127-AgNPs os valores obtidos para cada equação são diferentes.

Os valores de R^2 mostram que os lipossomas de DPPC-F127 se ajustam melhor às equações aplicadas do que os lipossomas contendo AgNPs, podendo indicar algum tipo específico de interação entre CUR e AgNPs no sistema, influenciando em sua ligação/incorporação ao sistema. De modo geral os valores de K_b aumentam na presença de AgNPs, apontando para uma interação favorável entre as AgNPs e a CUR a qual influencia sua ligação com os lipossomas. De fato, estudos já mostraram a interação entre CUR e AgNPs, sendo a CUR utilizada tanto na síntese quanto estabilização de AgNPs.²³⁹ Assim, este resultado é particularmente interessante para a aplicação em TFD, pois a presença de AgNPs favorece a ligação do FS com a bicamada lipídica do lipossoma, possivelmente aumentando a quantidade de CUR incorporada ao sistema. No que se refere à presença do copolímero na obtenção de lipossomas híbridos, comparando com a literatura, Bhattarai *et al.*²³⁸ investigou a interação entre CUR e lipossomas convencionais formados por DPPC e colesterol, obtendo a 25 °C uma constante de ligação de $0,63 \times 10^{-4} \text{ L mol}^{-1}$. No presente estudo, os valores obtidos de K_b para lipossomas contendo F127 é significativamente superior do que em lipossomas convencionais, este valor é esperado pois a

interação da CUR com as vesículas é intensificada na presença do polímero, resultando em maiores valores de K_b .²⁴⁰

Tabela 3. Constantes de ligação da CUR (K_b) com os lipossomas híbridos de DPPC-F127 e lipossomas híbridos contendo nanopartículas de prata DPPC-F127-AgNPs e coeficientes de correlação (R^2) para as temperaturas de 20, 25 e 37°C.

Formulação	T (°C)	Equação 17			Equação 18		
		K_b (mol L ⁻¹)	N	R^2	K_b (mol L ⁻¹)	N	R^2
DPPC-F127	20	729,6 ± 122,0	-	0,993	729,6 ± 122,0	1	0,993
	25	796,5 ± 182,6	-	0,985	796,5 ± 182,6	1	0,985
	37	5782,5 ± 646,6	-	0,980	5703,1 ± 1377,8	1	0,980
DPPC-F127-AgNPs	20	1524,6 ± 297,2	-	0,981	1814,9 ± 296,2	1	0,983
	25	1914,8 ± 351,8	-	0,979	2354,3 ± 409,9	1	0,976
	37	6857,5 ± 954,5	-	0,970	7985,3 ± 1234,0	1	0,962

A fim de entender a interação entre CUR e os lipossomas, a constante de ligação avaliada em diferentes temperaturas permite a obtenção dos parâmetros termodinâmicos para entender a força responsável pela interação entre a CUR e os lipossomas. A energia livre de Gibbs foi estimada nas diferentes temperaturas a partir da Equação 19:

$$\Delta G^0 = -RT \ln K_b \quad (19)$$

A fim de determinar a variação na entalpia padrão (ΔH^0) e na entropia padrão (ΔS^0), aplicou-se a equação de van't Hoff²³⁸ a partir da Equação 20, estando dispostos no Anexo C:

$$\ln K_b = \frac{-\Delta H^0}{R} \frac{1}{T} + \frac{\Delta S^0}{R} \quad (20)$$

Os dados obtidos a partir das Equações 19 e 20 estão descritos na Tabela 4.

Tabela 4. Constantes de ligação (K_b) e parâmetros termodinâmicos associados para a interação da CUR com lipossomas de DPPC-F127 e DPPC-F127-AgNPs.

Formulação	T (°C)	Equação 17				Equação 18			
		K_b (L mol ⁻¹)	$-\Delta G^\circ$ (J mol ⁻¹)	$-\Delta H^\circ$ (J mol ⁻¹)	ΔS° (J mol ⁻¹)	K_b (L mol ⁻¹)	$-\Delta G^\circ$ (J mol ⁻¹)	$-\Delta H^\circ$ (J mol ⁻¹)	ΔS° (J mol ⁻¹)
DPPC-F127	20	729,6 ± 122,0	16.067,6			729,6 ± 122,0	16.067,6		
	25	796,5 ± 182,6	16.559,1	98.022,1	387,2	796,5 ± 182,6	16.559,1	97.365,2	384,9
	37	5782,5 ± 646,6	22.337,2			5703,1 ± 1377,8	22.301,6		
DPPC-F127-AgNPs	20	1524,6 ± 297,2	17.863,8			1814,9 ± 296,2	18.288,6		
	25	1914,8 ± 351,8	18.733,3	69.401,9	296,8	2354,3 ± 409,9	19.245,5	67.993,5	293,6
	37	6857,5 ± 954,5	22.776,9			7985,3 ± 1234,0	23.169,5		

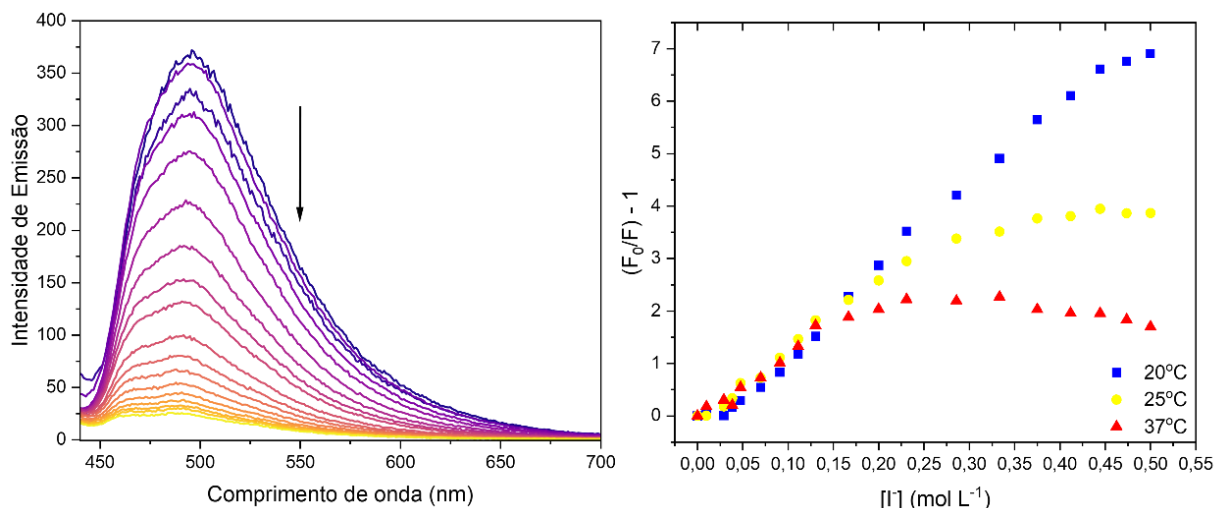
Em todas as temperaturas os valores para a variação da energia livre de Gibbs padrão ΔG° foram negativas, mostrando a espontaneidade do processo de ligação da CUR ao sistema lipossomal. Os valores para os sistemas DPPC-F127 e DPPC-F127-AgNPs foram parecidos, se mostrando um pouco mais negativo para o sistema contendo AgNPs, principalmente a 20 e 25°C em que as maiores diferenças em K_b foram observadas. Os valores obtidos para ΔH° mostram que o processo de interação entre CUR e os lipossomas acontece de maneira exotérmica. Os valores obtidos em módulo para ΔH° foram maiores que os obtidos para ΔG° , o qual concorda com a transferência da CUR do meio aquoso para a bicamada lipídica do lipossoma, indicando uma associação estável entre a CUR e o sistema lipossomal. Este valor negativo de ΔH° apoia a existência de ligações de hidrogênio entre a CUR e o lipossoma. Visualiza-se também que a presença de AgNPs no sistema torna o processo menos exotérmico. Além disso, os valores obtidos para ΔS° foram positivos, indicando novamente a espontaneidade da ligação CUR-lipossoma. Assim, os valores obtidos de $\Delta H < 0$, $\Delta S > 0$, e $|\Delta H| > |-T\Delta S|$ indicam que a interação entre CUR e lipossoma é espontânea e é dirigida tanto por mudanças entálpicas como entrópicas. Estudos sugerem que este tipo de comportamento é consistente com a formação de ligações de hidrogênio sendo a maior força para as interações formadas.^{238, 241}

5.4 ESTUDOS DE SUPRESSÃO DE FLUORESCÊNCIA: AJUSTES DE STERN-VOLMER (K_{sv})

A constante de Stern-Volmer (K_{sv}) permite estimar a localização do FS no sistema lipossomal, assim foram realizados experimentos de supressão de fluorescência utilizando o íon iodeto (I^-) como sonda, tornando possível analisar a proximidade do FS com o meio aquoso. O íon iodeto atua como um agente supressor aquo-solúvel e através da Equação de Stern-Volmer (Equação 10) é possível analisar o processo de supressão de fluorescência.

Inicialmente, analisou a supressão de lipossomas formados por DPPC-F127-CUR a partir de adições sucessivas de alíquotas de KI (1 mol L^{-1}) em três temperaturas distintas: 20, 25 e 37°C . Em todas as temperaturas analisadas pode-se observar uma supressão de fluorescência a partir da adição de KI, conforme demonstrado na Figura 26A. Os espectros de emissão obtidos foram ajustados à Equação de Stern-Volmer, conforme Figura 26B, assim como as equações no Anexo D.

Figura 26. A) Espectros de emissão de fluorescência da amostra DPPC-F127-CUR com adições de alíquotas de solução de KI ($1,0 \text{ mol L}^{-1}$) a 20°C ; B) Plots de Stern-Volmer para as temperaturas de 20, 25 e 37°C .

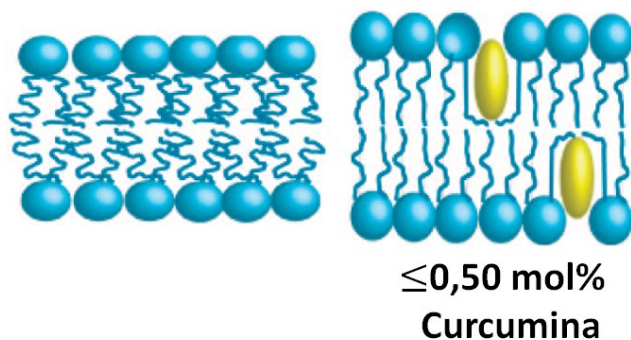


De acordo com a teoria de Stern-Volmer é esperado que o *plot* F_0/F apresente um comportamento linear dependente da concentração do supressor, no entanto isso não ocorre em diversos casos. Em algumas situações, a existência simultânea dos mecanismos de supressão estático e dinâmico levam a perfis não lineares.²⁴² Uma outra possibilidade é a existência de mais de uma população de fluoróforo, as quais apresentam acessibilidades diferentes ao supressor, o *plot* F_0/F apresentará um comportamento não linear. Este comportamento é comum para sistemas lipossomais, indicando que o FS se localiza em diferentes locais da bicamada lipídica.^{243, 244}

Os resultados obtidos para a constante de supressão K_{SV} estão apresentados na Tabela 5. Os valores de K_{SV} indicam que a CUR está mais sensível à supressão causada pelo íon iodeto a 20°C . Nessa temperatura, apenas um valor de K_{SV} foi determinado, indicando que as moléculas de CUR alocam-se majoritariamente na mesma região da estrutura lipossomal. Além disso, dada a possibilidade de supressão, é possível inferir que a parte cromofórica da molécula do FS está situada em uma região externa da bicamada lipídica, possivelmente nas proximidades da cabeça polar do fosfolípido. De fato, estudos anteriores demonstraram a interação da CUR por vesículas de DMPC (1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfolina - 14:0 PC), cuja cabeça polar é a mesma do DPPC (16:0 PC), diferindo apenas pelo tamanho da cadeia carbônica.²⁴⁵ No estudo realizado por intermédio do RMN de estado sólido, comprovou-se que a curcumina tem um forte efeito na estrutura da membrana em baixas concentrações ($\leq 0,5 \text{ mol}\%$), tal como no presente estudo. A CUR se insere na membrana em uma

orientação transbicamada, ancorada por ligação de hidrogênio ao grupo fosfato dos lipídios de maneira análoga ao colesterol. Como o colesterol, a CUR induz ordenação segmentar na membrana, Figura 27. Em concentrações mais elevadas (≥ 1 mol%), a CUR oligomeriza na membrana, reduzindo a sua espessura e capacidade molecular.

Figura 27. Representação da bicamada lipídica na ausência e na presença da curcumina (em baixas concentrações molares).



Fonte: Adaptado a partir de Barry *et al.*²⁴⁵

Com o aumento da temperatura, observa-se que esta supressão diminui gradativamente. Tanto a 25 °C como a 37 °C foram obtidos dois valores de K_{SV} , conforme demonstrado na Tabela 5, em que o K_{SV1} se refere à fração das moléculas que permaneceram alocadas nas proximidades da cabeça polar. Por outro lado, K_{SV2} refere-se à parcela das moléculas que melhor se internalizaram na bicamada lipídica, estando menos expostas ao supressor. Principalmente a 37 °C, o fosfolípido DPPC se encontra mais próximo de sua temperatura de transição ($T_m=41$ °C), permitindo que as moléculas de CUR se internalizem melhor na bicamada lipídica. Assim, os resultados obtidos indicam o afastamento do grupo cromofórico em relação à cabeça polar, particionando-se para a região de maior hidrofobicidade. Ressalta-se que os dados de K_{SV} estão de acordo com os dados de constante de ligação previamente apresentados. Uma observação interessante refere-se aos valores de K_{SV2} , que a 25 °C ou a 37 °C são iguais dentro do erro, indicando que a população mais internamente alocada da CUR se encontra na mesma região da bicamada em ambas as condições de temperatura.

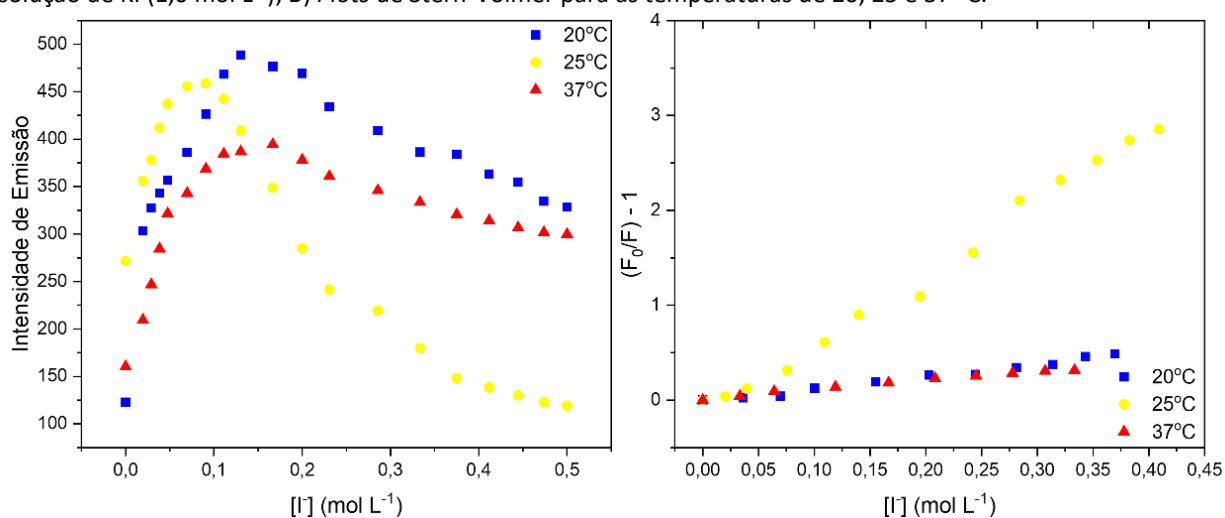
Tabela 5. Constante de Stern-Volmer para a amostra DPPC-F127-CUR após supressão de fluorescência com o íon iodeto.

Temperatura (°C)	K_{SV1}	K_{SV2}
20	$15,29 \pm 0,30$	-
25	$13,56 \pm 0,38$	$2,45 \pm 0,50$
37	$11,55 \pm 0,98$	$2,62 \pm 0,58$

Os valores de K_{SV} em diferentes temperaturas também permitem a análise dos mecanismos de interação entre o FS e o agente supressor. Os mecanismos de supressão dinâmica apresentam um aumento com a temperatura, devido a um aumento de colisões entre o fluoróforo e o agente supressor. Já a supressão estática diminui com o aumento da temperatura devido à redução da estabilidade dos complexos no estado fundamental entre o supressor e o fluoróforo. Como pode-se observar na Tabela 5 com o aumento da temperatura o valor de K_{SV1} se torna menor, indicando que a supressão de fluorescência ocorre através de um mecanismo estático.²⁴⁶

Para a titulação do sistema contendo AgNPs, DPPC-F127-AgNPs-CUR, observou-se um comportamento diferente para a titulação com KI 1 mol L^{-1} , conforme pode-se visualizar na Figura 28A. Inicialmente ocorre um aumento na fluorescência do sistema e, a partir de certa concentração do supressor, inicia-se de fato a supressão de fluorescência. As AgNPs são agentes supressores de fluorescência conhecidos²⁴⁷ e podem realizar interações com o íon iodeto I^- . Estudos mostraram que a interação entre AgNPs e I^- , formando nanopartículas de prata e iodeto, onde o iodeto forma uma camada na superfície das AgNPs.²⁴⁸ Além disso, a formação de AgI é termodinamicamente favorável, permitindo que os íons iodeto reajam com os átomos de prata e se dissociem da nano estrutura.²⁴⁹ Por fim, ainda existe a possibilidade que nem todos os íons Ag^+ tenham se reduzido a Ag^0 durante a síntese, novamente formando AgI, o qual é insolúvel no meio. Este comportamento vai de encontro aos dados de TEM previamente apresentados, mostrando as AgNPs não incorporadas aos lipossomas atuam inicialmente como supressores. Em tese, a interação inicial dos íons iodeto com as AgNPs ou mesmo com a Ag^+ livre, explicaria o aumento na intensidade de emissão inicial da CUR incorporada, seja pela interação $I^-/AgNPs$ ou pela formação de AgI. Por conta disso, os *plots* de Stern-Volmer foram considerados apenas a partir do início do decaimento de fluorescência, considerando a fluorescência máxima como F_0 , disposto na Figura 28B.

Figura 28. A) Fluorescência da amostra DPPC-F127-AgNPs-CUR em 475 nm para as adições de alíquotas de solução de KI ($1,0 \text{ mol L}^{-1}$); B) *Plots* de Stern-Volmer para as temperaturas de 20, 25 e 37 °C.



Os cálculos para K_{SV} foram realizados conforme Anexo E e estão dispostos na Tabela 6. Os valores obtidos para K_{SV} em todas as temperaturas foram menores que os obtidos para o sistema DPPC-F127-CUR, indicando que a presença de AgNPs no sistema impede a entrada do supressor na bicamada lipídica, estando de acordo com as imagens obtidas por TEM, onde as AgNPs se localizam em volta da bicamada lipídica devido a presença do copolímero F127. Baydoun *et al.*²⁵⁰ obteve um resultado contrário analisando a interação entre CUR e AgNPs em lipossomas de DMPC, onde a presença de AgNPs causou uma maior abertura na bicamada lipídica, indicando maior contato entre a CUR e água. No entanto, a 25 °C a constante de K_{SV} mostrou comportamento diferente daquele observado nas temperaturas 20 e 37 °C, não permitindo que se analise o mecanismo de supressão. Vale destacar que os experimentos foram repetidos e o mesmo perfil foi verificado.

Tabela 6. Constante de Stern-Volmer para a amostra DPPC-F127-AgNPs-CUR após supressão de fluorescência com o íon iodeto

Temperatura (°C)	K_{SV1}	K_{SV2}
20	1,34 ± 0,06	1,74 ± 0,14
25	6,52 ± 0,34	6,17 ± 0,21
37	1,09 ± 0,08	0,71 ± 0,05

Em situações nas quais não se pode determinar o mecanismo de supressão pela variação de temperatura, tem-se como alternativa a determinação do tempo de vida de fluorescência (τ_f) do fluoróforo. Assim, mecanismos de supressão estático não afetam o valor de τ_f . Por outro lado, um mecanismo de supressão dinâmico seria representado pela diminuição de τ_f .²⁴² Diante disso, foram realizados ensaios almejando a determinação de τ_f para a CUR utilizando-se o equipamento disponível no LACFI. Infelizmente, dado o curto tempo de vida de fluorescência da CUR (< 1 ns, conforme determinado por Priyadarsini²⁵¹), e longo tempo de decaimento da fonte de iluminação, não se obteve êxito na medida.

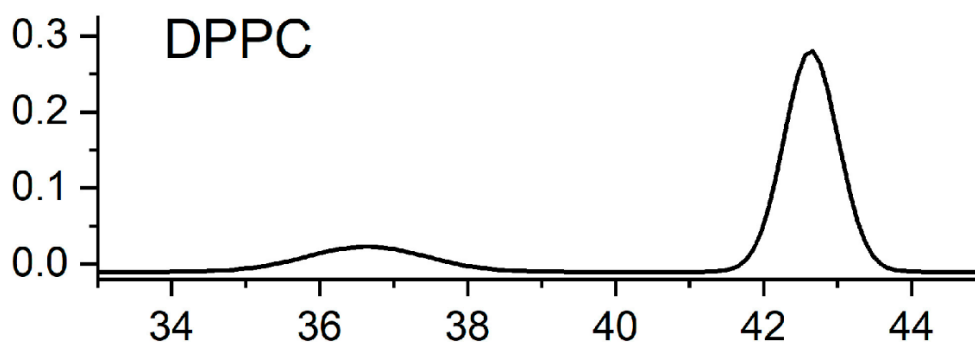
Em resumo, os resultados confirmam a presença da CUR internalizada nos lipossomas. Além disso, a presença das AgNPs parece favorecer a internalização da CUR nas vesículas lipossomais.

5.5 ANÁLISE DA TEMPERATURA DE TRANSIÇÃO DE FASE DOS SISTEMAS

A temperatura de transição de fase dos sistemas foi analisada a partir da calorimetria diferencial de varredura (DSC). As amostras utilizadas foram previamente liofilizadas, sem a utilização de crioprotetor. Como descrito na revisão da literatura, lipossomas podem apresentar-se em duas fases termodinâmicas distintas: estado gel, o qual corresponde à fase sólida e o estado cristal-líquido, que corresponde à fase fluida, sendo que a transição entre estas duas fases é descrita pela temperatura de transição de fase (T_m). A literatura traz que lipossomas constituídos por DPPC puro

apresentam uma pré-transição de fase (T_p) em torno de 36,5 °C, enquanto a transição principal ocorre em 42,3 °C, conforme demonstrado na Figura 29.²⁵²

Figura 29. Calorimetria diferencial de varredura - DSC para os lipossomas de DPPC convencional obtido a partir da referência²⁵²

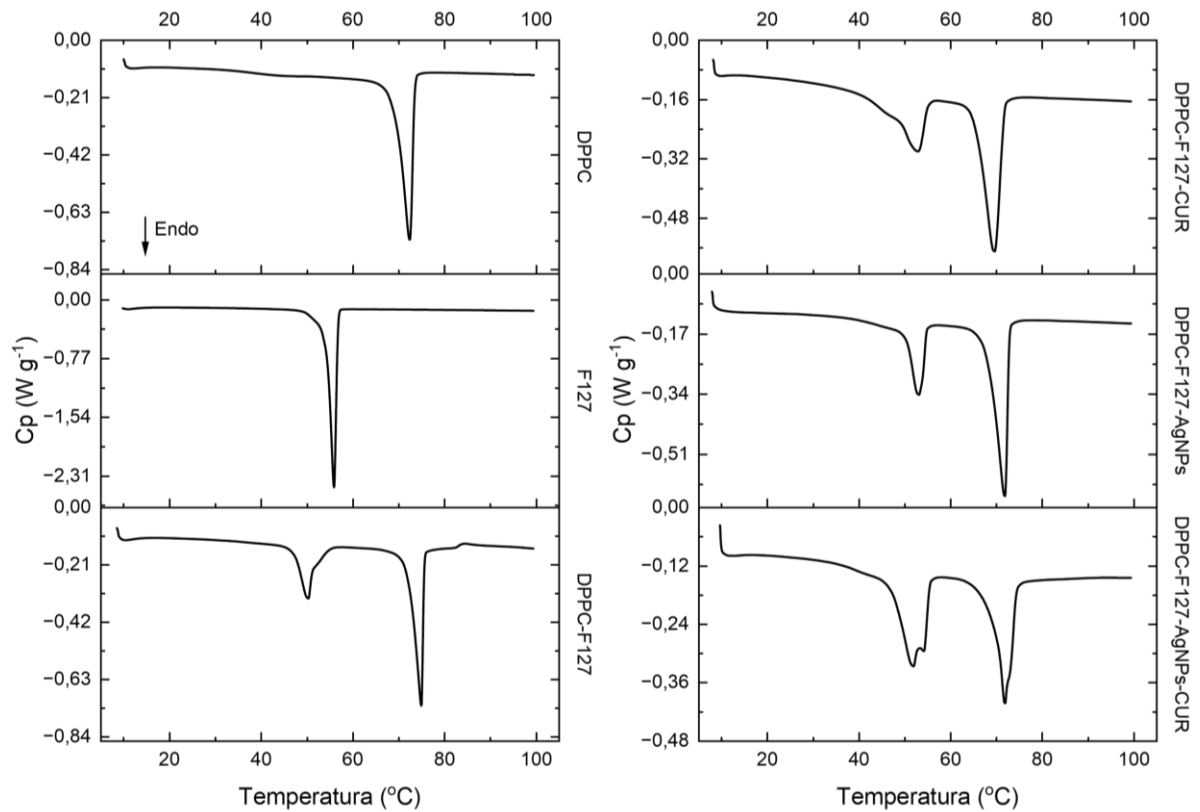


A Figura 30 compara os termogramas de DSC para as formulações preparadas e liofilizadas. Para os lipossomas de DPPC puro, é possível verificar a ocorrência de um evento endotérmico entre 64,0-75,0 °C. Essa T_m corresponde a uma porcentagem de 5% de água, sendo equivalente ao DPPC-dihidratado, o qual apresenta um único evento em torno de 72 °C. Os lipossomas de DPPC puros foram preparados a partir da metodologia de dispersão sólida, a mesma utilizada para a preparação de lipossomas híbridos, sendo estes congelados rapidamente em nitrogênio líquido e liofilizados. A presença deste evento e a ausência do evento associado à transição de fase indica a desestruturação da bicamada lipídica durante a liofilização. Para o termograma relativo ao copolímero F127 puro, Figura 30, ocorre a presença de um único evento entre 46,0-58,0 °C, compactuando com a temperatura de fusão (T_m) de 51 °C que a literatura nos fornece.²⁵³

Para os lipossomas híbridos de DPPC-F127 verifica-se a presença de dois eventos (Tabela 7), um que ocorre inicialmente entre 42,0-56,0 °C e um segundo evento em 68,0-76,0 °C. O pico entre 42,0-56,0 °C se mostra alargado, indicando a combinação da T_m de transição de fase do lipossoma com a T_m de fusão do polímero F127. Apesar da desestabilização e não homogeneidade do sistema é possível verificar a interação entre DPPC e F127 neste evento. Além disso, um outro aspecto que pode ser destacado é a manutenção da bicamada lipídica, evidenciado pela presença da T_m , mesmo após o congelamento e liofilização na ausência de agente crioprotetor. Isso se deve à presença do copolímero F127, que além de atuar como um estabilizador dos lipossomas em dispersão aquosa, também corrobora na manutenção da estrutura lipossomal quando exposta a condições extremas, capazes de desestabilizar os lipossomas convencionais. De acordo com Chen *et al.*²⁵⁴ para concentrações pequenas de F127 a incorporação na bicamada lipídica acontece como espaçadores, fazendo com que a energia de Van der Waals entre as cadeias hidrocarbônicas do lipídio diminua. Como resultado, a cadeia hidrocarbônica pode ser perturbada mais facilmente pela energia térmica e a fase cristal

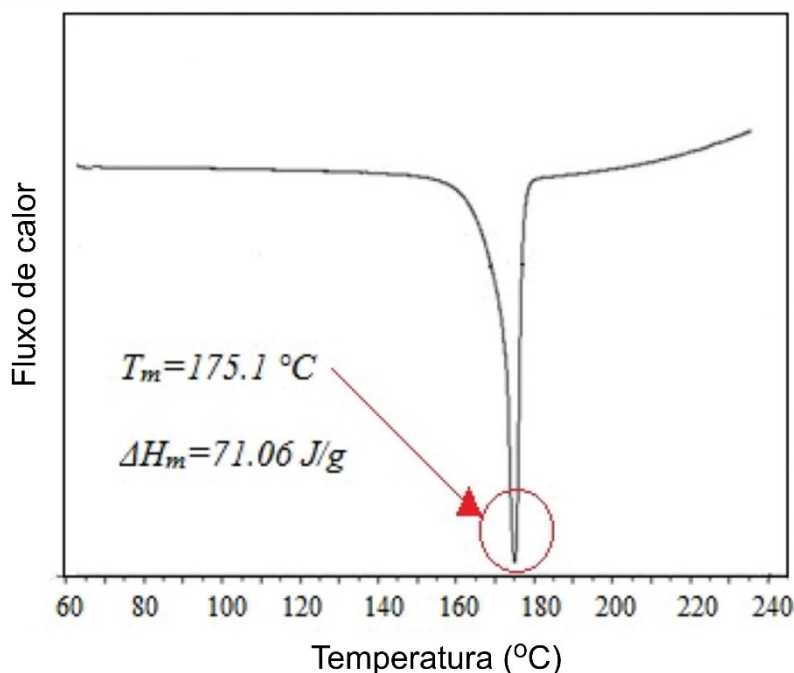
líquido pode ser atingida com menor temperatura e menor ΔH . Conforme disposto na Tabela 7 para os lipossomas de DPPC puro este evento possui $\Delta H= 69,3 \text{ J g}^{-1}$, enquanto para os lipossomas mistos de DPPC-F127 o ΔH encontrado foi de $31,7 \text{ J g}^{-1}$, indicando a interação favorável entre o fosfolípido e o copolímero na bicamada.

Figura 30. Calorimetria diferencial de varredura - DSC para as formulações preparadas neste trabalho.



Conforme a Figura 31 a T_m da CUR acontece em $175 \text{ }^\circ\text{C}$, acima da temperatura analisada. A incorporação de CUR nos lipossomas híbridos causa um alargamento dos eventos. O primeiro evento ocorre entre $32,0\text{-}55,0 \text{ }^\circ\text{C}$, tendo um $\Delta H= 46,5 \text{ J g}^{-1}$ e o segundo evento $61,0\text{-}74,0 \text{ }^\circ\text{C}$, com $\Delta H= 39,0 \text{ J g}^{-1}$. Novamente o ΔH encontrado para ambos os eventos foi menor, indicando a interação entre os compostos.

Figura 31. Termograma da CUR pura.



Fonte: Adaptado de Sayyar *et al.*²⁵⁵

Para a formulação contendo AgNPs, Figura 30, não houve mudança significativa quando comparada a formulação de DPPC-F127, apresentando um evento alargado entre 37,0-55,0 °C, com ΔH de 20,2 J g⁻¹ e um segundo evento entre 63,5-74,0 °C com ΔH de 35,9 J g⁻¹. Bothun apresentou valores semelhantes para lipossomas de DPPC-AgNPs, a temperatura de transição principal, T_m , não apresentou mudanças significativas. No entanto, a temperatura de pré-transição se deslocou para menores temperaturas com o aumento da concentração de AgNPs. Isto pode justificar o alargamento do primeiro evento, já que a temperatura de pré-transição não pode ser observada separadamente.²⁵⁶

Por fim para a formulação de lipossomas híbridos contendo AgNPs e CUR é possível verificar um desdobramento no primeiro evento que ocorre entre 45,0-56,0 °C, com máximos em 51,0 e 53,0 °C, indicando maior heterogeneidade do sistema já que agora tem-se as interações entre quatro componentes no sistema. Assim, a separação pode estar associada aos diferentes domínios encontrados na estrutura lipossomal. O segundo evento entre 60,5-76,0 °C também se comporta muito similarmente ao DPPC puro, possuindo ΔH de 69,5 J g⁻¹.

Tabela 7. Análises térmicas para as diferentes formulações liofilizadas.

Formulação	1º evento (°C)	ΔH (J g ⁻¹)	2º evento (°C)	ΔH (J g ⁻¹)
DPPC	61,0-75,0	69,3	-	-
F127	47,0-56,5	105,8	-	-
DPPC-F127	42,0-56,0	19,5	68,0-76,0	31,7
DPC-F127-CUR	32,0-55,0	46,5	61,0-74,0	39,0
DPPC-F127-AgNPs	37,0-55,0	20,2	63,5-74,0	35,9
DPPC-F127-AgNPs-CUR	45,0-56,0	23,8	60,5-76,0	69,5

Em suma, os resultados obtidos apontam para a manutenção da estrutura lipossomal híbrida mediante a liofilização. Além disso, indicam a interação existente entre os constituintes da formulação e o papel preponderante do copolímero F127 na estabilização da estrutura lipossomal não somente em dispersão aquosa, mas também no estado sólido liofilizado.

5.6 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER- FTIR

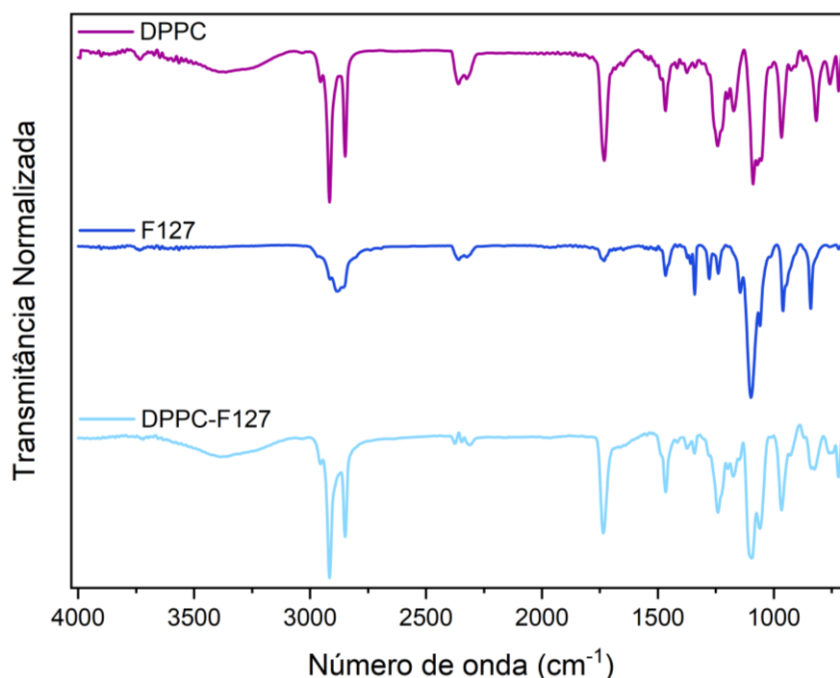
Os resultados reportados no item anterior apontam para a interação existente entre as espécies presentes na formulação. Nesse sentido, a espectroscopia FTIR foi utilizada para analisar os efeitos da incorporação de F127, AgNPs e CUR em lipossomas de DPPC.

Conforme pode-se visualizar na Figura 32 o fosfolípido de DPPC puro possui duas bandas características em 2914 e 2847 cm^{-1} , as quais correspondem respectivamente as vibrações antissimétricas e simétricas dos grupos CH_2 . A banda em 1729 cm^{-1} é característica do estiramento do grupo C=O e a banda dupla do alongamento antissimétrico de PO_2^- em 1225–1240 cm^{-1} .²⁵⁷

Para o espectro do copolímero F127 podem ser observadas bandas em 1321 e 1364 cm^{-1} , que correspondem às vibrações oscilantes dos grupos CH_2 , enquanto as vibrações de torção deste mesmo grupo ocorrem em 1239 e 1278 cm^{-1} . As vibrações de alongamento C-O-C fornecem três bandas principais em 1059, 1096 e 1140 cm^{-1} , sendo que por fim as bandas em 941 e 960 cm^{-1} são atribuídas as vibrações de balanço de CH_2 . Esses valores estão de acordo com estudos já realizados na literatura.²⁵⁸

No espectro para a formulação DPPC-F127 não há nenhum deslocamento significativo no número de onda para as bandas características de DPPC, este resultado indica que não há nenhuma mudança estrutural significativa para a incorporação de F127 na bicamada lipídica, não afetando sua estrutura. É necessário ressaltar, no entanto, que as análises de DSC indicaram uma desestabilização das vesículas formadas durante a liofilização, podendo ser a causa de não se verificar interação entre DPPC e F127 nas análises de FTIR. Pode-se perceber uma menor intensidade de transmitância, devido a concentração utilizada para a preparação de lipossomas.

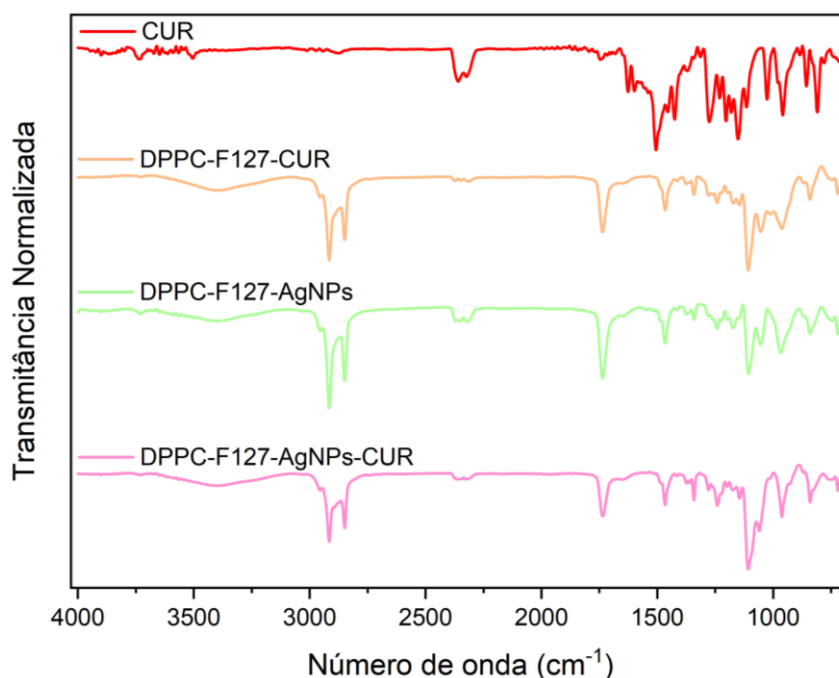
Figura 32. Espectros de FTIR para DPPC, F127 e para a formulação DPPC-F127.



Para o espectro FTIR da CUR, Figura 33, a banda em 3504 cm^{-1} corresponde à vibração de estiramento do O-H ligado ao hidrogênio presente na curcumina. A frequência C-C do anel aromático conjugado é obtida em 1627 cm^{-1} . As bandas em 1456 e 1427 cm^{-1} correspondem às vibrações de estiramento aromático do anel benzênico. A banda característica intensa em 1505 cm^{-1} corresponde à vibração de estiramento da carbonila conjugada (C=O). A banda centrada em 1598 cm^{-1} origina-se da vibração de estiramento do carbono de ligação dupla, enquanto as bandas centradas em 1276 cm^{-1} e centradas em 1154 cm^{-1} originam-se das vibrações de estiramento das ligações $\text{C}_{\text{sp}2}\text{-O}$ e $\text{C}_{\text{sp}3}\text{-O}$, respectivamente.²⁵⁹

No entanto, a incorporação de CUR e AgNPs aos lipossomas de DPPC-F127 não mostra nenhuma alteração significativa nos espectros, sendo que todos permanecem semelhantes ao de DPPC puro. Demetzos *et al.*²⁶⁰ ao estudar a entrega concomitante de doxorrubicina e cisplatina através de nanopartículas termossensíveis à base de lipossomas de DPPC-PEG também não observaram nenhuma mudança ou aparecimento de novos sinais nos espectros FTIR, indicando ausência de interações entre fosfolípidos e fármacos.

Figura 33. Espectros FTIR para CUR e para as formulações DPPC-127; DPPC-127-CUR; DPPC-127-AgNPs e DPPC-127-AgNPsCUR.



Tendo em vista os resultados obtidos, é válido salientar que as concentrações de F127, CUR e AgNPs são muito pequenas quando comparadas à concentração de DPPC, fato esse que pode estar dificultando as observações de possíveis interações pela técnica em questão.

5.7 EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAMENTO

A investigação acerca da capacidade de incorporação de fármacos em sistemas de carreamento é de grande importância no avanço de novas formulações. A eficácia terapêutica da formulação está diretamente ligada à quantidade do fármaco que será direcionada ao tecido-alvo. Nesse sentido, diversas estratégias são utilizadas a fim de aprimorar a eficiência de encapsulamento de fármacos em sistemas lipossomais, entre elas pode-se citar a evaporação em fase reversa, a utilização de ciclos de congelamento e descongelamento e a desidratação/reidratação de vesículas vazias pré-formadas.²⁶¹

Devido às características da síntese de AgNPs, a CUR foi incorporada ao sistema lipossomal através da incorporação passiva, uma metodologia simples que apresentou ótimos resultados para este sistema. As amostras liofilizadas e solubilizadas em acetonitrila foram analisadas por fluorescência, sendo que sua absorção no comprimento de onda máximo de $\lambda_{510\text{nm}}$ foi analisada conforme a curva de calibração disponível no Anexo F.

As formulações de DPPC-F127-CUR e DPPC-F127-AgNPs apresentaram eficiência de encapsulamento superior a 99% em relação à CUR, conforme Tabela 8, concordando com os dados de constante de ligação que indicam alta interação entre o sistema lipossomal e o FS. Destaca-se aqui que

os ensaios de eficiência de encapsulamento foram conduzidos a uma concentração de $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de CUR e de AgNPs. Esse cuidado foi tomado a fim de garantir que os potenciais fármacos estariam devidamente incorporados nas amostras enviadas para os ensaios *in vitro* (Item 5.9).

Tabela 8. Eficiência de encapsulamento da CUR no sistema lipossomal.

Amostra	Eficiência de encapsulamento CUR (% \pm DP)
DPPC-F127-CUR	99,40 \pm 0,70
DPPC-F127-AgNPs-CUR	99,90 \pm 0,01

A eficiência de encapsulamento das AgNPs no sistema está sendo analisada por espectroscopia de absorção atômica de forno de grafite por um laboratório parceiro.

5.8 PROPRIEDADES FOTOFÍSICAS

5.8.1 Cinética de degradação do ABDA: Rendimento Quântico de oxigênio singlete e Rendimento quântico de fluorescência

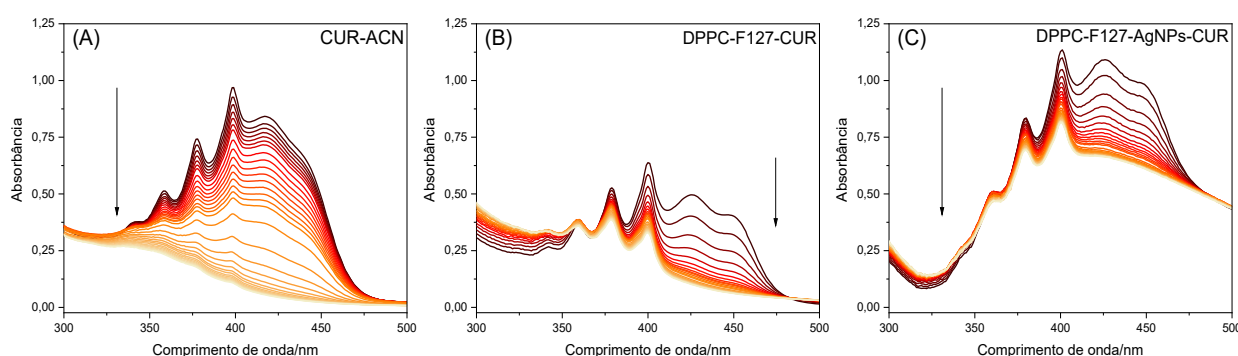
O desenvolvimento de novas formulações para a aplicação em TFD necessitam por fim da quantificação de $^1\text{O}_2$ gerado pelo sistema. Esta quantificação pode ser realizada diretamente a partir da avaliação da cinética de decaimento fosforescente no infravermelho próximo, o que requer equipamento especializado e de difícil acesso.¹²⁵

Uma opção alternativa para esta análise consiste na detecção do oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) por meio da abordagem indireta, utilizando sondas de detecção. Essas sondas são reagentes que, ao reagirem com o oxigênio singlete, passam por modificações em suas características espectroscópicas. Na literatura, algumas sondas são frequentemente empregadas, tais como o ácido úrico, o ABDA, o 1,3-Difenil-isobenzofurano (DPBF) e vários derivados do antraceno.²⁶² Cada sonda possui propriedades distintas em relação à detecção de $^1\text{O}_2$, exigindo uma análise prévia para sua seleção adequada. O DPBF, apesar de insolúvel em água, exibe alta sensibilidade ao $^1\text{O}_2$; no entanto, ele também reage com outras espécies reativas de oxigênio que podem estar presentes no meio. O ácido úrico, por sua vez, não demonstra sensibilidade à espécie reativa de oxigênio e pode levar à desativação do estado tripleto de alguns FS. Por fim, o ABDA, embora apresente sensibilidade em torno de apenas 2%, é seletivo em relação ao $^1\text{O}_2$ e é solúvel em água, sua reação com $^1\text{O}_2$ já foi demonstrada na Esquema 3.^{125, 262}

As cinéticas para a interação entre ABDA e as formulações, assim como para o padrão CUR-ACN, foram acompanhadas através de UV-Vis, conforme demonstrado na Figura 34. Como pode-se visualizar, na presença de luz (LED azul) ocorre diminuição da intensidade de absorbância para a CUR ($\lambda = 418 \text{ nm}$ em ACN e $\lambda = 425 \text{ nm}$ para as formulações DPPC-F127-CUR e DPPC-F127-AgNPs-CUR), assim

como para as bandas correspondentes ao ABDA, as quais ocorrem nos comprimentos de onda de 340, 355, 378 e 399 nm. A diminuição na intensidade de absorção da CUR está associada ao seu processo de fotobranqueamento, geralmente minimizado quando os FS são devidamente incorporados em sistemas de *drug delivery*. No caso do ABDA, a diminuição da intensidade de absorbância para os comprimentos de onda máximo correspondentes, indicam sua interação com o $^1\text{O}_2$ e a formação de seu endoperóxido.

Figura 34. Cinéticas na presença de luz para a análise da sonda ABDA com A) CUR-ACN B) DPPC-F127-CUR e C) DPPC-F127-AgNPs-CUR.



A eficácia da aplicação das formulações na TFD depende diretamente da geração de $^1\text{O}_2$ e, portanto, os rendimentos foram determinados e estão apresentados na Tabela 9. Também seguem listadas as constantes de velocidade k_{FB} e k_{ABDA} , além do Número de fótons absorvidos (N_{Abs}) e Eficiência Fotodinâmica Química (γ_{Δ}).

Tabela 9. Parâmetros cinéticos e fotofísicos obtidos por meio da reação entre o $^1\text{O}_2$ e o ABDA. $[\text{CUR}] = 1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; pH 7,4 e 25,0 °C.

Amostra	K_{ABDA} (10^{-3} min^{-1})	K_{FB} (10^{-2} min^{-1})	P_{Abs} (W)	N_{Abs} (einstein)	γ_{Δ}	$\phi_{\Delta}^1\text{O}_2$
CUR-ACN	4,3	6,0	0,105	74,3	5,78	0,11*
DPPC-F127-CUR	0,4	3,0	0,050	10,1	39,60	0,75
DPPC-F127-AgNPs-CUR	1,2	1,9	0,045	11,3	106,2	2,02

* valor obtido a partir da referência Chignell *et al.* ²⁰⁴

$\lambda_{\text{max}} (K_{\text{ABDA}}) = 355 \text{ nm}$

$\lambda_{\text{max}} (K_{\text{FB}}) = 418 \text{ ou } 425 \text{ nm}$

Como esperado, a CUR em ACN apresenta o menor rendimento quântico de oxigênio singleto dos sistemas analisados. Isto acontece pois em solventes orgânicos e com iluminação CUR sofre fotodegradação rapidamente, gerando produtos que são menos eficazes para a produção de $^1\text{O}_2$.²⁰⁴

Utilizando como padrão a CUR em ACN os valores de $\phi_{\Delta}^1\text{O}_2$ para CUR nos sistemas lipossomais apresentam incrementos significativos. O maior rendimento de $\phi_{\Delta}^1\text{O}_2$ neste caso está relacionado a incorporação do FS no interior da bicamada lipídica e por consequência, sua proteção. A

proteção da CUR no interior da bicamada lipídica é também evidenciada pela diminuição nos valores de K_{FB} em relação à ACN. Além disso, verifica-se que a presença das AgNPs torna o valor de K_{FB} ainda menor, estando de acordo com os dados de K_{SV} que apontam para a incorporação da CUR mais internamente quando na presença das nanopartículas metálicas.

Ainda, a combinação AgNPs-CUR mostra um considerável incremento quando comparado ao sistema lipossomal contendo apenas CUR. Este fato é associado ao almejado efeito ME^1O_2 , *metal-enhanced singlet oxygen effect*, neste caso tornando o $\phi\Delta^1O_2$ superior a 1, dada a transferência de elétrons. Conforme já discutido na revisão da literatura este efeito é observado quando a energia da excitação da ressonância plasmônica da nanopartícula metálica é semelhante à diferença entre a energia dos orbitais HOMO-LUMO do FS. Assim, o acoplamento ressonante se torna mais eficiente, favorecendo a migração de elétrons “quentes” das AgNPs para as moléculas de CUR.²⁶³ A eficiente sobreposição dos espectros de absorção da CUR e das AgNPs é um fator limitante na observação do efeito MEO. Esse efeito já foi relatado na literatura em um estudo envolvendo a incorporação de CUR e AgNPs em complexos polieletrólíticos de quitosana e sulfato de condroitina.²⁶⁴ Contudo, no estudo em questão, o $\phi\Delta^1O_2$ observado foi de 0,14, estando discretamente superior ao observado em ACN. No presente estudo, por outro lado, o aumento foi expressivamente elevado, estando relacionado à eficiente formulação das espécies, monomerização, interação e sobreposição espectral.

O rendimento quântico de fluorescência das amostras também foi determinado a partir da Equação 12 e os valores estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 10. Rendimento quântico de fluorescência (ϕ_F) para a CUR encapsulada em lipossomas revestidos constituídos por DPPC e F127. $[CUR] = 1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$.

Amostra	ϕ_F
CUR-Clorofórmio	0,154*
DPPC-F127-CUR	0,034
DPPC-F127-AgNPs-CUR	0,018

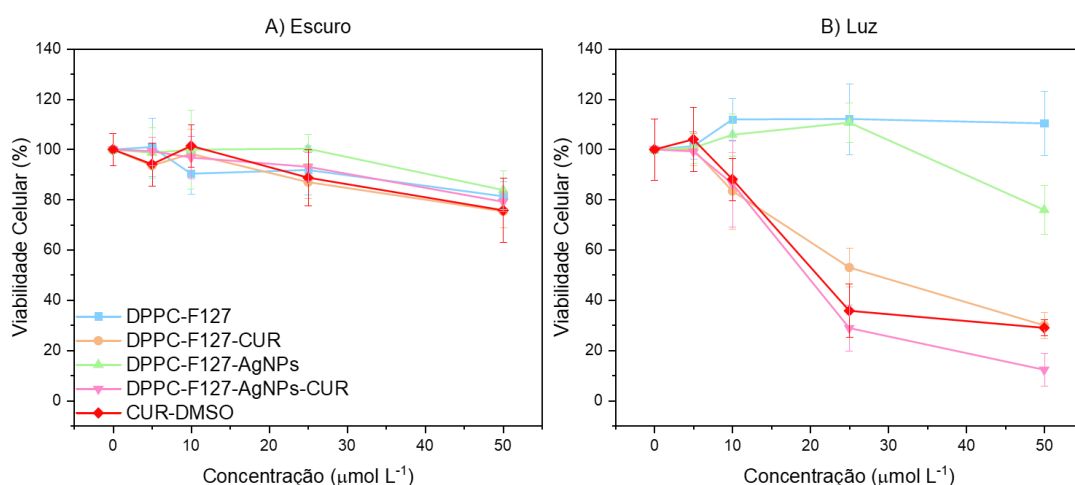
*Valor obtido a partir da referência²⁰¹

É bem conhecido que a formação de oxigênio singleto compete com a emissão de fluorescência, portanto moléculas altamente fluorescentes não seriam eficientes para TFD. O baixo valor do rendimento quântico de fluorescência no lipossoma de DPPC-F127-CUR indica que a maioria dos estados excitados da CUR, mesmo no lipossoma, não decai por processo radiativo.²⁶⁵ Além disso, a combinação AgNPs-CUR mostra menor rendimento quântico de fluorescência, devido as interações as quais já foram discutidas anteriormente (Tópicos 5.3 e 5.4). Por fim, os valores obtidos para o rendimento quântico de fluorescência foram correspondentes aos obtidos para o rendimento quântico de oxigênio singleto, onde o sistema com o menor valor de ϕ_F apresentou o melhor valor de $\phi\Delta^1O_2$.

5.9 ANÁLISE DA VIABILIDADE CELULAR DAS FORMULAÇÕES CONTRA CÉLULAS CANCERÍGENAS DO TIPO MELANOMA B16-F10

As células utilizadas para a análise de viabilidade celular foram células de melanoma do tipo B16-F10, a viabilidade celular foi avaliada através do ensaio de sulforrodamina B (SRB) e através de análises de microscopia óptica. Os resultados de viabilidade celular estão dispostos na Figura 35 e Figura 36.

Figura 35. Viabilidade celular das diferentes formulações lipossomais contra as células cancerígenas do tipo melanoma B16-F10.



A primeira observação necessária sobre a viabilidade celular é que nos experimentos realizados na ausência de iluminação “no escuro”, Figura 35A, nenhuma das formulações testadas apresentou efeitos citotóxicos significativos para as células cancerígenas B16-F10 (viabilidade celular > 70%). Além disso, dentro do erro experimental, todas as amostras tiveram resultados similares. Vale destacar que a literatura já traz estudos para o uso de CUR lipossomal em células B16-F10. Karewicz *et al.*²⁶⁷ utilizando lipossomas contendo CUR estabilizados por derivados de quitosana obteve resultados de citotoxicidade aumentada em relação à linhagem celular de câncer B16F10, enquanto nenhum efeito negativo significativo foi observado nas células NIH3T3 normais.

Nos experimentos envolvendo a iluminação, Figura 35B, a formulação “branca” contendo apenas as vesículas de DPPC/F127 não apresentou efeito citotóxico para a linhagem celular avaliada. A amostra de DPPC/F127/AgNPs mostrou citotoxicidade compatível à observada no escuro. No entanto, para as amostras contendo CUR quando ocorre a iluminação do sistema a viabilidade celular diminuiu drasticamente.

A citotoxicidade nas células B16-F10 para a concentração de $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ com irradiação durante 30 minutos chegou a ~70% para DPPC-F127-CUR e ~88% para DPPC-F127-CUR-AgNPs, no entanto para DPPC-F127-AgNPs foi de aproximadamente ~25%. A CUR livre também foi avaliada,

mostrando uma citotoxicidade de aproximadamente ~70% na concentração 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$. No entanto é necessário ressaltar a presença de DMSO no sistema tem relação com efeitos citotóxicos dependentes da porcentagem do solvente, rápida eliminação da circulação, baixa permeabilidade, além de não garantir a entrega seletiva tal como o sistema lipossomal, sendo, portanto, inviável. A partir destes dados foram calculados os valores de concentração inibitória média (IC_{50}) para as formulações DPPC-F127-CUR, DPPC-F127-CUR-AgNPs e para o padrão CUR-DMSO (Tabela 11). Para o restante das formulações e para o controle na ausência de luz não foi possível realizar o cálculo pois não se atingiu a inibição de 50%.

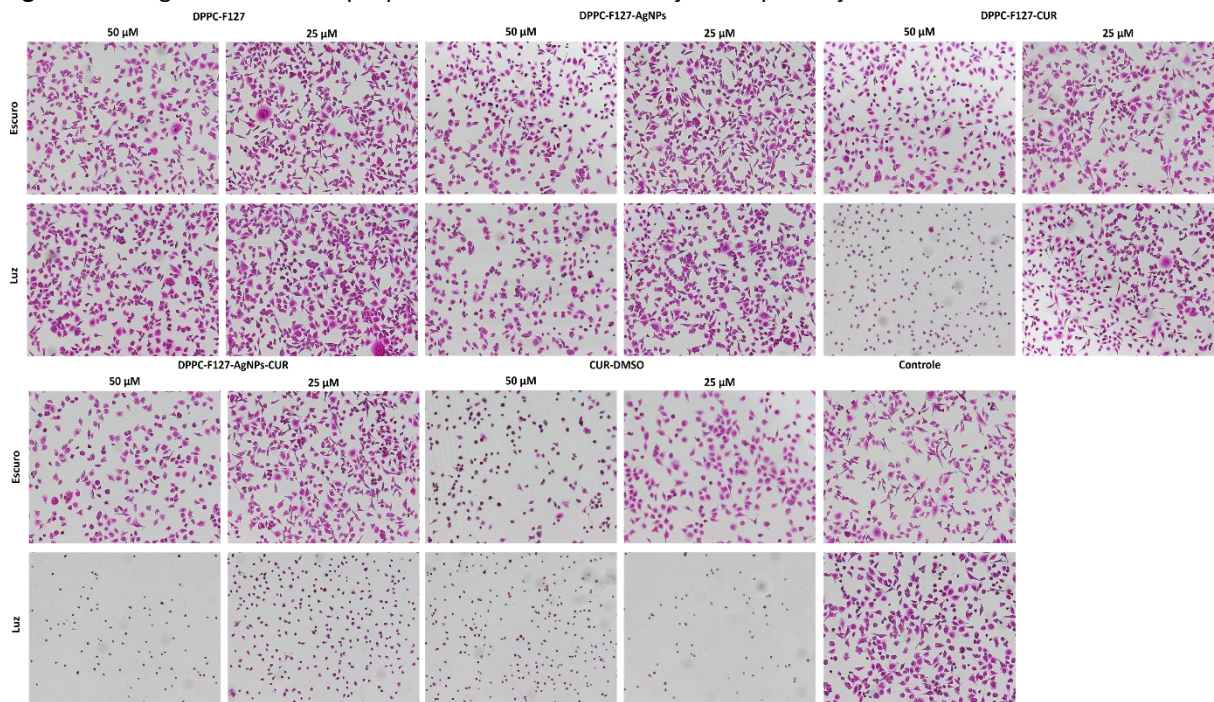
Tabela 11. Ação fotodinâmica com os valores de concentração citotóxica de 50% das células obtidas a partir do ajuste de dados não linear.

Formulação	IC_{50} ($\mu\text{mol L}^{-1}$)
DPPC-F127-CUR	24,71
DPPC-F127- AgNPs- CUR	18,14
CUR-DMSO	10,94

Conforme o esperado, a formulação que apresenta a combinação de CUR e AgNPs possui maior inibição, necessitando de menor concentração para atingir a inibição de 50% das células cancerígenas. Esse resultado está de acordo com a hipótese do trabalho, possibilitando a utilização da CUR em menores doses e potencializando os seus efeitos fotodinâmicos pela combinação com as AgNPs.

As imagens obtidas por microscopia óptica, Figura 36 mostram visualmente os dados obtidos, onde a viabilidade celular diminui de maneira drástica para as formulações DPPC-F127- AgNPs- CUR e DPPC-F127-CUR após a incidência de luz.

Figura 36. Imagens de microscopia para as diferentes formulações na presença e ausência de luz.



A maioria das pesquisas atuais sobre a atividade anticancerígena da CUR combinada com TFD concentrou-se em experimentos *in vitro* e em modelos animais, sendo que o mecanismo de morte celular pode ser explicado devido a uma combinação de fatores.²⁶⁸ Os efeitos da CUR nas mitocôndrias estão ligados a geração de EROs, levando ao estresse oxidativos. A CUR combinada com TFD poderia aumentar o acúmulo de espécies reativas de oxigênio nas células cancerígenas e induzir a apoptose celular. Este resultado foi confirmado em uma variedade de células cancerígenas, como células HN de carcinoma espinocelular oral humano²⁶⁹ e células de melanoma maligno humano A357.²⁷⁰

Além disso a combinação de CUR e TFD pode afetar o ciclo celular, de forma a induzir a apoptose celular, bloqueando o ciclo celular e regulando o nível de expressão da ciclina.²⁷¹ A apoptose, um processo de morte celular programada, é essencialmente influenciada pela CUR em conjunto com TFD. A ativação de caspases, como caspase-3, caspase-8 e caspase-9, é observada, resultando na indução da apoptose celular endógena e exógena.²⁷² Em células de câncer renal, a CUR combinada com TFD inibe a via de sinalização AKT-mTOR, reduzindo Bcl-2 e aumentando Bax, promovendo assim a apoptose. Esses efeitos foram corroborados em células de melanoma humano A375.²⁷³ Em resumo, a CUR em conjunto com TFD regula diversas vias de apoptose, proporcionando um potencial impacto anticâncer.

5.10 PERMEABILIDADE EX VIVO DE CURCUMINA E NANOPARTÍCULAS DE PRATA

O tratamento tópico de melanoma possui diversas vantagens em relação a outras vias de administração de fármacos, sendo minimamente invasivo, facilita a aplicação, possui perfis

farmacocinéticos uniformes e apresenta melhor biodisponibilidade, evitando o metabolismo pré-sistêmico.²⁷⁴ Ainda, a epiderme pode reter fármacos administrados topicamente, limitando a disseminação do mesmo. Esta propriedade pode reduzir efeitos colaterais em tecidos saudáveis e ainda beneficiar o tratamento do melanoma, uma vez que a epiderme é o principal sítio das lesões.²

Os experimentos de permeação *ex vivo* tiveram como objetivo quantificar a permeação da CUR e AgNPs em pele abdominal humana a partir das formulações preparadas. A CUR apresenta baixa absorção na pele e baixa solubilidade em meio aquoso, sendo necessário o uso de solubilizadores farmacêuticos (Propileno glicol-PG e Etanol-EtOH) a fim de manter a condição *sink* do sistema. Foram realizados dois experimentos em duplicatas, os quais apresentaram valores de quantificação estatisticamente diferentes e por isso, optou-se em discuti-los separadamente. Esta diferença pode ocorrer devido a diversos fatores, como as amostras de pele possuírem características de permeação diferente aos fármacos ou diferença no preparo das amostras. Para eliminar esse entrave, um terceiro experimento será realizado de acordo com a disponibilidade de nossos parceiros.

Os valores de intensidade de fluorescência obtidos para o Experimento 1 foram quantificados a partir da curva de calibração de CUR em ACN, disponível no Anexo G. Os valores obtidos para o Experimento 2 estão dispostos no Anexo H e apesar de apresentarem valores menores para a quantificação de CUR apresentam a mesma tendência do Experimento 1.

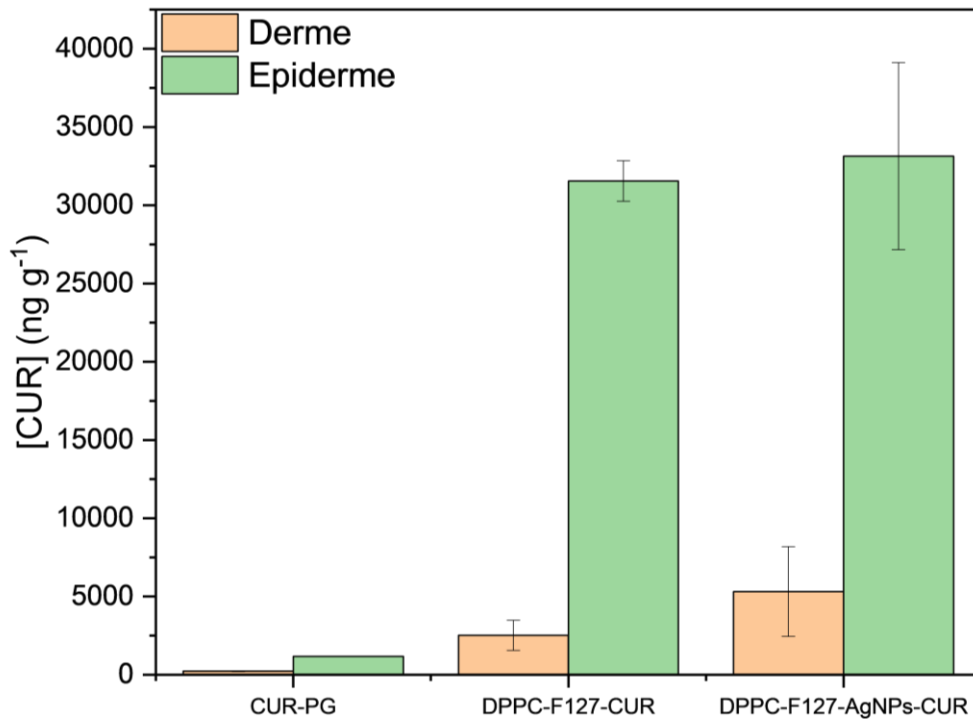
De acordo com a Figura 37 a incorporação de CUR nos sistemas lipossomais de DPPC-F127 e DPPC-F127-AgNPs mostrou aumento na retenção de CUR pela derme e epiderme quando comparados ao padrão CUR em PG. Pode-se verificar que a maior quantidade de CUR fica retida na epiderme, tendo menor concentração na derme. A solução retirada da câmara receptora, após ser devidamente tratada com acetonitrila, não apresentou fluorescência, indicando que a CUR não atravessou a pele.

O aumento da retenção de CUR na pele através da incorporação em sistemas lipídicos vem sendo estudada. As vesículas, quando aplicadas na pele, fundem-se com as membranas celulares lipídicas das células do estrato córneo (camada mais exterior da epiderme) devido à sua semelhança estrutural com os lipídios da pele. Além disso, a carga superficial dos lipossomas possui um papel importante na interação com a membrana celular, a qual é negativamente carregada.²⁷⁵ Fadel *et al.*²⁷⁶ a partir de estudos de permeação *in vivo* mostrou que nanopartículas lipídicas peguilladas aumentam a permeação e retenção de CUR na pele e ainda, analisou que a aplicação de luz não afetou a deposição de CUR nas camadas de pele. Etossomas (transportadores lipídicos compostos por etanol, fosfolipídios e água) revestidos por ácido hialurônico foram investigados para a encapsulação de CUR por Zhang *et al.*²⁷⁷ Os lipossomas revestidos apresentaram retenção de CUR quatro vezes maior na pele quando comparado a CUR em PG.

Para a derme a quantificação da CUR obteve valores de $234,66 \pm 34,70$ ng g⁻¹ para CUR em PG. Quando encapsulada em lipossomas de DPPC-F127 o valor foi de $2.526,45 \pm 960,64$ ng g⁻¹,

indicando que a interação do sistema lipossomal com a pele facilita a permeação através da epiderme. Por fim a análise para o sistema formado por DPPC-F127-AgNPs forneceu valores de $5.318,15 \pm 2.863,58 \text{ ng g}^{-1}$, indicando que a interação entre CUR-AgNPs facilita a permeação da CUR através da epiderme. Para a quantificação na epiderme a CUR em PG obteve-se uma média de $1.177,38 \pm 1,99 \text{ ng g}^{-1}$, sendo que este valor aumenta com a incorporação de CUR no sistema lipossomal DPPC-F127 para $31.554,81 \pm 1.294,45 \text{ ng g}^{-1}$, mostrando um aumento significativo de retenção da CUR devido as interações do fosfolípido com a epiderme. Por fim, para o sistema formado por DPPC-F127-AgNPs-CUR obteve-se um valor próximo $33.141,85 \pm 5.973,11 \text{ ng g}^{-1}$, indicando que a presença de AgNPs não altera significativamente a interação entre o lipossoma e a epiderme.

Figura 37. Quantidade de CUR em permeada por grama de pele (ng g^{-1}) através da pele humana na epiderme e derme. Os valores são representados como média \pm DP ($n = 2$).



6 CONCLUSÃO

No presente trabalho foram utilizados lipossomas híbridos polimérico-lipídicos para encapsular CUR e AgNPs. O sistema lipossomal formado a partir da combinação de DPPC e do copolímero F127 foi preparado com sucesso a partir da metodologia de dispersão sólida seguida de sonicação. A síntese de AgNPs foi realizada de maneira rápida e eficaz, a partir da metodologia de redução do sal de prata pelo citrato de sódio e fotoindução UV em condição ambiente de temperatura. No entanto não se mostraram completamente incorporadas aos lipossomas através de análises realizadas por TEM.

A eficiência de encapsulação para CUR ficou em torno de 99%, sendo ainda necessário a análise em relação as AgNPs. As análises espectroscópicas sugeriram a internalização da CUR no sistema lipossomal em sua forma monomérica, ideal para aplicação em TFD. Nos ensaios de DSC foi possível verificar as transições dos lipossomas DPPC-F127 e que a incorporação de CUR e AgNPs não altera significativamente sua temperatura de transição. Os estudos fotofísicos mostraram um alto rendimento quântico de oxigênio singleto para o sistema DPPC-F127-AgNPs-CUR, conforme o proposto através do efeito *metal-enhanced singlet oxygen generation*. Sendo este efeito também observado através de análises de viabilidade celular em células de melanoma B16-F10, onde a formulação DPPC-F127-CUR mostrou diminuição de viabilidade celular, a qual foi aumentada a partir da incorporação de AgNPs no sistema DPPC-F127-CUR. Nas análises de permeação a incorporação de CUR ao sistema lipossomal mostrou aumento de retenção tanto na derme quanto epiderme, sendo que a concentração na derme é ainda superior na presença de AgNPs.

Por fim, os dados apresentados respaldam a hipótese de que a incorporação da CUR em um sistema lipossomal polimérico-lipídico, combinada com doses de luz visível na presença de AgNPs, exhibe um potencial terapêutico aprimorado. Esses resultados ressaltam a importância da Terapia Fotodinâmica e sua relevante eficácia na abordagem do tratamento do melanoma maligno.

REFERÊNCIAS

- 1 DIVINO, J. J. *et al.* Updated Edition 2005 Facts and Figures Causes of Cancer Prevention Cure and Care Contacts. **World Health**, 2005. Disponível em: www.who.int/cancer/.
- 2 TAMBUNLERTCHAI, S.; GEARY, S. M.; SALEM, A. K. Skin Penetration Enhancement Strategies Used in the Development of Melanoma Topical Treatments. **The AAPS Journal**, v. 23, n. 1, p. 19, 2021.
- 3 KAH, G.; CHANDRAN, R.; ABRAHAMSE, H. Curcumin a Natural Phenol and Its Therapeutic Role in Cancer and Photodynamic Therapy: A Review. **Pharmaceutics**, v. 15, n. 2, p. 639, 2023.
- 4 SOHN, S. I. *et al.* Biomedical applications and bioavailability of curcumin—an updated overview. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 12, p. 1–33, 2021.
- 5 BUKOWSKI, K.; KCIUK, M.; KONTEK, R. Mechanisms of multidrug resistance in cancer chemotherapy. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 9, 2020.
- 6 STOHS, S. J. *et al.* Promising Avenues for Curcumin-Based Research and Application : A Review. **Molecules**, v. 25, n. Dmc, p. 1–12, 2020f. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7144558/pdf/molecules-25-01397.pdf>.
- 7 NSAIRAT, H. *et al.* Liposomes: structure, composition, types, and clinical applications. **Heliyon**, v. 8, n. 5, p. 09394, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e09394>.
- 8 DE FREITAS, C. F. *et al.* Rapid formation of Small Unilamellar Vesicles (SUV) through low-frequency sonication: An innovative approach. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 181, p. 837–844, 2019.
- 9 ESCUDERO, A. *et al.* Photodynamic therapy: photosensitizers and nanostructures. **Materials Chemistry Frontiers**, v. 5, n. 10, p. 3788–3812, 2021.
- 10 DIAS, L. D. *et al.* Curcumin as a photosensitizer: From molecular structure to recent advances in antimicrobial photodynamic therapy. **Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews**, v. 45, p. 100384, 2020.
- 11 TAVAKKOLI YARAKI, M. *et al.* Metal-enhancement study of dual functional photosensitizers with aggregation-induced emission and singlet oxygen generation. **Nanoscale Advances**, v. 2, n. 7, p. 2859–2869, 2020.
- 12 BLANK, C. U. *et al.* The “cancer immunogram”. **Science**, v. 352, n. 6286, p. 658–660, 2016l. Disponível em: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.aaf2834>.
- 13 FERLAY, J. *et al.* Cancer statistics for the year 2020: An overview. **International journal of cancer**, v. 149, n. 4, p. 778–789, 2021.
- 14 DE, Marcella *et al.* Estimativa de Incidência de Câncer no Brasil, 2023-2025. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 69, n. 1, p. e-213700, 2023.

- 15 Thuler, L. C. S. & Silva, M. J. S. da. *Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA)* 5a edição revista e atualizada. (2020).
- 16 FIDLER, I. J. The pathogenesis of cancer metastasis: the “seed and soil” hypothesis revisited. **Nature reviews. Cancer**, v. 3, n. 6, p. 453–458, 2003.
- 17 HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The Hallmarks of Cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57–70, 2000.
- 18 SANTOS, M. de O. *et al.* Estimativa de Incidência de Câncer no Brasil, 2023-2025. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 69, n. 1, 2023.
- 19 ZANONI, R. D. *et al.* ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO DESCRITIVO DO MELANOMA NO BRASIL E SUAS MACRORREGIÕES NOS ÚLTIMOS 5 ANOS. **Brazilian Journal of Implantology and Health Sciences**, v. 5, n. 4, p. 1331–1341, 2023.
- 20 SCHADENDORF, D. *et al.* Melanoma. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 1, n. 1, p. 15003, 2015.
- 21 O’NEILL, C. H.; SCOGGINS, C. R. Melanoma. **Journal of Surgical Oncology**, v. 120, n. 5, p. 873–881, 2019.
- 22 KHAN, N. H. *et al.* Skin cancer biology and barriers to treatment: Recent applications of polymeric micro/nanostructures. **Journal of Advanced Research**, v. 36, p. 223–247, 2022.
- 23 CLARK, W. H. *et al.* The histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanomas of the skin. **Cancer research**, v. 29, n. 3, p. 705–727, 1969.
- 24 SOUZA, Nayane de. **Efeitos citotóxicos do DM-1 em células de melanoma resistentes a um inibidor de BRAF e na expressão de metaloproteinases**. 2017. 131 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.
- 25 CATALANO, Orlando; CORVINO, Antonio. Ultrasound of skin cancer: what we need to know. In: **Seminars in Ultrasound, CT and MRI**. WB Saunders, 2023.
- 26 COHEN, S. M. New approaches for medicinal applications of bioinorganic chemistry. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 11, n. 2, p. 115–120, 2007.
- 27 ANDERSON, N. M.; SIMON, M. C. The tumor microenvironment. **Current Biology**, v. 30, n. 16, p. R921–R925, 2020.
- 28 WU, J. The Enhanced Permeability and Retention (EPR) Effect: The Significance of the Concept and Methods to Enhance Its Application. **Journal of Personalized Medicine**, v. 11, n. 8, p. 771, 2021.
- 29 LEPORATTI, S. Thinking about Enhanced Permeability and Retention Effect (EPR). **Journal of Personalized Medicine**, v. 12, n. 8, p. 1259, 2022.
- 30 HANAHAN, D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. **Cancer Discovery**, v. 12, n. 1, p. 31–46, 2022.

- 31 JOYCE, K. M. Surgical Management of Melanoma. *In: CUTANEOUS MELANOMA: ETIOLOGY AND THERAPY. Codon Publications*, 2017. p. 91–100.
- 32 GARBE, C. *et al.* Diagnosis and treatment of melanoma. European consensus-based interdisciplinary guideline – Update 2016. **European Journal of Cancer**, v. 63, p. 201–217, 2016.
- 33 BATUS, M. *et al.* Optimal Management of Metastatic Melanoma: Current Strategies and Future Directions. **American Journal of Clinical Dermatology**, v. 14, n. 3, p. 179–194, 2013.
- 34 KIM, C. *et al.* Long-Term Survival in Patients with Metastatic Melanoma Treated with DTIC or Temozolomide. **The Oncologist**, v. 15, n. 7, p. 765–771, 2010.
- 35 MIDDLETON, M. R. *et al.* Randomized Phase III Study of Temozolomide Versus Dacarbazine in the Treatment of Patients With Advanced Metastatic Malignant Melanoma. **Journal of Clinical Oncology**, v. 18, n. 1, p. 158–158, 2000.
- 36 BALDEA, I.; FILIP, A. G. Photodynamic therapy in melanoma—an update. **Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society**, v. 63, n. 2, p. 109–118, 2012.
- 37 MUSTE, J. C.; RUSSELL, M. W.; SINGH, R. P. Photobiomodulation Therapy for Age-Related Macular Degeneration and Diabetic Retinopathy: A Review. **Clinical Ophthalmology**, v. 15, p. 3709–3720, 2021.
- 38 FENG, Y. *et al.* Photodynamic and antibiotic therapy in combination against bacterial infections: efficacy, determinants, mechanisms, and future perspectives. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 177, p. 113941, 2021.
- 39 SHEN, J. J. *et al.* Photodynamic therapy treatment of superficial fungal infections: A systematic review. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 31, p. 101774, 2020.
- 40 WILLIS, J. A. *et al.* Photodynamic viral inactivation: Recent advances and potential applications. **Applied Physics Reviews**, v. 8, n. 2, 2021.
- 41 HENDERSON, B. W. **Photodynamic Therapy: Basic Principles and Clinical Applications**. 1. ed. New York: CRC Press, 1992.
- 42 GUNAYDIN, G.; GEDIK, M. E.; AYAN, S. Photodynamic Therapy for the Treatment and Diagnosis of Cancer—A Review of the Current Clinical Status. **Frontiers in Chemistry**, v. 9, 2021.
- 43 YANOVSKY, R. L. *et al.* Photodynamic therapy for solid tumors: A review of the literature. **Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine**, v. 35, n. 5, p. 295–303, 2019.
- 44 SIMPLICIO, F. I.; MAIONCHI, F.; HIOKA, N. Terapia fotodinâmica: aspectos farmacológicos, aplicações e avanços recentes no desenvolvimento de medicamentos. **Química Nova**, v. 25, n. 5, p. 801–807, 2002.
- 45 ABDEL-KADER, M. H. (org.). **Photodynamic Therapy**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2014.

- 46 GOLD, M. H. History of Photodynamic Therapy. **Photodynamic Therapy in Dermatology**. New York, NY: Springer New York, 2011. p. 1–4.
- 47 MACHADO, A. E. da H. Terapia fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e perspectivas. **Química Nova**, v. 23, n. 2, p. 237–243, 2000.
- 48 LIPSON, R. L.; BALDES, E. J.; OLSEN, A. M. The use of a derivative of hematoporphyrin in tumor detection. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 26, p. 1–11, 1961.
- 49 DOUGHERTY, T. J.; COOPER, M. T.; MANG, T. S. Cutaneous phototoxic occurrences in patients receiving Photofrin®. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 10, n. 5, p. 485–488, 1990.
- 50 CELLI, J. P. *et al.* Imaging and Photodynamic Therapy: Mechanisms, Monitoring, and Optimization. **Chemical Reviews**, v. 110, n. 5, p. 2795–2838, 2010.
- 51 MACDONALD, I. J.; DOUGHERTY, T. J. Basic principles of photodynamic therapy. **Journal of Porphyrins and Phthalocyanines**, v. 05, n. 02, p. 105–129, 2001.
- 52 BAGNATO, V. S. *et al.* PDT experience in Brazil: A regional profile. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 2, n. 2, p. 107–118, 2005.
- 53 A TERAPIA FOTODINÂMICA COMO BENEFÍCIO COMPLEMENTAR NA CLÍNICA ODONTOLÓGICA. Disponível em: http://revodonto.bvsalud.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-52762015000200004. Acesso em: 8 dez. 2023.
- 54 NAGATA, J. Y. *et al.* Antibacterial photodynamic therapy for dental caries: Evaluation of the photosensitizers used and light source properties. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 9, n. 2, p. 122–131, 2012.
- 55 MAROTTI, J. *et al.* Decontamination of dental implant surfaces by means of photodynamic therapy. **Lasers in Medical Science**, v. 28, n. 1, p. 303–309, 2013.
- 56 ISSA, M. C. A.; MANELA-AZULAY, M. Terapia fotodinâmica: revisão da literatura e documentação iconográfica. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 85, n. 4, p. 501–511, 2010.
- 57 ROSA, L. P. *et al.* Application of photodynamic therapy, laser therapy, and a cellulose membrane for calcaneal pressure ulcer treatment in a diabetic patient: A case report. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 19, p. 235–238, 2017.
- 58 DE MELO, W. C. *et al.* Photodynamic inactivation of biofilm: taking a lightly colored approach to stubborn infection. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 11, n. 7, p. 669–693, 2013.
- 59 BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Procedimento Terapia fotodinâmica para tratamento de carcinoma basocelular superficial e nodular. Relatório de recomendação, Procedimento n. 835, Brasília: 2023.
- 60 MACDONALD, I. J.; DOUGHERTY, T. J. Basic principles of photodynamic therapy. **Journal of Porphyrins and Phthalocyanines**, v. 05, n. 02, p. 105–129, 2001.

- 61 FENG, G.; ZHANG, G.-Q.; DING, D. Design of superior phototheranostic agents guided by Jablonski diagrams. **Chemical Society Reviews**, v. 49, n. 22, p. 8179–8234, 2020.
- 62 PLAETZER, K. *et al.* Photophysics and photochemistry of photodynamic therapy: fundamental aspects. **Lasers in Medical Science**, v. 24, n. 2, p. 259–268, 2009.
- 63 FOOTE, C. S. DEFINITION OF TYPE I and TYPE II PHOTOSENSITIZED OXIDATION. **Photochemistry and Photobiology**, v. 54, n. 5, p. 659–659, 1991.
- 64 AHN, J.-C.; CHUNG, P.-S. The activity of G-ROS and the predominant role of Type II reaction in the photodynamic therapy using 9-hydroxyphosphoribide- α for HeLa cell lines. **General physiology and biophysics**, v. 31, n. 3, p. 343–350, 2012.
- 65 SIMONE, C. B. *et al.* Photodynamic therapy for the treatment of non-small cell lung cancer. **Journal of thoracic disease**, v. 4, n. 1, p. 63–75, 2012.
- 66 GAI, S. *et al.* Recent advances in functional nanomaterials for light-triggered cancer therapy. **Nano Today**, v. 19, p. 146–187, 2018.
- 67 SHRIVER, D. F.; ATKINS, P. W. **Química inorgânica**. 4. ed. Porto Alegre: Bookman, 2008.
- 68 DEROSA, M. Photosensitized singlet oxygen and its applications. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 233–234, p. 351–371, 2002.
- 69 HATZ, S.; LAMBERT, J. D. C.; OGILBY, P. R. Measuring the lifetime of singlet oxygen in a single cell: addressing the issue of cell viability. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 6, n. 10, p. 1106–1116, 2007.
- 70 MACDONALD, I. J.; DOUGHERTY, T. J. Basic principles of photodynamic therapy. **Journal of Porphyrins and Phthalocyanines**, v. 05, n. 02, p. 105–129, 2001.
- 71 BHATTACHARYA, D. *et al.* Recent developments in photodynamic therapy and its application against multidrug resistant cancers. **Biomedical Materials**, v. 18, n. 6, p. 062005, 2023.
- 72 PEDIGO, Lisa A. *et al.* Absence of bacterial resistance following repeat exposure to photodynamic therapy. In: **Photodynamic Therapy: Back to the Future**. SPIE, 2009. p. 520-526.
- 73 TAN, L. *et al.* The Role of Photodynamic Therapy in Triggering Cell Death and Facilitating Antitumor Immunology. **Frontiers in Oncology**, v. 12, 2022.
- 74 KESSEL, D.; OLEINICK, N. L. Cell Death Pathways Associated with Photodynamic Therapy: An Update. **Photochemistry and Photobiology**, v. 94, n. 2, p. 213–218, 2018.
- 75 JIANG, X.; STOCKWELL, B. R.; CONRAD, M. Ferroptosis: mechanisms, biology and role in disease. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 22, n. 4, p. 266–282, 2021.
- 76 CAO, J. Y.; DIXON, S. J. Mechanisms of ferroptosis. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 73, n. 11–12, p. 2195–2209, 2016.

- 77 KORBELIK, M. *et al.* Adjuvant treatment for complement activation increases the effectiveness of photodynamic therapy of solid tumors. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 3, n. 8, p. 812–816, 2004.
- 78 FINGAR, V. H. Vascular Effects of Photodynamic Therapy. **Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery**, v. 14, n. 5, p. 323–328, 1996.
- 79 GARG, A. D. *et al.* Immunogenic cell death, DAMPs and anticancer therapeutics: An emerging amalgamation. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer**, v. 1805, n. 1, p. 53–71, 2010.
- 80 CASTANO, A. P.; MROZ, P.; HAMBLIN, M. R. Photodynamic therapy and anti-tumour immunity. **Nature Reviews Cancer**, v. 6, n. 7, p. 535–545, 2006.
- 81 ALLISON, R. R.; SIBATA, C. H. Oncologic photodynamic therapy photosensitizers: A clinical review. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 7, n. 2, p. 61–75, 2010.
- 82 CASTANO, A. P.; DEMIDOVA, T. N.; HAMBLIN, M. R. Mechanisms in photodynamic therapy: part one—photosensitizers, photochemistry and cellular localization. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 1, n. 4, p. 279–293, 2004.
- 83 WEERSINK, R. A. *et al.* Techniques for delivery and monitoring of TOOKAD (WST09)-mediated photodynamic therapy of the prostate: Clinical experience and practicalities. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 79, n. 3, p. 211–222, 2005.
- 84 MFOUO-TYNGA, I. S. *et al.* Features of third generation photosensitizers used in anticancer photodynamic therapy: Review. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 34, p. 102091, 2021.
- 85 AGGARWAL, B. *et al.* Curcumin - Biological and medicinal properties. *In*: **TURMERIC: THE GENUS CURCUMA**. 2006.
- 86 GUPTA, S. C. *et al.* Discovery of curcumin, a component of golden spice, and its miraculous biological activities. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 39, n. 3, p. 283–299, 2012.
- 87 NASCIMENTO, P. R. S. do; SILVA JÚNIOR, E. L. da; BRANCO, A. C. da S. C. Aplicações farmacológicas da Cúrcuma longa L. como planta medicinal: Uma revisão. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 10, p. e2629108430, 2020.
- 88 CHATTERJEE, P.; DUTTA, S. S.; CHAKRABORTY, T. Tautomers and Rotamers of Curcumin: A Combined UV Spectroscopy, High-Performance Liquid Chromatography, Ion Mobility Mass Spectrometry, and Electronic Structure Theory Study. **The Journal of Physical Chemistry A**, v. 126, n. 10, p. 1591–1604, 2022.

- 89 FIDALGO, Ana Carolina Domingues. **Material Polimérico Nanoestruturado para a liberação pH-responsiva da curcumina**. 2022. 97 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química, Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2022.
- 90 PRIYADARSINI, K. I. Photophysics, photochemistry and photobiology of curcumin: Studies from organic solutions, bio-mimetics and living cells. **Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews**, v. 10, n. 2, p. 81–95, 2009.
- 91 JOVANOVIC, S. V. *et al.* H-Atom Transfer Is A Preferred Antioxidant Mechanism of Curcumin. **Journal of the American Chemical Society**, v. 121, n. 41, p. 9677–9681, 1999.
- 92 PRIYADARSINI, K. I. Photophysics, photochemistry and photobiology of curcumin: Studies from organic solutions, bio-mimetics and living cells. **Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews**, v. 10, n. 2, p. 81–95, 2009.
- 93 PRIYADARSINI, K. The Chemistry of Curcumin: From Extraction to Therapeutic Agent. **Molecules**, v. 19, n. 12, p. 20091–20112, 2014.
- 94 SABET, S. *et al.* Recent advances to improve curcumin oral bioavailability. **Trends in Food Science & Technology**, v. 110, p. 253–266, 2021.
- 95 HSU, C. H.; CHENG, A. L. Clinical studies with curcumin. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 595, p. 471–480, 2007. Disponível em: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-0-387-46401-5_21. Acesso em: 8 dez. 2023.
- 96 GIORDANO; TOMMONARO. Curcumin and Cancer. **Nutrients**, v. 11, n. 10, p. 2376, 2019.
- 97 KUMAR, G. *et al.* Molecular mechanisms underlying chemopreventive potential of curcumin: Current challenges and future perspectives. **Life Sciences**, v. 148, p. 313–328, 2016.
- 98 GOEL, A.; KUNNUMAKKARA, A. B.; AGGARWAL, B. B. Curcumin as “Curecumin”: From kitchen to clinic. **Biochemical Pharmacology**, v. 75, n. 4, p. 787–809, 2008.
- 99 KEYVANI-GHAMSARI, S.; KHORSANDI, K.; GUL, A. Curcumin effect on cancer cells’ multidrug resistance: An update. **Phytotherapy Research**, v. 34, n. 10, p. 2534–2556, 2020.
- 100 LU, C. *et al.* Curcumin Induces Cell Death in Human Uveal Melanoma Cells through Mitochondrial Pathway. **Current Eye Research**, v. 35, n. 4, p. 352–360, 2010.
- 101 SIWAK, D. R. *et al.* Curcumin-induced antiproliferative and proapoptotic effects in melanoma cells are associated with suppression of I κ B kinase and nuclear factor κ B activity and are independent of the B-Raf/mitogen-activated/extracellular signal-regulated protein kinase pathway and the Akt pathway. **Cancer**, v. 104, n. 4, p. 879–890, 2005.
- 102 LIU, W. *et al.* Oral bioavailability of curcumin: problems and advancements. **Journal of Drug Targeting**, v. 24, n. 8, p. 694–702, 2016.
- 103 XIE, L. *et al.* Curcumin combined with photodynamic therapy, promising therapies for the treatment of cancer. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 146, p. 112567, 2022.

- 104 GOMES-FILHO, J. E. *et al.* Evaluation of photodynamic therapy on fibroblast viability and cytokine production. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 13, p. 97–100, 2016.
- 105 SZLASA, W. *et al.* Effects of curcumin based PDT on the viability and the organization of actin in melanotic (A375) and amelanotic melanoma (C32) – in vitro studies. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 132, p. 110883, 2020.
- 106 ABDEL FADEEL, D. A.; KAMEL, R.; FADEL, M. PEGylated lipid nanocarrier for enhancing photodynamic therapy of skin carcinoma using curcumin: in-vitro/in-vivo studies and histopathological examination. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 10435, 2020.
- 107 WOŹNIAK, M. *et al.* The Comparison of In Vitro Photosensitizing Efficacy of Curcumin-Loaded Liposomes Following Photodynamic Therapy on Melanoma MUG-Mel2, Squamous Cell Carcinoma SCC-25, and Normal Keratinocyte HaCaT Cells. **Pharmaceuticals**, v. 14, n. 4, p. 374, 2021.
- 108 XIE, L. *et al.* Curcumin combined with photodynamic therapy, promising therapies for the treatment of cancer. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 146, p. 112567, 2022.
- 109 CHIGNELL, C. F. *et al.* SPECTRAL AND PHOTOCHEMICAL PROPERTIES OF CURCUMIN. **Photochemistry and Photobiology**, v. 59, n. 3, p. 295–302, 1994.
- 110 LAMBERTS, J. J. M.; SCHUMACHER, D. R.; NECKERS, D. C. Novel rose bengal derivatives: synthesis and quantum yield studies. **Journal of the American Chemical Society**, v. 106, n. 20, p. 5879–5883, 1984.
- 111 GELLÉ, A. *et al.* Enhancing Singlet Oxygen Photocatalysis with Plasmonic Nanoparticles. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 13, n. 30, p. 35606–35616, 2021.
- 112 ZHANG, Y. *et al.* Metal-enhanced Singlet Oxygen Generation: A Consequence of Plasmon Enhanced Triplet Yields. **Journal of Fluorescence**, v. 17, n. 4, p. 345–349, 2007.
- 113 TAVAKKOLI YARAKI, M.; DAQIQEH REZAEI, S.; TAN, Y. N. Simulation guided design of silver nanostructures for plasmon-enhanced fluorescence, singlet oxygen generation and SERS applications. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 22, n. 10, p. 5673–5687, 2020.
- 114 DRAGAN, A. I.; GEDDES, C. D. Metal-enhanced fluorescence: The role of quantum yield, Q, in enhanced fluorescence. **Applied Physics Letters**, v. 100, n. 9, 2012.
- 115 PANDA, A. K. *et al.* New insights into therapeutic activity and anticancer properties of curcumin. **Journal of Experimental Pharmacology**, v. 9, p. 31–45, 2017.
- 116 KHAN, M. N. *et al.* Polymeric Nano-Encapsulation of Curcumin Enhances its Anti-Cancer Activity in Breast (MDA-MB231) and Lung (A549) Cancer Cells Through Reduction in Expression of HIF-1 α and Nuclear p65 (Rel A). **Current Drug Delivery**, v. 15, n. 2, p. 286–295, 2018.
- 117 SHEIKHPOUR, M. *et al.* Co-Administration of Curcumin and Bromocriptine Nano-liposomes for Induction of Apoptosis in Lung Cancer Cells. **Iranian Biomedical Journal**, v. 24, n. 1, p. 24–29, 2020.

- 118 LU, B.; ZHANG, Jianglin; ZHANG, Jiaheng. Enhancing Transdermal Delivery of Curcumin-Based Ionic Liquid Liposomes for Application in Psoriasis. **ACS Applied Bio Materials**, 2023.
- 119 FEYNMAN, Richard P. There's plenty of room at the bottom. **Journal of microelectromechanical systems**, v. 1, n. 1, p. 60-66, 1992.
- 120 BEHARI, J. **Principles of nanoscience: An overview** **Indian Journal of Experimental Biology**. 2010.
- 121 MURA, S.; NICOLAS, J.; COUVREUR, P. Stimuli-responsive nanocarriers for drug delivery. **Nature Materials**, v. 12, n. 11, p. 991–1003, 2013.
- 122 BRIGGER, I.; DUBERNET, C.; COUVREUR, P. Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, n. 5, p. 631–651, 2002.
- 123 ZAMBONI, W. C. *et al.* Best Practices in Cancer Nanotechnology: Perspective from NCI Nanotechnology Alliance. **Clinical Cancer Research**, v. 18, n. 12, p. 3229–3241, 2012.
- 124 COUVREUR, P. Nanoparticles in drug delivery: Past, present and future. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 65, n. 1, p. 21–23, 2013.
- 125 SILVA, Ana Claudia Pedrozo da. **Síntese e caracterização de fotossensibilizadores incorporados em sistemas lipossomais visando a Terapia Fotodinâmica**. 2024. 180 f. Tese (Doutorado) - Curso de Química, Química, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2023
- 126 TEWABE, A. *et al.* Targeted Drug Delivery — From Magic Bullet to Nanomedicine: Principles, Challenges, and Future Perspectives. **Journal of Multidisciplinary Healthcare**, v. 14, p. 1711–1724, 2021.
- 127 OWENSIII, D.; PEPPAS, N. Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 307, n. 1, p. 93–102, 2006.
- 128 MARKOVSKY, E. *et al.* Administration, distribution, metabolism and elimination of polymer therapeutics. **Journal of Controlled Release**, v. 161, n. 2, p. 446–460, 2012.
- 129 MARKOVSKY, E. *et al.* Administration, distribution, metabolism and elimination of polymer therapeutics. **Journal of Controlled Release**, v. 161, n. 2, p. 446–460, 2012.
- 130 CHATURVEDI, V. K. *et al.* Cancer Nanotechnology: A New Revolution for Cancer Diagnosis and Therapy. **Current Drug Metabolism**, v. 20, n. 6, p. 416–429, 2019.
- 131 BARENHOLZ, Y. (Chezy). Doxil® — The first FDA-approved nano-drug: Lessons learned. **Journal of Controlled Release**, v. 160, n. 2, p. 117–134, 2012.
- 132 YOSHIKAWA, T. *et al.* Rapid and continuous accumulation of nitric oxide-releasing liposomes in tumors to augment the enhanced permeability and retention (EPR) effect. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 565, p. 481–487, 2019.
- 133 SHERWOOD, L. M.; PARRIS, E. E.; FOLKMAN, J. Tumor Angiogenesis: Therapeutic Implications. **New England Journal of Medicine**, v. 285, n. 21, p. 1182–1186, 1971.

- 134 MODY, V. *et al.* Introduction to metallic nanoparticles. **Journal of Pharmacy And Bioallied Sciences**, v. 2, n. 4, p. 282, 2010.
- 135 AMENDOLA, V. *et al.* Surface plasmon resonance in gold nanoparticles: a review. **Journal of Physics: Condensed Matter**, v. 29, n. 20, p. 203002, 2017.
- 136 BRAGA, Thais Lazzarotto. **Pesquisa e desenvolvimento de nanofibras eletrofiadas com nanopartículas metálicas e fármacos fotoativos vislumbrando aplicações dermatológicas**. 2023. 143 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química, Química, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2023.
- 137 WILLETS, K. A.; VAN DUYNE, R. P. Localized Surface Plasmon Resonance Spectroscopy and Sensing. **Annual Review of Physical Chemistry**, v. 58, n. 1, p. 267–297, 2007.
- 138 SERAFINELLI, C. *et al.* Hybrid Nanocomposites of Plasmonic Metal Nanostructures and 2D Nanomaterials for Improved Colorimetric Detection. **Chemosensors**, v. 10, n. 7, p. 237, 2022.
- 139 WEI, L. *et al.* Silver nanoparticles: synthesis, properties, and therapeutic applications. **Drug Discovery Today**, v. 20, n. 5, p. 595–601, 2015.
- 140 MENDIS, P. *et al.* Nanosilver rainbow: a rapid and facile method to tune different colours of nanosilver through the controlled synthesis of stable spherical silver nanoparticles. **RSC Advances**, v. 6, n. 54, p. 48792–48799, 2016.
- 141 ZAHOOR, M. *et al.* A Review on Silver Nanoparticles: Classification, Various Methods of Synthesis, and Their Potential Roles in Biomedical Applications and Water Treatment. **Water**, v. 13, n. 16, p. 2216, 2021.
- 142 SLEPIČKA, P. *et al.* Methods of Gold and Silver Nanoparticles Preparation. **Materials**, v. 13, n. 1, p. 1, 2019.
- 143 MAITY, Anupam; PANDA, Sovan Kumar. Colloidal silver nanoparticles prepared by UV-light induced citrate reduction technique for the quantitative detection of uric acid. In: **AIP Conference Proceedings**. AIP Publishing, 2018.
- 144 PATEL, K. *et al.* Role of stabilizing agents in the formation of stable silver nanoparticles in aqueous solution: Characterization and stability study. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 38, n. 5, p. 626–631, 2017.
- 145 DARROUDI, M. *et al.* Fabrication and Characterization of Gelatin Stabilized Silver Nanoparticles under UV-Light. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, n. 9, p. 6346–6356, 2011.
- 146 SAKAI, T.; ISHIHARA, A.; ALEXANDRIDIS, P. Block copolymer-mediated synthesis of silver nanoparticles from silver ions in aqueous media. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 487, p. 84–91, 2015.

- 147 LONGENBERGER, L.; MILLS, G. Formation of Metal Particles in Aqueous Solutions by Reactions of Metal Complexes with Polymers. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 99, n. 2, p. 475–478, 1995.
- 148 BRUNA, T. *et al.* Silver Nanoparticles and Their Antibacterial Applications. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 13, p. 7202, 2021.
- 149 LEE, K.-S.; EL-SAYED, M. A. Gold and Silver Nanoparticles in Sensing and Imaging: Sensitivity of Plasmon Response to Size, Shape, and Metal Composition. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 110, n. 39, p. 19220–19225, 2006.
- 150 MIRANDA, R. R.; SAMPAIO, I.; ZUCOLOTTI, V. Exploring silver nanoparticles for cancer therapy and diagnosis. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 210, p. 112254, 2022.
- 151 TAKÁČ, P. *et al.* The Role of Silver Nanoparticles in the Diagnosis and Treatment of Cancer: Are There Any Perspectives for the Future?. **Life**, v. 13, n. 2, p. 466, 2023.
- 152 ARORA, S. *et al.* Interactions of silver nanoparticles with primary mouse fibroblasts and liver cells. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 236, n. 3, p. 310–318, 2009.
- 153 AKTER, M. *et al.* A systematic review on silver nanoparticles-induced cytotoxicity: Physicochemical properties and perspectives. **Journal of Advanced Research**, v. 9, p. 1–16, 2018.
- 154 FAROOQ, S.; DE ARAUJO, R. E. Identifying high performance gold nanoshells for singlet oxygen generation enhancement. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 35, p. 102466, 2021.
- 155 DE FREITAS, C. F. *et al.* Curcumin and silver nanoparticles carried out from polysaccharide-based hydrogels improved the photodynamic properties of curcumin through metal-enhanced singlet oxygen effect. **Materials Science and Engineering: C**, v. 112, p. 110853, 2020.
- 156 KE, X. *et al.* Co-enhancement of fluorescence and singlet oxygen generation by silica-coated gold nanorods core-shell nanoparticle. **Nanoscale Research Letters**, v. 9, n. 1, p. 666, 2014.
- 157 SILVA, M. M. *et al.* Synthesis of Pluronic-based silver nanoparticles/methylene blue nanohybrids: Influence of the metal shape on photophysical properties. **Materials Science and Engineering: C**, v. 114, p. 110987, 2020.
- 158 SILVA, M. M. *et al.* Synthesis of Pluronic-based silver nanoparticles/methylene blue nanohybrids: Influence of the metal shape on photophysical properties. **Materials Science and Engineering: C**, v. 114, p. 110987, 2020.
- 159 WANG, P.; TANG, H.; ZHANG, P. Plasmonic Nanoparticle-based Hybrid Photosensitizers with Broadened Excitation Profile for Photodynamic Therapy of Cancer Cells. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 34981, 2016.
- 160 SILVA, M. M. *et al.* Synthesis of Pluronic-based silver nanoparticles/methylene blue nanohybrids: Influence of the metal shape on photophysical properties. **Materials Science and Engineering: C**, v. 114, p. 110987, 2020.

- 161 CHU, Z. *et al.* Surface plasmon enhanced drug efficacy using core–shell Au@SiO₂ nanoparticle carrier. **Nanoscale**, v. 5, n. 8, p. 3406, 2013.
- 162 FALES, A. M.; YUAN, H.; VO-DINH, T. Silica-Coated Gold Nanostars for Combined Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS) Detection and Singlet-Oxygen Generation: A Potential Nanoplatfrom for Theranostics. **Langmuir**, v. 27, n. 19, p. 12186–12190, 2011.
- 163 KE, X. *et al.* Co-enhancement of fluorescence and singlet oxygen generation by silica-coated gold nanorods core-shell nanoparticle. **Nanoscale Research Letters**, v. 9, n. 1, p. 666, 2014.
- 164 KHAING OO, M. K. *et al.* 5-aminolevulinic acid-conjugated gold nanoparticles for photodynamic therapy of cancer. **Nanomedicine**, v. 3, n. 6, p. 777–786, 2008.
- 165 WIEDER, M. E. *et al.* Intracellular photodynamic therapy with photosensitizer-nanoparticle conjugates: cancer therapy using a ‘Trojan horse’. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 5, n. 8, p. 727–734, 2006.
- 166 GHASEMI, M.; KHORSANDI, K.; KIANMEHR, Z. Photodynamic inactivation with curcumin and silver nanoparticles hinders *Pseudomonas aeruginosa* planktonic and biofilm formation: evaluation of glutathione peroxidase activity and ROS production. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 37, n. 9, p. 149, 2021.
- 167 ENCAPSULATION OF CURCUMIN IN SILVER NANOPARTICLE FOR ENHANCEMENT OF ANTICANCER DRUG DELIVERY. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 9, n. 3.
- 168 BOZZUTO, G.; MOLINARI, A. Liposomes as nanomedical devices. **International Journal of Nanomedicine**, p. 975, 2015.
- 169 MARIN, Camila Fabiano de Freitas. **Estudos físico químicos de derivados ésteres da Eritrosina B incorporados em sistemas lipossomais revestidos com co polímeros do tipo PEO PPO PEO almejando aplicações em Terapia Fotodinâmica**. 2018. 241 f. Tese (Doutorado) - Curso de Química, Química, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2018.
- 170 HAERI, A. *et al.* Preparation and Characterization of Stable Nanoliposomal Formulation of Fluoxetine as a Potential Adjuvant Therapy for Drug-Resistant Tumors. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research : IJPR**, v. 13, p. 3, 2014. Disponível em: </pmc/articles/PMC3977048/>. Acesso em: 8 dez. 2023.
- 171 MONTIZAAN, D. *et al.* Comparison of the uptake mechanisms of zwitterionic and negatively charged liposomes by HeLa cells. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 30, p. 102300, 2020.
- 172 SEMPLE, S. C.; CHONN, A.; CULLIS, P. R. Interactions of liposomes and lipid-based carrier systems with blood proteins: Relation to clearance behaviour in vivo. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 32, n. 1–2, p. 3–17, 1998.

- 173 FELGNER, P. L. *et al.* Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 84, n. 21, p. 7413–7417, 1987.
- 174 BOZZUTO, G.; MOLINARI, A. Liposomes as nanomedical devices. **International Journal of Nanomedicine**, p. 975, 2015.
- 175 MAHERANI, B. *et al.* Liposomes: A Review of Manufacturing Techniques and Targeting Strategies. **Current Nanoscience**, v. 7, n. 3, p. 436–452, 2011.
- 176 HUANG, Z. *et al.* Progress involving new techniques for liposome preparation. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, [v. 9, n. 4, p. 176–182, 2014.
- 177 YU, Bo; LEE, Robert J.; LEE, L. James. Microfluidic methods for production of liposomes. **Methods in enzymology**, v. 465, p. 129-141, 2009.
- 178 PATIL, Y. P.; JADHAV, S. Novel methods for liposome preparation. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 177, p. 8–18, 2014.
- 179 HUANG, Y.; DAI, W.-G. Fundamental aspects of solid dispersion technology for poorly soluble drugs. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 4, n. 1, p. 18–25, 2014.
- 180 GUIMARÃES, D.; CAVACO-PAULO, A.; NOGUEIRA, E. Design of liposomes as drug delivery system for therapeutic applications. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 601, p. 120571, 2021.
- 181 ARNON, R.; SELA, M. In Vitro and In Vivo Efficacy of Conjugates of Daunomycin with Anti-Tumor Antibodies. **Immunological Reviews**, v. 62, n. 1, p. 5–27, 1982.
- 182 GABIZON, A. *et al.* Dose Dependency of Pharmacokinetics and Therapeutic Efficacy of Pegylated Liposomal Doxorubicin (DOXIL) in Murine Models. **Journal of Drug Targeting**, v. 10, n. 7, p. 539–548, 2002.
- 183 CATTEL, L.; CERUTI, M.; DOSIO, F. From Conventional to Stealth Liposomes a new Frontier in Cancer Chemotherapy. <https://doi.org/10.1177/030089160308900302>, [v. 89, n. 3, p. 237–249, 2003. Disponível em: https://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1177/030089160308900302?casa_token=T9OFgmHbe0YA AAAA%3AZyRjGA75UWg-phhJgEcT13cfFj4t4O54ATI1Tmt0gmIKk1WTsyQl-1OWKsqjR2LBQ2AEdizHUSag. Acesso em: 8 dez. 2023.
- 184 IMMORDINO, M. L.; DOSIO, F.; CATTEL, L. Stealth liposomes: review of the basic science, rationale, and clinical applications, existing and potential. **International Journal of Nanomedicine**, v. 1, n. 3, p. 297, 2006. Disponível em: </pmc/articles/PMC2426795/>. Acesso em: 8 dez. 2023.
- 185 MOGHIMI, S. M.; SZEBENI, J. Stealth liposomes and long circulating nanoparticles: critical issues in pharmacokinetics, opsonization and protein-binding properties. **Progress in Lipid Research**, v. 42, n. 6, p. 463–478, 2003.

- 186 ALLEN, T. M. Long-circulating (sterically stabilized) liposomes for targeted drug delivery. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 15, n. 7, p. 215–220, 1994.
- 187 ULRICH, A. S. Biophysical Aspects of Using Liposomes as Delivery Vehicles. **Bioscience Reports**, v. 22, n. 2, p. 129–150, 2002.
- 188 DAMS, E. T. *et al.* Accelerated blood clearance and altered biodistribution of repeated injections of sterically stabilized liposomes. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 292, n. 3, p. 1071–1079, 2000.
- 189 BOHORQUEZ, M. *et al.* A Study of the Temperature-Dependent Micellization of Pluronic F127. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 216, n. 1, p. 34–40, 1999gg. Disponível em: Acesso em: 8 dez. 2023.
- 190 YU, J. *et al.* Polymeric Drug Delivery System Based on Pluronics for Cancer Treatment. **Molecules**, v. 26, n. 12, p. 3610, 2021.
- 191 AKASH, M. S. H.; REHMAN, K. Recent progress in biomedical applications of Pluronic (PF127): Pharmaceutical perspectives. **Journal of Controlled Release**, v. 209, p. 120–138, 2015.
- 192 SANDEZ-MACHO, I. *et al.* Interaction of poloxamine block copolymers with lipid membranes: Role of copolymer structure and membrane cholesterol content. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 133, p. 270–277, 2015.
- 193 TAYLOR, K. M. G.; MORRIS, R. M. Thermal analysis of phase transition behaviour in liposomes. **Thermochimica Acta**, v. 248, p. 289–301, 1995.
- 194 DE FREITAS, C. F. *et al.* “Biotin-targeted mixed liposomes: A smart strategy for selective release of a photosensitizer agent in cancer cells”. **Materials Science and Engineering: C**, v. 104, p. 109923, 2019.
- 195 HUANG, Y.; DAI, W.-G. Fundamental aspects of solid dispersion technology for poorly soluble drugs. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 4, n. 1, p. 18–25, 2014.
- 196 PASCU, B. *et al.* Silver Nanoparticle Synthesis via Photochemical Reduction with Sodium Citrate. **International Journal of Molecular Sciences**, Vol. 24, Page 255, v. 24, n. 1, p. 255, 2022.
- 197 JIA, H. *et al.* A simple method to synthesize triangular silver nanoparticles by light irradiation. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 64, n. 4, p. 956–960, 2006.
- 198 SLEPIČKA, P. *et al.* Methods of Gold and Silver Nanoparticles Preparation. **Materials 2020, Vol. 13, Page 1**, v. 13, n. 1, p. 1, 2019.
- 199 LIU, P.; CHEN, G.; ZHANG, J. A Review of Liposomes as a Drug Delivery System: Current Status of Approved Products, Regulatory Environments, and Future Perspectives. **Molecules** v. 27, n. 4, p. 1372, 2022.

- 200 DAVIS, B. M. *et al.* Topical Curcumin Nanocarriers are Neuroprotective in Eye Disease. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 11066, 2018.
- 201 KHOPDE, S. M. *et al.* Effect of Solvent on the Excited-state Photophysical Properties of Curcumin. **Photochemistry and Photobiology**, v. 72, n. 5, p. 625, 2000.
- 202 DE FREITAS, C. F. *et al.* Potential of triblock copolymers Pluronic® P-84 and F-108 with erythrosine B and its synthetic ester derivatives for photodynamic applications. **Journal of Molecular Liquids**, v. 322, p. 114904, 2021.
- 203 RABELLO, B. R. *et al.* Singlet oxygen dosimetry using uric acid as a chemical probe: Systematic evaluation. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 238, p. 53–62, 2012.
- 204 CHIGNELL, C. F. *et al.* SPECTRAL AND PHOTOCHEMICAL PROPERTIES OF CURCUMIN. **Photochemistry and Photobiology**, v. 59, n. 3, p. 295–302, 1994.
- 205 VICHAI, V.; KIRTIKARA, K. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. **Nature Protocols**, [s. l.], v. 1, n. 3, p. 1112–1116, 2006.
- 206 VAN DE HULST, H. C. **Light Scattering by Small Particles**. New York: Dover Publication, 1981.
- 207 SHAW, D. J. **Introdução à química dos coloides e de superfícies**. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 1975.
- 208 HONARY, S.; ZAHIR, F. Effect of Zeta Potential on the Properties of Nano-Drug Delivery Systems - A Review (Part 2). **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 12, n. 2, 2013.
- 209 CAMPANI, V. *et al.* Skin permeation and thermodynamic features of curcumin-loaded liposomes. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 31, n. 2, p. 18, 2020.
- 210 SAHU, A. *et al.* Encapsulation of Curcumin in Pluronic Block Copolymer Micelles for Drug Delivery Applications. **Journal of Biomaterials Applications**, v. 25, n. 6, p. 619–639, 2011.
- 211 SAMANTA, S.; ROCCATANO, D. Interaction of Curcumin with PEO–PPO–PEO Block Copolymers: A Molecular Dynamics Study. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 117, n. 11, p. 3250–3257, 2013.
- 212 YUSUF, A.; CASEY, A. Liposomal encapsulation of silver nanoparticles (AgNP) improved nanoparticle uptake and induced redox imbalance to activate caspase-dependent apoptosis. **Apoptosis**, v. 25, n. 1–2, p. 120–134, 2020.
- 213 BRAGA, T. L. *et al.* Pluronic® P-123 as a reductant and stabilizing agent for gold nanoparticles (AuNPs) combined with methylene blue for photodynamic and photothermal therapy. **Journal of Molecular Liquids**, v. 383, p. 122111, 2023.

214 MONDAL, S.; GHOSH, S.; MOULIK, S. P. Stability of curcumin in different solvent and solution media: UV–visible and steady-state fluorescence spectral study. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 158, p. 212–218, 2016.

215 NIU, Y. *et al.* Effects of Curcumin Concentration and Temperature on the Spectroscopic Properties of Liposomal Curcumin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 7, p. 1865–1870, 2012.

216 MAILLARD, J. *et al.* Universal quenching of common fluorescent probes by water and alcohols. **Chemical Science**, v. 12, n. 4, p. 1352–1362, 2021.

217 VALEUR, B. **Molecular Fluorescence**: Wiley, 2001.

218 MENDIS, P. *et al.* Nanosilver rainbow: a rapid and facile method to tune different colours of nanosilver through the controlled synthesis of stable spherical silver nanoparticles. **RSC Advances**, v. 6, n. 54, p. 48792–48799, 2016.

219 MOORS, E. *et al.* Surface-Modified Silver Nanoparticles and Their Encapsulation in Liposomes Can Treat MCF-7 Breast Cancer Cells. **Journal of Functional Biomaterials**, v. 14, n. 10, p. 509, 2023.

220 ANGELESCU, D. G. *et al.* Synthesis and association of Ag(0) nanoparticles in aqueous Pluronic F127 triblock copolymer solutions. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 394, p. 57–66, 2012.

221 SAKAI, T.; ISHIHARA, A.; ALEXANDRIDIS, P. Block copolymer-mediated synthesis of silver nanoparticles from silver ions in aqueous media. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 487, p. 84–91, 2015.

222 GALASSO, V. *et al.* Spectroscopic and Theoretical Study of the Electronic Structure of Curcumin and Related Fragment Molecules. **The Journal of Physical Chemistry A**, v. 112, n. 11, p. 2331–2338, 2008.

223 MONDAL, S.; GHOSH, S.; MOULIK, S. P. Stability of curcumin in different solvent and solution media: UV–visible and steady-state fluorescence spectral study. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 158, p. 212–218, 2016.

224 DE FREITAS, C. F. *et al.* PEG-coated vesicles from Pluronic/lipid mixtures for the carrying of photoactive erythrosine derivatives. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 175, p. 530–544, 2019.

225 LOMBARDO, D.; KISELEV, M. A. Methods of Liposomes Preparation: Formation and Control Factors of Versatile Nanocarriers for Biomedical and Nanomedicine Application. **Pharmaceutics**, v. 14, n. 3, p. 543, 2022.

- 226 ISRAELACHVILI, J. N.; MITCHELL, D. J.; NINHAM, B. W. Theory of self-assembly of hydrocarbon amphiphiles into micelles and bilayers. **Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 2**, v. 72, p. 1525, 1976.
- 227 TRISTRAM-NAGLE, S.; NAGLE, J. F. Lipid bilayers: thermodynamics, structure, fluctuations, and interactions. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 127, n. 1, p. 3–14, 2004.
- 228 DE FREITAS, C. F. *et al.* PEG-coated vesicles from Pluronic/lipid mixtures for the carrying of photoactive erythrosine derivatives. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 175, p. 530–544, 2019.
- 229 HORINEK, D. DLVO Theory. *In: Encyclopedia of applied electrochemistry*. New York, NY: Springer New York, 2014. p. 343–346.
- 230 DE FREITAS, C. F. *et al.* "Biotin-targeted mixed liposomes: A smart strategy for selective release of a photosensitizer agent in cancer cells". **Materials Science and Engineering: C**, v. 104, p. 109923, 2019.
- 231 DE FREITAS, C. F. *et al.* PEG-coated vesicles from Pluronic/lipid mixtures for the carrying of photoactive erythrosine derivatives. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 175, p. 530–544, 2019.
- 232 MARIAM, J.; DONGRE, P. M.; KOTHARI, D. C. Study of Interaction of Silver Nanoparticles with Bovine Serum Albumin Using Fluorescence Spectroscopy. **Journal of Fluorescence**, v. 21, n. 6, p. 2193–2199, 2011.
- 233 LAKOWICZ, J. R. (org.). **Principles of Fluorescence Spectroscopy**. Boston, MA: Springer US, 2006.
- 234 KUNWAR, A.; BARIK, A.; PRIYADARSINI, K. I. **ABSORPTION AND FLUORESCENCE STUDIES OF CURCUMIN BOUND TO LIPOSOME AND LIVING CELLS**. 2007.
- 235 NIU, Y. *et al.* Effects of Curcumin Concentration and Temperature on the Spectroscopic Properties of Liposomal Curcumin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 7, p. 1865–1870, 2012.
- 236 ASLAN, K. *et al.* Metal-enhanced fluorescence: an emerging tool in biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 16, n. 1, p. 55–62, 2005.
- 237 PATRA, D.; MALAEB, N. N. Fluorescence modulation of 1,7-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione by silver nanoparticles and its possible analytical application. **Luminescence**, v. 27, n. 1, p. 11–15, 2012.
- 238 BHATTARAI, R. *et al.* Spectroscopic Investigation on the Interaction of Curcumin with Phosphatidylcholine Liposomes. **Journal of Surface Science Technology**, v. 31, n. 1–2, p. 1–9, 2015.

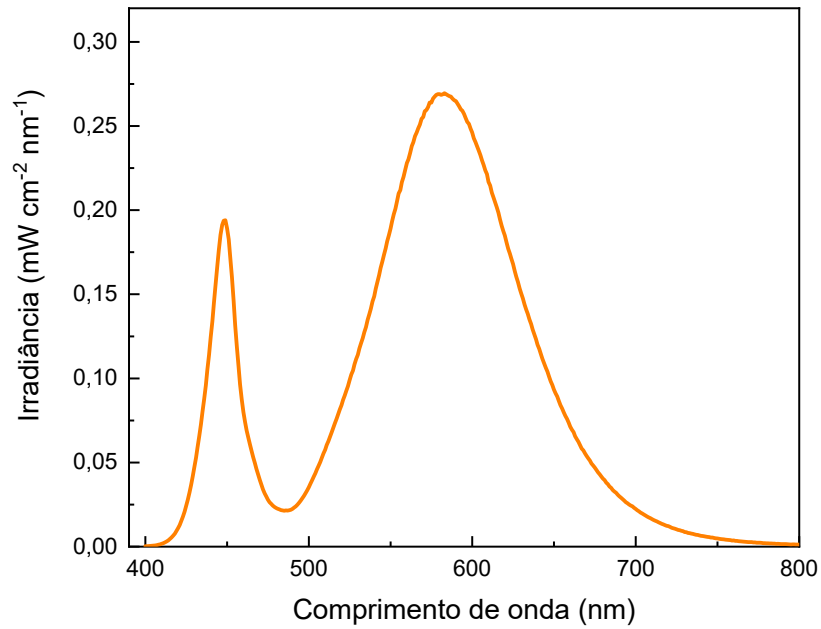
- 239 ANGELINI, G.; PASC, A.; GASBARRI, C. Curcumin in silver nanoparticles aqueous solution: Kinetics of keto-enol tautomerism and effects on AgNPs. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 603, p. 125235, 2020.
- 240 ENUMO, A.; PEREIRA, C. I. D.; PARIZE, A. L. Temperature Evaluation of Curcumin Keto–Enolic Kinetics and Its Interaction with Two Pluronic Copolymers. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 123, n. 26, p. 5641–5650, 2019.
- 241 LIU, M. *et al.* Enhancing stability of curcumin-loaded casein nanoparticles by adding liposomal nanoparticles. **LWT**, v. 189, p. 115405, 2023.
- 242 LAKOWICZ, J. R. **Principles of fluorescence spectroscopy**, Springer, New York, USA, 3rd edn, 2006- ISSN 10111344.
- 243 BLACKWELL, M. F. *et al.* A method for estimating lateral diffusion coefficients in membranes from steady-state fluorescence quenching studies. **Biophysical Journal**, v. 51, n. 5, p. 735–744, 1987.
- 244 E COURA, Carla Patrícia de Morais *et al.* A mathematical model for nonlinear fluorescence quenching. **AIP Conference Proceedings**. AIP Publishing LLC, 2015. p. 120008.
- 245 BARRY, J. *et al.* Determining the Effects of Lipophilic Drugs on Membrane Structure by Solid-State NMR Spectroscopy: The Case of the Antioxidant Curcumin. **Journal of the American Chemical Society**, v. 131, n. 12, p. 4490–4498, 2009.
- 246 PUCHALSKI, M. M.; MORRA, M. J.; YON WANDRUSZKA, R. **Assessment of inner filter effect corrections in fluorimetry** *Journal of Fresenius J Anal Chem*. Springer-Verlag, 1991.
- 247 LEE, I.-Y. S.; SUZUKI, H. Quenching dynamics promoted by silver nanoparticles. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 195, n. 2–3, p. 254–260, 2008.
- 248 HU, Z. *et al.* Iodine-Modified Ag NPs for Highly Sensitive SERS Detection of Deltamethrin Residues on Surfaces. **Molecules**, v. 28, n. 4, p. 1700, 2023.
- 249 FU, L. *et al.* Simultaneous determination of iodide and bromide using a novel LSPR fluorescent Ag nanocluster probe. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 240, p. 315–321, 2017.
- 250 WEHBE, N. *et al.* Modulation of membrane properties by silver nanoparticles probed by curcumin embedded in 1,2-Dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine liposomes. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 173, p. 94–100, 2019.
- 251 PRIYADARSINI, K. I. Photophysics, photochemistry and photobiology of curcumin: Studies from organic solutions, bio-mimetics and living cells. **Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews**, v. 10, n. 2, p. 81–95, 2009.
- 252 NEUNERT, G. *et al.* Assessment of DPPC Liposome Disruption by Embedded Tocopheryl Malonate. **Applied Sciences**, v. 13, n. 10, p. 6219, 2023.

- 253 İSPIR, E. *et al.* Synthesis, characterization and in vitro release analysis of pluronic F127 copolymer micelles containing quercetin as a hydrophobic drug. **Polymer Bulletin**, 2023.
- 254 CHIENG, Y. Y.; CHEN, S. B. Interaction and Complexation of Phospholipid Vesicles and Triblock Copolymers. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 113, n. 45, p. 14934–14942, 2009.
- 255 SAYYAR, Z.; JAFARIZADEH-MALMIRI, H. Temperature Effects on Thermodynamic Parameters and Solubility of Curcumin O/W Nanodispersions Using Different Thermodynamic Models. **International Journal of Food Engineering**, v. 15, n. 1–2, 2019.
- 256 BOTHUN, G. D. Hydrophobic silver nanoparticles trapped in lipid bilayers: Size distribution, bilayer phase behavior, and optical properties. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 6, n. 1, p. 13, 2008.
- 257 ALESKNDRANY, A.; SAHIN, I. The effects of Levothyroxine on the structure and dynamics of DPPC liposome: FTIR and DSC studies. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1862, n. 6, p. 183245, 2020.
- 258 BRANCA, C. *et al.* Effect of intercalated chitosan/clay nanostructures on concentrated pluronic F127 solution: A FTIR-ATR, DSC and rheological study. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 517, p. 221–229, 2018.
- 259 LESTARI, M. L. A. D.; INDRAYANTO, G. Curcumin. *In*: **PROFILES OF DRUG SUBSTANCES, EXCIPIENTS AND RELATED METHODOLOGY**. Academic Press Inc., 2014. v. 39, p. 113–204.
- 260 MASWADEH, H. M. *et al.* Concomitant delivery of doxorubicin and cisplatin through liposome-based thermosensitive nanoparticles: perspective in the treatment of cancer in animal models. **American journal of cancer research**, v. 13, n. 2, p. 379–393, 2023.
- 261 ULLMANN, K.; LENEWEIT, G.; NIRSCHL, H. How to Achieve High Encapsulation Efficiencies for Macromolecular and Sensitive APIs in Liposomes. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 5, p. 691, 2021.
- 262 ENTRADAS, T.; WALDRON, S.; VOLK, M. The detection sensitivity of commonly used singlet oxygen probes in aqueous environments. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 204, p. 111787, 2020.
- 263 ZHANG, Y. *et al.* Metal-enhanced singlet oxygen generation: A consequence of plasmon enhanced triplet yields. **Journal of Fluorescence**, v. 17, n. 4, p. 345–349, 2007.
- 264 DE FREITAS, C. F. *et al.* Curcumin and silver nanoparticles carried out from polysaccharide-based hydrogels improved the photodynamic properties of curcumin through metal-enhanced singlet oxygen effect. **Materials Science and Engineering: C**, v. 112, p. 110853, 2020.
- 265 KUNWAR, A. *et al.* Transport of liposomal and albumin loaded curcumin to living cells: An absorption and fluorescence spectroscopic study. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1760, n. 10, p. 1513–1520, 2006.

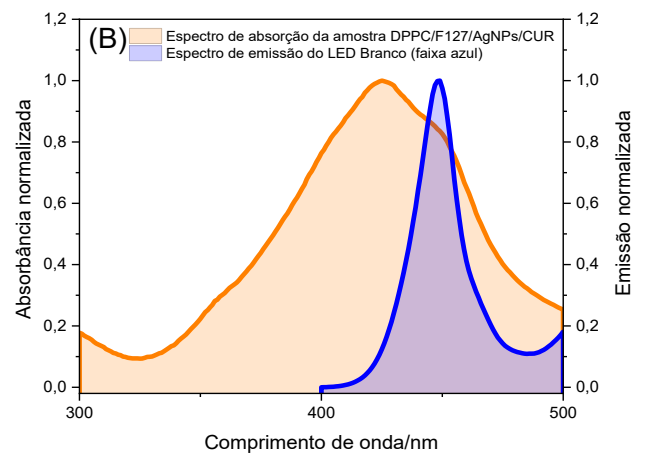
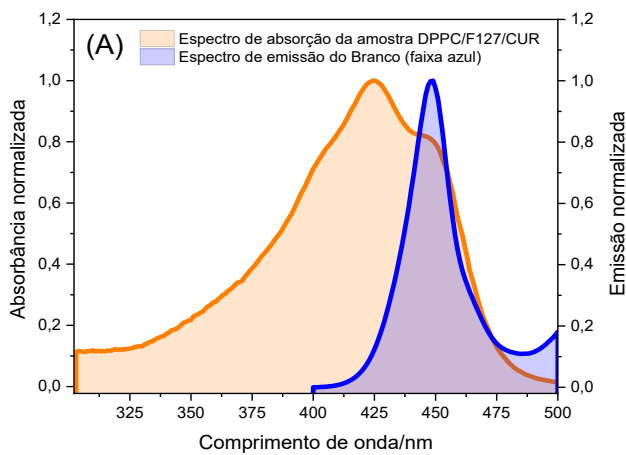
- 266 KAREWICZ, A. *et al.* Curcumin-containing liposomes stabilized by thin layers of chitosan derivatives. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 109, p. 307–316, 2013.
- 267 CHEN, Y. *et al.* Preparation of Curcumin-Loaded Liposomes and Evaluation of Their Skin Permeation and Pharmacodynamics. **Molecules**, v. 17, n. 5, p. 5972–5987, 2012.
- 268 XIE, L. *et al.* Curcumin combined with photodynamic therapy, promising therapies for the treatment of cancer. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 146, p. 112567, 2022.
- 269 BEYER, K. *et al.* Photodynamic Treatment of Oral Squamous Cell Carcinoma Cells with Low Curcumin Concentrations. **Journal of Cancer**, v. 8, n. 7, p. 1271–1283, 2017.
- 270 BUSS, S. *et al.* Visible Light Is a Better Co-Inducer of Apoptosis for Curcumin-Treated Human Melanoma Cells than UVA. **PLoS ONE**, v. 8, n. 11, p. e79748, 2013.
- 271 ICARD, P. *et al.* Interconnection between Metabolism and Cell Cycle in Cancer. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 44, n. 6, p. 490–501, 2019.
- 272 PISTRITTO, G. *et al.* Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies. **Aging**, v. 8, n. 4, p. 603–619, 2016.
- 273 NIU, T. *et al.* Inhibition of Autophagy Enhances Curcumin United light irradiation-induced Oxidative Stress and Tumor Growth Suppression in Human Melanoma Cells. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 31383, 2016.
- 274 ESCOBAR-CHAVEZ, J. *et al.* Nanocarriers for transdermal drug delivery. **Research and Reports in Transdermal Drug Delivery**, p. 3, 2012.
- 275 LEMOS, C. N. *et al.* Nanoparticles influence in skin penetration of drugs. *In: Nanostructures for the engineering of cells, tissues and organs*. Elsevier, 2018, p. 187–248.
- 276 ABDEL FADEEL, D. A.; KAMEL, R.; FADEL, M. PEGylated lipid nanocarrier for enhancing photodynamic therapy of skin carcinoma using curcumin: in-vitro/in-vivo studies and histopathological examination. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 10435, 2020.
- 277 ZHANG, Y. *et al.* CD44 Assists the Topical Anti-Psoriatic Efficacy of Curcumin-Loaded Hyaluronan-Modified Ethosomes: A New Strategy for Clustering Drug in Inflammatory Skin. **Theranostics**, v. 9, n. 1, p. 48–64, 2019.

ANEXOS

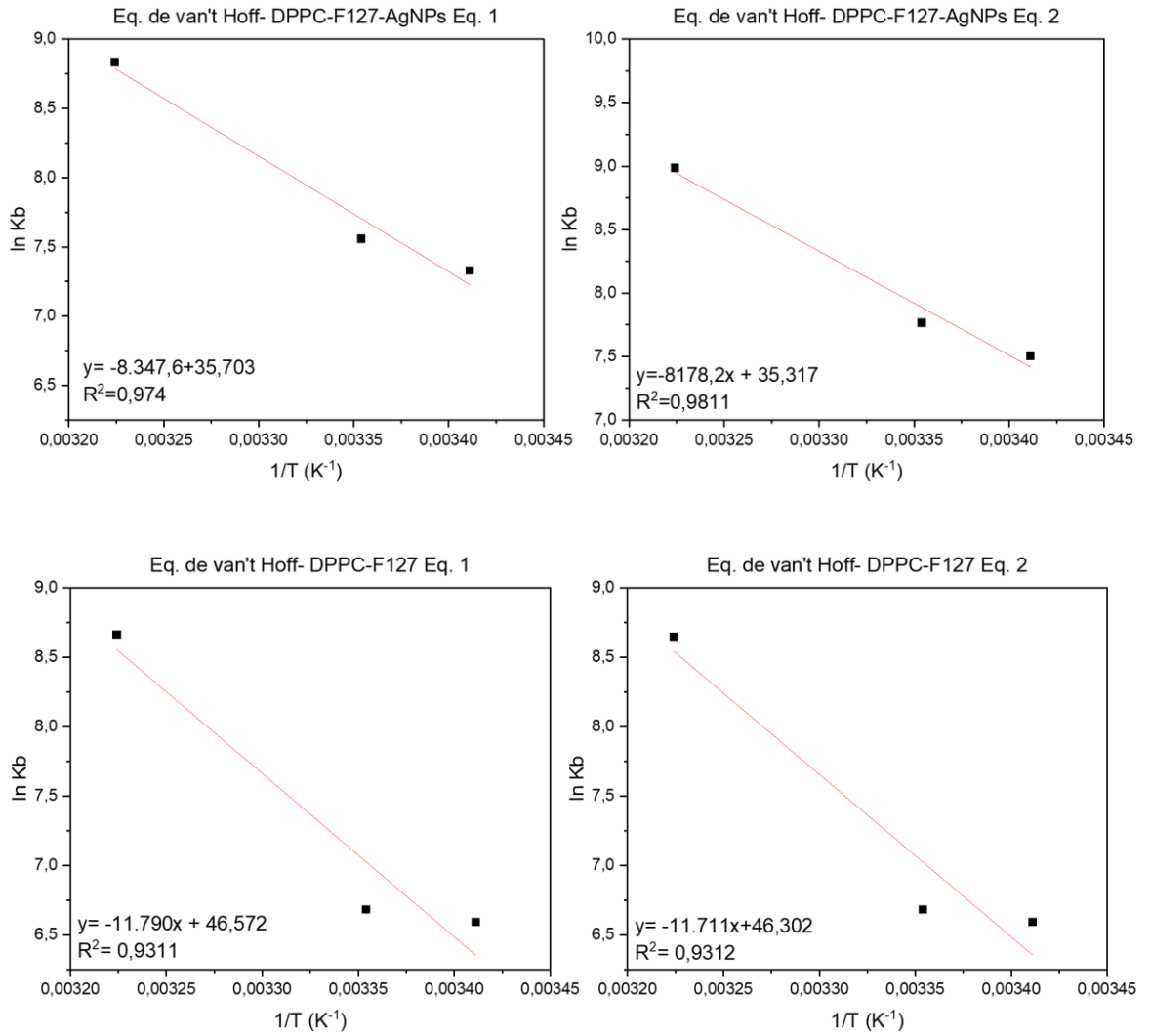
Anexo A. Espectro de emissão- Fonte de luz teste biológico.



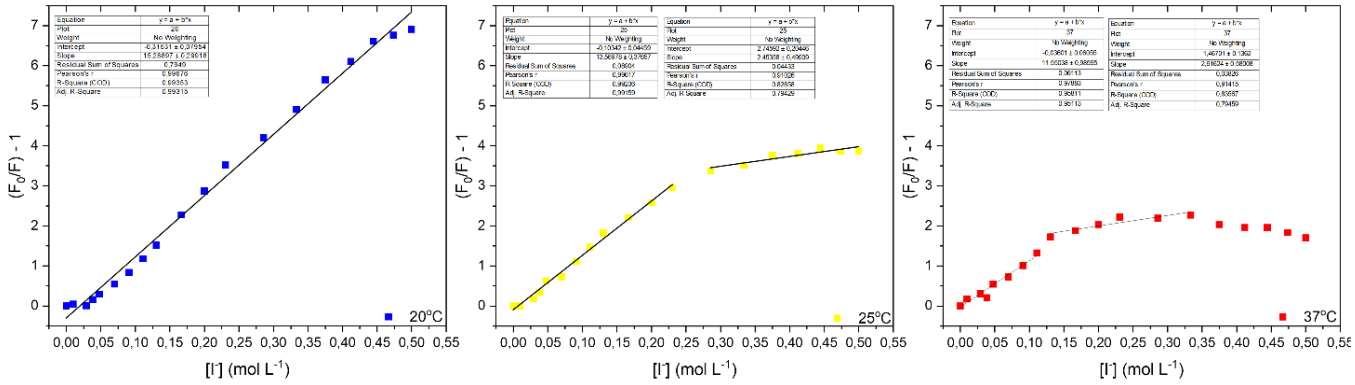
Anexo B. Sobreposição espectro de emissão fonte de luz branca e formulações A) DPPC-F17-CUR B) DPPC-F127-AgNPs-CUR



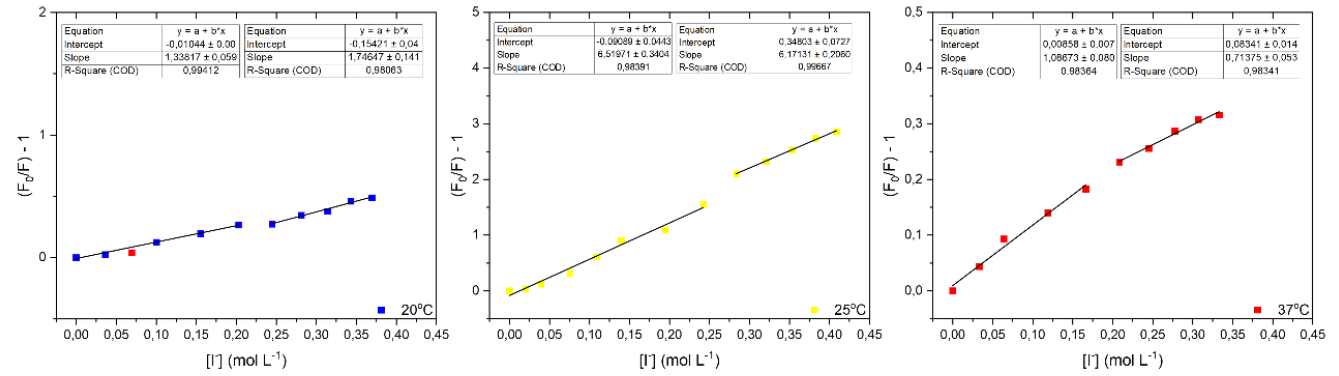
Anexo C. Aplicação da Equação de van't Hoff.



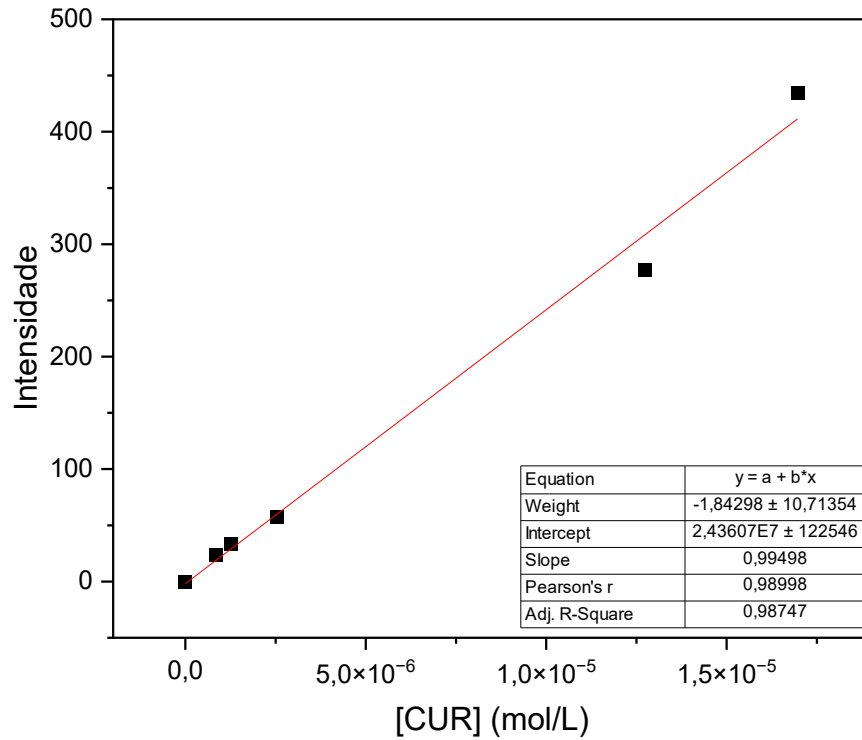
Anexo D. Equação de Stern-Volmer aplicada à DPPC-F127-CUR.



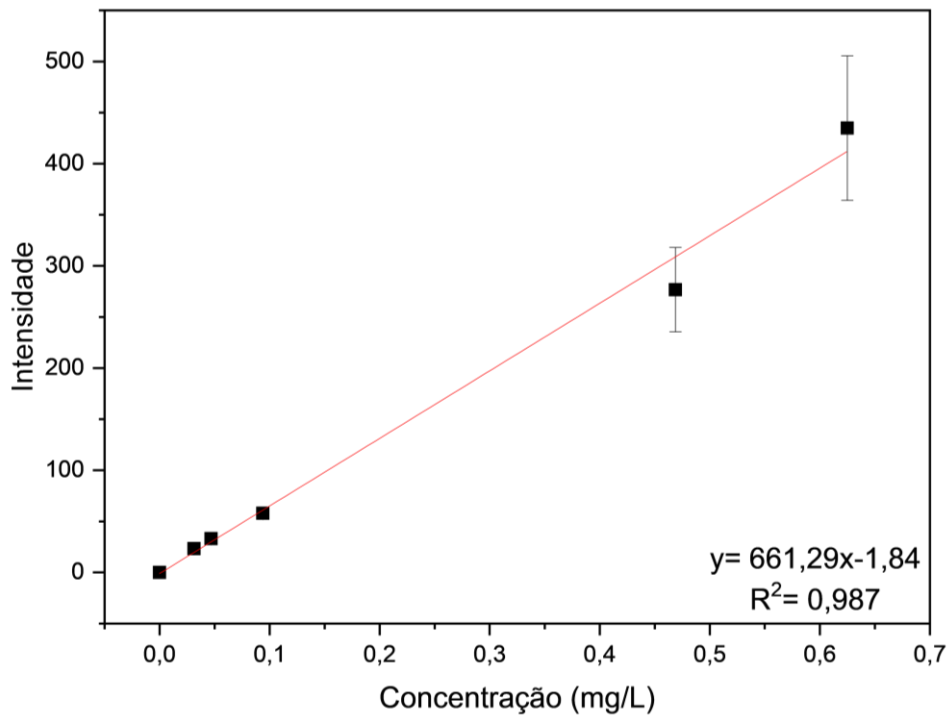
Anexo E. Equação de Stern-Volmer aplicada à DPPC-F127-AgNPs-CUR.



Anexo F. Curva de calibração de curcumina em acetonitrila no comprimento de onda de 510 nm.



Anexo G. Curva de Calibração de CUR em ACN em 510 nm.



Anexo H. Quantificação de CUR para o Exp. 2 de permeação

