



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**ESTUDO DA PRESENÇA DE COLESTEROL NA ATIVIDADE FOTODINÂMICA
DE FTALOCIANINAS LIPOSSOMAS**

Aluno: Erick Guimarães França

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto de Oliveira

Coorientador: Prof. Dr. Eduardo de Faria Franca

Uberlândia/MG

2017



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**ESTUDO DA PRESENÇA DE COLESTEROL NA ATIVIDADE FOTODINÂMICA
DE FTALOCIANINAS LIPOSSOMAIS**

Aluno: Erick Guimarães França

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto de Oliveira

Coorientador: Prof. Dr. Eduardo de Faria Franca

**Tese apresentada à Universidade
Federal de Uberlândia como
parte dos requisitos para
obtenção do título de doutor em
química**

Uberlândia/MG

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

F814c França, Erick Guimarães, 1985-
2017 Estudo da presença de colesterol na atividade fotodinâmica de
ftalocianinas lipossomais / Erick Guimarães França. - 2017.
85 f. : il.

Orientador: Carlos Alberto de Oliveira.
Coorientador: Eduardo de Faria França.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa
de Pós-Graduação em Química.
Inclui bibliografia.

1. Química - Teses. 2. Lipossomos - Teses. 3. Ftalocianinas - Teses.
4. Colesterol - Teses. I. Oliveira, Carlos Alberto de. II. França, Eduardo
de Faria. III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-
Graduação em Química. IV. Título.



**Ata da defesa de TESE DE DOUTORADO junto ao Programa de Pós-Graduação em Química,
do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia
DEFESA DE TESE DE DOUTORADO EM QUÍMICA, NÚMERO 65/PPQUI.**

DATA: 27/04/2017

DISCENTE: Érick Guimarães França

MATRÍCULA: 11223QMI003

TÍTULO DO TRABALHO: Efeitos da presença de colesterol livre e colesterol esterificado na atividade fotodinâmica de ftalocianinas lipossomais.

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: Química

LINHA DE PESQUISA: Química Bioinorgânica

PROJETO DE PESQUISA DE VINCULAÇÃO: Avaliação da atividade fotossensibilizadores sobre células utilizando-se lipossomas aditivados como sistema de entrega de drogas.

Às quatorze horas do dia vinte e sete de abril do ano dois mil e dezessete, no Auditório B, Bloco 50, Campus Santa Mônica, reuniu-se a Banca Examinadora composta pelos Professores Doutores Náilton Monteiro do Nascimento Júnior, da Universidade Estadual de São Paulo, Fabiano Paiva Vieira, do Instituto Federal de Goiás, Reinaldo Ruggiero e Domingos Sávio de Miranda, da Universidade Federal de Uberlândia e Carlos Alberto de Oliveira, orientador(a) e presidente da mesa. Iniciando os trabalhos, o(a) presidente da mesa apresentou o(a) candidato(a) e a Banca Examinadora, agradeceu a presença do público e discorreu sobre as normas e critérios para a realização desta sessão, baseadas na Norma Regulamentar nº 03/2013/PPQUI. Em seguida, o(a) presidente da mesa concedeu a palavra ao(a) candidato(a) para a exposição do seu trabalho e, em sequência, aos examinadores, em ordem sucessiva, para arguir o(a) apresentador(a). A duração da apresentação e o tempo de arguição e resposta deram-se conforme as normas do Programa. Última a arguição, desenvolvida dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu os conceitos finais e A provou o(a) candidata(o). Por sugestão da Banca Examinadora, o título do trabalho será

Estudo da presença de colesterol na atividade fotodinâmica de ftalocianinas lipossomais

Esta defesa de Tese de Doutorado é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor. O competente diploma será expedido após cumprimento do estabelecido nas normas do Programa, legislação e regulamentação internas da UFU. As correções observadas pelos examinadores deverão ser realizadas no prazo máximo de 30 dias. Nada mais havendo a tratar, deu-se por encerrada a sessão às 18 horas e 45 minutos e lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pela Banca Examinadora.

Prof. Dr. Náilton Monteiro do Nascimento Júnior

- UNESP

Prof. Dr. Reinaldo Ruggiero – UFU

Prof. Dr. Fabiano Paiva Vieira –

IFG

Prof. Dr. Domingos Sávio de Miranda – UFU

Professor(a) Orientador(a): Carlos Alberto de Oliveira – IQUFU

Agradecimentos

Dedico este trabalho a Deus, e agradeço a ele por me conceder a oportunidade de estar presente na vida de tantas pessoas queridas por mim e nos mostrar a estrela guia Jesus para que sejamos melhores para com o mundo e nós mesmos. Agradeço também a Mãe Maria por conceder tantos pedidos e sempre interceder pelo meu bem.

Aos formadores do meu ser, seja corpo ou mente, Aldo e Marta, bem como Ranieri, eu credito o meu sucesso também a vocês e agradeço por me proporcionarem toda a base moral e espiritual necessária para o cumprimento de meu papel de cidadão. A dedicação de vocês ainda resultará em frutos diversos e prósperos para a sociedade. Meu obrigado por assumirem com tamanha responsabilidade minha criação e também por apoiarem o meu crescimento profissional com carinho.

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto de Oliveira pela amizade, compreensão e tantos momentos de aprendizado dentro e fora da área de trabalho. Sem dúvida alguma acima de qualquer orientação, a amizade é a semente que plantamos e que se tornou fruto e árvore também semear.

Ao Prof. Dr. Eduardo de Faria Franca pelas inúmeras contribuições para com este trabalho, desempenhando também o papel de orientação e amizade por durante esses anos de doutoramento.

Aos professores Dr. Fabiano, Dr. Naílton, Dr. Domingos e Dr. Reinaldo que aceitaram o convite para a banca de defesa e professores Dra. Françoise e Dr. Gustavo na banca de qualificação, por concederem o seu tempo e dedicação para o desenvolvimento da ciência. Saibam que foram escolhidos por sabermos do valor de suas contribuições e nos alegramos pela sua presença nesta importante etapa do processo.

Agradeço a Natalia Senju, Henrique Menezes, Ludmilla David e Marina Paz pelo carinho e amizade, e também por terem participado ativamente deste trabalho sendo parte integrante dele, vocês são a prova de que podemos construir a ciência em sua plenitude quando estamos em conjunto.

Aos amigos queridos, Ana Cristina, Bruno, Drielly, Lucas, Miran, Richard, Waleska e tantos outros que a cada dia me mostram mais que o valor da verdadeira amizade supera os limites físicos e as distâncias do tempo e espaço.

Agradeço também a todos os amigos, professores e colegas da Universidade Federal de Uberlândia, dentre eles em especial, os amigos do LCQC, LABIOFOT e LAFIP.

Ao programa de Pós-graduação em química, em especial à Mayta por estar presente nos momentos de necessidades.

Agradeço aos colegas de trabalho e alunos do Instituto Federal de Goiás, *campus* Formosa, pela paciência e por contribuírem também com minha liberação em inúmeros momentos para que este trabalho pudesse ser concluído.

E também agradeço aos órgãos financiadores deste projeto, CAPES e CNPq.

Resumo

O tratamento de doenças da civilização moderna utilizando novas abordagens em detrimento às intervenções clássicas têm se mostrado uma importante linha de pesquisa para o combate de infecções e tumores diversos. Dentro deste contexto, a inativação fotodinâmica surge como alternativa de inviabilização de células para tratamento de câncer e infecções perniciosas. A combinação de luz em comprimento de onda adequado, um corante fotossensibilizador, por exemplo, as ftalocianinas, e oxigênio molecular é capaz de gerar espécies oxidantes como o oxigênio singlete, que oxidam moléculas diversas dentro da célula. Para realizar a entrega eficiente deste composto à células e tecidos, pode-se utilizar como sistema de entrega vesículas formadas por bicamada de fosfolipídios e colesterol, os lipossomas. Neste trabalho, foi avaliada a eficiência fotodinâmica da ftalocianina de zinco encapsulada em lipossomas aditivados com colesterol livre e colesterol esterificado em diferentes proporções para avaliar a taxa de hemólise de eritrócitos de carneiro utilizados como modelo celular. Adicionalmente, foram avaliadas a taxa de encapsulação das diferentes formulações das ftalocianinas lipossomais, e sua consequente estabilidade, diâmetro e carga superficial. Também foram realizadas simulações computacionais de membranas lipídicas aditivadas ou não com colesterol e ftalocianina de zinco, para obtenção de valores de densidade das membranas, difusão lateral da ftalocianina de zinco, mobilidade atômica do sistema e do fármaco e mapas de densidade do sistema. As formulações lipossomais com uma proporção adequada entre colesterol livre e esterificado e fosfolipídio apresentam taxa de encapsulação em torno de 80%. A combinação de uma intensidade luminosa adequada é capaz de ativar o fotossensibilizador gerando espécies reativas de oxigênio capazes de promover a inativação fotodinâmica dos eritrócitos de carneiro. A interação dos fotossensibilizadores com o colesterol livre influi na disposição espacial dos mesmos na vesícula e está diretamente relacionada com a taxa de mortalidade celular. As formulações lipossomais propostas nesse trabalho apresentaram uma boa estabilidade em 45 dias.

Palavras-chave: Lipossoma, Fotoinativação, Colesterol, Química Computacional, Ftalocianina.

Abstract

The treatment of diseases in modern civilization using new models instead classical interventions has been considered an important research line for infection and tumors treatment. In this context, the photodynamic inactivation appears as an alternative way to inactivate cells in cancer treatment and pernicious infections. The combination of light in appropriate wavelength, a photosensitizer, like phthalocyanines, and molecular oxygen is capable to generate oxidizing species as singlet oxygen causing damages in cells. A drug delivery system is capable to increase the delivery effectiveness of drugs into cells and tissues. Liposomes are lipid formed vesicles containing phospholipids and cholesterol derivatives in several proportions and was used in this work to deliver zinc phthalocyanines to sheep red blood cells. Liposomal parameters like encapsulation rates, hemolysis caused by photoinactivation, effects of different proportions of cholesterol/phospholipids, nanoparticle diameters, superficial charge and stability on storage, were performed. We also performed computational simulations of lipid membranes added or not with cholesterol and zinc phthalocyanine, to obtain membrane density values, zinc phthalocyanine side diffusion, system and drug atomic mobility and density maps of the system. Liposomes with suitable ratio between free cholesterol and esterified cholesterol and phospholipids showed encapsulation rates of approximately 80%. The combination of an appropriated luminous intensity is capable to activate the photosensitizer generating reactive oxygen species that promotes the photoinactivation of red blood cells. The interaction between photosensitizer and cholesterol or esterified cholesterol may change the spatial disposition of these species in vesicle affecting directly photoinactivation effectiveness. The liposomal formulations proposed in this work showed good stability in 45 days periods.

Key-words: Liposome, Photoinactivation, Cholesterol, Computational Chemistry, Phthalocyanine.

Sumário

CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO	1
1.1 EVENTOS FOTODINÂMICOS	2
1.1.1 Espécies reativas de oxigênio	4
1.1.2 Fotossensibilizadores	7
1.2 LIPOSSOMAS	10
1.3 ERITRÓCITOS E FOTOINATIVAÇÃO CELULAR	16
1.4 SIMULAÇÕES COMPUTACIONAIS EM MEMBRANAS LIPÍDICAS	18
CAPÍTULO 2. CARACTERIZAÇÃO E FOTOBIOLOGIA DE FTALOCIANINAS DE ZINCO LIPOSSOMAS	22
2.1 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	23
2.1.1 Justificativa	23
2.1.2 Objetivo geral	23
2.1.3 Objetivos específicos	23
2.2 METODOLOGIA	24
2.2.1 Materiais e reagentes	23
2.2.2 Preparo de soluções	23
2.2.3 Produção dos lipossomas	24
2.2.4 Preparo das suspensões de hemácias	26
2.2.5 Determinação da taxa de encapsulação	26
2.2.6 Caracterização dos lipossomas	26
2.2.7 Estudo da estabilidade lipossomal	27
2.2.8 Estudo da atividade fotodinâmica	27
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
2.3.1 Irradiância espectral efetiva	30
2.3.2 Taxa de encapsulação dos fotossensibilizadores	31
2.3.3 Caracterização dos lipossomas	34
2.3.4 Estabilidade lipossomal	35
2.3.5 Atividade fotodinâmica de ZnPc lipossomal	38
2.3.6 Influência da irradiância na atividade fotodinâmica de ZnPc lipossomal	47

CAPÍTULO 3. SIMULAÇÃO COMPUTACIONAL DE MEMBRANAS CONTENDO FTALOCIANINA DE ZINCO	50
3.1 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	51
3.1.1 Justificativa	51
3.1.2 Objetivo geral	51
3.1.3 Objetivos específicos	51
3.2 METODOLOGIA.....	52
3.2.1 Desenho e otimização estrutural	52
3.2.2 Sistemas simulados.....	52
3.2.3 Dinâmica molecular	53
3.2.4 Ferramentas computacionais para análise de dados	53
3.2.4.1 <i>Densidade</i>	53
3.2.4.2 <i>Raiz quadrada do desvio quadrático médio (RMSD) e raiz quadrada da flutuação quadrática média (RMSF)</i>	53
3.2.4.3 <i>Volume médio de membrana</i>	54
3.2.4.4 <i>Deslocamento quadrático médio (mean square displacement - MSD)</i>	55
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	56
CAPÍTULO 4. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	69
4.1 CONCLUSÕES	70
4.2 TRABALHOS FUTUROS	71
Referências bibliográficas	72

Índice de figuras

Figura 1. Esquema para as reações, onde S representa o fotossensibilizador no estado fundamental, S* fotossensibilizador no estado excitado, $^3\text{O}_2$ oxigênio tripleto e $^1\text{O}_2$ oxigênio singleto	2
Figura 2. Esquema celular dos tipos de morte celular por necrose (A) e apoptose (B)	5
Figura 3. Estrutura química de diversos fotossensibilizadores: (a) acridina, (b) estrutura básica de uma porfirina, (c) ALA e (d) ftalocianina de zinco.	8
Figura 4. Representação esquemática de um lipossoma	12
Figura 5. Estrutura molecular da dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC)	13
Figura 6. Em (a) a molécula de colesterol (CHOL). Em (b) a molécula de estearato de colesterol (CHOL-éster)	14
Figura 7. Representação esquemática do modelo guarda-chuva	21
Figura 8: Esquema representativo da rotina metodológica utilizada	28
Figura 9. Em azul, a absorvidade molar no visível da ftalocianina de zinco, ZnPc, à $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ em dimetilformamida (DMF) versus comprimento de onda em dimetilformamida. No eixo secundário a irradiância espectral efetiva do equipamento LED600.....	30
Figura 10. Taxa de encapsulação da ftalocianina de zinco nas 4 formulações lipossomais nas proporções 9:1, 7:1 e 5:1 massa/massa DPPC:CHOL	33
Figura 11. Estabilidade das 4 formulações lipossomais com ftalocianina de zinco nas proporções massa/massa 9:1 DPPC/CHOL.....	36
Figura 12. Estabilidade das 4 formulações lipossomais com ftalocianina de zinco nas proporções massa/massa 7:1 DPPC/CHOL.....	36
Figura 13. Estabilidade das 4 formulações lipossomais com ftalocianina de zinco nas proporções massa/massa 5:1 DPPC/CHOL.....	37
Figura 14. Fotohemólise percentual de composições lipossomais de ftalocianina de zinco na ausência (DPPC 150 mg) ou na presença de diferentes proporções massa/massa de fosfolípido/colesterol.....	39

Figura 15. Fotohemólise percentual de composições lipossomais de ftalocianina de zinco na ausência (DPPC 150 mg) ou na presença de diferentes proporções massa/massa de fosfolípido/colesterol-éster.....	40
Figura 16. Fotohemólise percentual de composições lipossomais de ftalocianina de zinco na ausência (DPPC 150 mg) ou na presença de diferentes proporções massa/massa de fosfolípido/colesterol-éster 9:1.....	43
Figura 17. Fotohemólise percentual de composições lipossomais de ftalocianina de zinco na ausência (DPPC 150 mg) ou na presença de diferentes proporções massa/massa de fosfolípido/colesterol-éster 7:1.....	45
Figura 18. Fotohemólise percentual de composições lipossomais de ftalocianina de zinco na ausência (DPPC 150 mg) ou na presença de diferentes proporções massa/massa de fosfolípido/colesterol-éster 5:1.....	46
Figura 19. Fotohemólise percentual de composições lipossomais de ftalocianina de zinco na ausência (DPPC 150 mg) ou na presença de diferentes proporções massa/massa de fosfolípido/colesterol:.....	48
Figura 20. Fotohemólise percentual de composições lipossomais de ftalocianina de zinco na ausência (DPPC 150 mg) ou na presença de diferentes proporções massa/massa de fosfolípido/colesterol-éster.....	49
Figura 21. (a) Representação atomística da configuração inicial do sistema S1 solvente/bicamada/solvente. Perfis de densidade de massa dos diferentes componentes moleculares ao longo do eixo perpendicular à bicamada fosfolípídica no sistema S1 (b) e S2 (c)	57
Figura 22. Representação atomística de fosfolípidos vizinhos no sistema S1 (A) e de fosfolípido vizinho à molécula de colesterol livre no sistema S2 (B).....	58
Figura 23. Média da variação de volume da bicamada fosfolípídica em função do tempo de simulação (ns).....	59
Figura 24. Raiz quadrada da flutuação quadrática média (RMSF/nm) para os átomos de cada sistema proposto, excluindo-se o solvente	60
Figura 25. Difusão lateral (MSD/nm ²) no plano para ZnPC contida cada sistema proposto em função do tempo (ns).....	62
Figura 26. Mapa da distribuição densidade de massa da molécula de ftalocianina de zinco no plano da membrana ao longo de 50 ns de simulação.....	63

Figura 27. Raiz quadrada do desvio quadrático médio (RMSD/nm) para ZnPC contida cada sistema proposto em função do tempo	64
Figura 28. Representação atomística do sistema S2 em que são omitidas as moléculas de solvente e de DPPC.....	65
Figura 29. Representação atomística do sistema S2 em que são omitidas as moléculas de solvente e de DPPC	66
Figura 30. Mapa da distribuição de densidade de massa das 54 moléculas de colesterol no plano da membrana ao longo de 50 ns de simulação.....	67

Índice de tabelas

Tabela 1: Distribuição eletrônica nas moléculas de oxigênio nos estados fundamental ($^3\Sigma_g$) e excitado ($^1\Delta_x$, $^1\Delta_y$, $^1\Sigma_g$).....	3
Tabela 2: Espécies reativas de oxigênio (ERO).....	4
Tabela 3: Características gerais necessárias dos fármacos usados em fotossensibilização	7
Tabela 4: Sobrevida do eritrócito para algumas espécies	17
Tabela 5: DH (nm): Diâmetro hidrodinâmico e Potencial Zeta: Carga (mV)	34

Lista de abreviaturas

ABS - absorção molecular
ALA - ácido 5-aminolevulínico
ATP - trifosfato de adenosina
CHOL - colesterol
CHOL-éster - estearato de colesterol
DCLM - *double cubic lattice method* - método de rede cúbica dupla
 D_{lat} - coeficiente de difusão lateral
DDS - *drug delivery system* - sistema de entrega de fármacos
DH - diâmetro hidrodinâmico
DPPC - dipalmitoilfosfatidilcolina
DSC - *differential scanning calorimetry* - calorimetria de varredura diferencial
ERO - espécies reativas de oxigênio
FDA - *food and drug administration* - Administração de alimentos e fármacos
GSH - glutatona reduzida
GUV – *giant unilamellar vesicles* - vesículas unilamelares gigantes
LD - lipossomas dialisados
LDL - *low density lipoprotein* - lipoproteínas de baixa densidade
LED-600 - sistema de irradiação a base de LED
LND - lipossomas não-dialisados
LUV – *large unilamellar vesicles* - vesículas unilamelares grandes
MD – *molecular dynamics* – dinâmica molecular
MLV – *multilamellar vesicles* - vesículas multilamelares
MVL - *multilamellar vesicles liposomes* - lipossomas de vesículas multilamelares
MSD - *mean square displacement* - deslocamento quadrático médio
NADPH - nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NPT – *normal pressure and temperature* - pressão e temperatura normais
OPLS-AA - *optimized potentials for liquids simulations. all atom* - potencial otimizado para simulações líquidos - todos átomos
RESP - *restrained electrostatic potential* - potencial eletrostático restringido
RMSD – *root mean square deviation* - raiz quadrada do desvio quadrático médio
RMSF - *root mean square fluctuation* - raiz quadrada da flutuação quadrática

média

SAS - superfície acessível a solventes

SUV – *small unilamellar vesicles* - vesículas unilamelares pequenas

TFD - terapia fotodinâmica

ZnPc - ftalocianina de zinco

Introdução

Capítulo 1

1.1 EVENTOS FOTODINÂMICOS

A participação da luz em transformações químicas é observada desde as civilizações mais antigas como no Egito antigo, onde eram utilizados psoralenos para fins medicinais no tratamento de vitiligo há mais de 4000 anos atrás, e também dentre os chineses (EDELSON, 1988). Porém, estes eventos só começaram a ser estudados em uma investigação científica detalhada quando Oscar Raab observou em seus experimentos com o microrganismo *Paramecium*, que a presença da luz era essencial no processo de morte celular quando estas células eram coradas com acridina. Quando Raab corava o paramécio em horários em que a luz do dia era bastante presente, as células morriam, quando os experimentos eram conduzidos em baixa luminosidade, a mortalidade celular era reduzida. Frente a essa conclusão, Raab entendeu que a luz que se fazia presente era o mediador para que a reação acontecesse (RAAB, 1900). Alguns anos depois Tappeiner, o orientado por Raab, em experimentos complementares denominou a reação de corantes com a luz de "efeito fotodinâmico", usando deste termo ao publicar os seus resultados em artigo científico (TAPPEINER e JODLBAUER, 1903).

Desde então, estudos se desenvolveram no intuito de utilizar essa propriedade de compostos fotoativos no combate às doenças diversas, sejam elas causadas por microrganismos, e também em células como tumores. Essa atividade fotodinâmica aplicada às terapias tem como base a junção de 3 fatores para que seja possível ocorrer: uma molécula que seja fotoativa (fotossensibilizador), a presença de luz em comprimento de onda específico e oxigênio molecular. A reação entre essas 3 entidades é descrita abaixo (MACHADO, 2000):

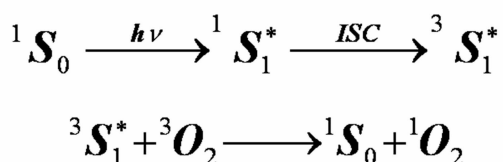


Figura 1. Esquema para as reações, onde S representa o fotossensibilizador no estado fundamental, S* fotossensibilizador no estado excitado, 3O_2 oxigênio tripleto e 1O_2 oxigênio singleto (PERUSSI, 2007).

Nesse processo, a energia na forma luminosa específica é absorvida pelo fotossensibilizador, que em vários casos é um corante, e esta energia faz com que o mesmo seja alçado a um estado de energia excitado, ao retornar deste estado excitado a energia é liberada e transferida para o oxigênio molecular que esteja nas imediações da molécula. Ao receber essa energia o oxigênio molecular sofre uma alteração em seu arranjo eletrônico, mudando do estado tripleto para o estado singleto (MACHADO, 2000).

Na tabela 1 são descritos os orbitais moleculares ligantes e suas respectivas energias, sendo mais comum o surgimento dos estados $^1\Delta_x$ e $^1\Delta_y$, em que os orbitais vazios são rapidamente preenchidos através de uma reação com sítios de moléculas vizinhas, preferindo as regiões moleculares de alta densidade eletrônica (MUEHLMANN et al., 2014).

Tabela 1: Distribuição eletrônica nas moléculas de oxigênio nos estados fundamental ($^3\Sigma_g$) e excitado ($^1\Delta_x$, $^1\Delta_y$, $^1\Sigma_g$) (MACHADO, 2000).

Estado	Orbital molecular antiligante	Energia [†] , kJ mol ⁻¹
$^3\Sigma_g$	$[\uparrow] \pi^*_x [\uparrow] \pi^*_y$	0
$^1\Delta_x$	$[\uparrow\downarrow] \pi^*_x [\] \pi^*_y$	92,4
$^1\Delta_y$	$[\] \pi^*_x [\uparrow\downarrow] \pi^*_y$	92,4
$^1\Sigma_g$	$[\uparrow] \pi^*_x [\downarrow] \pi^*_y$	159,6

[†]relativa ao estado fundamental

O processo descrito acima é entendido como uma fotossensibilização que ocorre através do mecanismo do tipo 2. Na reação do tipo 1, o fotossensibilizador no estado excitado pode gerar íons-radicais que tendem a reagir com o oxigênio no estado fundamental, resultando em produtos oxidados. Na reação do tipo 2, a molécula do fotossensibilizador transfere energia para a molécula de oxigênio, promovendo esta molécula ao estado excitado singleto. Nos eventos de fotossensibilização a ocorrência de reações do tipo 2 são predominantes (JÚNIOR, 2007).

1.1.1 Espécies reativas de oxigênio

O oxigênio molecular pode sofrer redução ocasionando a geração de subprodutos extremamente reativos, chamados de espécies reativas de oxigênio (ERO). As espécies reativas de oxigênio são conhecidas pela sua capacidade de destruir ou prejudicar o bom funcionamento dos tecidos vivos (ADEGOKE et al., 2015). Estas ERO são muito reativas e tendem a oxidar lipídios de membranas celulares, proteínas, esteróis, ácidos nucleicos ou qualquer sítio de densidade eletrônica considerável. As ERO mais recorrentes no meio biológico são o oxigênio singlete, radical superóxido, peróxido de hidrogênio, radical hidroxila, entre outros citados na tabela 2 (RIBEIRO et al., 2005).

Tabela 2: Espécies reativas de oxigênio (ERO).

$O_2^{\cdot-}$	Ânion superóxido ou radical superóxido
HO_2^{\cdot}	Radical perhidroxila
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio
OH^{\cdot}	Radical hidroxila
RO^{\cdot}	Radical alcoxila
ROO^{\cdot}	Radical peroxila
$ROOH$	Hidroperóxido orgânico
1O_2	Oxigênio singlete
RO^{\cdot}	Carbonila excitada

Fonte: (SIES, 1985).

A alta reatividade destes compostos se apresenta devido às suas configurações eletrônicas, devido ao desemparelhamento de elétrons, ou à instabilidade eletrônica de alguns destes compostos. Por este motivo, a utilização do termo “radical livre” não se aplica ao presente contexto, visto que algumas destas espécies não possuem elétrons desemparelhados (FERREIRA et al., 1997).

Em um meio celular, o oxigênio singlete ou qualquer outra destas ERO geradas através de um evento fotodinâmico ocasionarão uma reação de oxidação em biomoléculas, podendo ocasionar injúrias celulares severas. Esses danos dentro de uma célula podem acarretar a sua morte direta, desencadear mecanismos metabólicos de inativação celular ou, até mesmo, alterar estruturas celulares sem necessariamente causar a morte da célula. Todas estas possibilidades estão conectadas a como ocorre a interação entre o fotossensibilizador e a célula-alvo em questão (BACELLAR et al., 2015).

Diversas regiões de uma célula podem ser atingidas pela ação fotodinâmica, sendo a primeira e mais devastadora a região da membrana celular. Quando a membrana celular é o alvo principal da ação do oxigênio singlete ou de seus derivados, é comum que a célula sofra um processo necrótico, em que é caracterizado por extravasamento do conteúdo intracelular. A necrose, quando ocorre em um tecido tratado pelo procedimento fotodinâmico, é marcada por reação inflamatória acentuada e que se mostra bastante agressiva do ponto de vista clínico, com edemas e inchaço na região (BACELLAR et al., 2015).

Outra forma de morte celular ocorre quando a própria célula entra em um processo de morte denominado apoptose (Figura 2). A célula espontaneamente promove uma série de reações de ativação das caspases 3 e 9, que culminam na formação dos chamados corpos apoptóticos, sendo que a membrana celular se divide formando várias vesículas menores que são recolhidas pelo sistema imunológico (ALBERTS et al., 2014). Neste processo não há característica inflamatória pelo fato de não ocorrer vazamento do conteúdo intracelular.

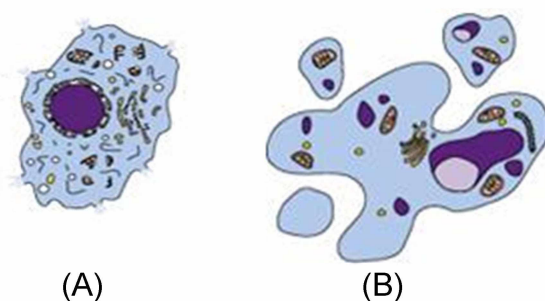


Figura 2. Esquema celular dos tipos de morte celular por necrose (A) e apoptose (B) (adaptado de KERR et al. 1994).

Um dos mecanismos para a promoção de apoptose num evento fotodinâmico, seria a oxidação de mitocôndrias, acarretando o rompimento de suas membranas com o posterior vazamento do conteúdo entre as membranas interna e externa desta organela. Neste sítio das mitocôndrias situam-se uma série de proteínas pró-apoptóticas (citocromo C, por exemplo) que ativam as caspases 3 e 9 e induzem a célula a entrar em um processo de apoptose. Se um número considerável de mitocôndrias sofre injúria, a presença de proteínas pró-apoptóticas no citoplasma induzirá o metabolismo celular a se direcionar para apoptose. Caso o número de mitocôndrias lesadas seja pequeno, a célula pode se recuperar, pois a baixa concentração destas proteínas não é suficiente para induzir apoptose. Se todas as mitocôndrias são atingidas, uma morte se dará por necrose, como citado acima, já que a célula não produzirá energia o suficiente para completar o processo de apoptose (MACDONALD e DOUGHERTY, 2001).

Uma forma de exemplificar a importância dessas 2 modalidades de inviabilização celular seriam as suas aplicações. No caso de um tratamento de infecções, chamado de inativação fotodinâmica, a necrose seria a principal forma de morte celular a ser escolhida, já que as chances de desenvolvimento de resistência celular ao tratamento são praticamente nulas (PERUSSI, 2007). Quando se trata do tratamento de tumores, na terapia fotodinâmica, é importante que o efeito seja menos agressivo a fim de que o paciente não tenha um quadro inflamatório acentuado e perturbativo, mesmo porque o desconforto nos primeiros dias após a sessão de tratamento seria intenso caso a opção do tratamento não seja por mecanismos apoptóticos (BACELLAR et al., 2015).

Ainda que a resposta celular ao tratamento de tumores seja preferencialmente a apoptose, é discutida a possibilidade de que a fotoinviabilização por necrose atue na ativação do sistema imunológico, potencializando a resposta ao tratamento. Com o extravasamento do conteúdo intracelular no processo necrótico, células do sistema imunológico reconhecem proteínas específicas produzidas pelas células tumorais e trabalham em conjunto ao tratamento no combate ao tumor (DENIS et al. 2011).

A resposta celular à fotoxidação é intimamente ligada ao comportamento do fotossensibilizador dentro da célula. Para um maior controle no tratamento e na resposta que se deseja, é possível promover a síntese planejada de um

fotossensibilizador que seja específico em suas interações, ou utilizar um corante que possua comportamento previsto por suas interações intermoleculares.

1.1.2 Fotossensibilizadores

O primeiro composto utilizado nos experimentos de Raab foi a acridina (Figura 3a), porém atualmente há uma infinidade de moléculas que possuem atividade fotodinâmica relatada (MUEHLMANN et al. 2014). Dentre essas moléculas podemos citar os fenotiazínicos, os derivados de porfirinas, as ftalocianinas, as clorinas e também o medicamento mais utilizado comercialmente hoje: ácido 5-aminolevulínico (ALA) (Figura 3b).

Para que uma molécula tenha uma promissora utilização como um fotossensibilizador é preciso que apresente algumas características desejadas, como as apresentadas na tabela 3:

Tabela 3: Características gerais necessárias aos fármacos usados em fotossensibilização:

-
- a) características fotofísicas favoráveis;
 - b) baixa toxicidade no escuro (baixa citotoxicidade);
 - c) fotossensibilidade não prolongada;
 - d) simplicidade na formulação, reprodutibilidade e alta estabilidade;
 - e) farmacocinética favorável (rápida eliminação do corpo);
 - f) facilidade de manuseio sintético que permita efetuar modificações para otimizar as propriedades desejáveis;
 - g) facilidade de obtenção em escala industrial a custos reduzidos;
 - h) facilidade de análise total dos componentes da fórmula, inclusive com fornecimento de roteiros de validação;
 - j) alta afinidade e penetração no tecido.
-

Fonte: (BOWN, 2013):

Dentre as classes de fotossensibilizadores, é possível encontrar corantes catiônicos, corantes extremamente apolares e fármacos tais como o PHOTOFRIN[®], que é uma mistura de derivados de porfirinas (Figura 3c). A

primeira aprovação oficial do uso do PHOTOFRIN[®] ocorreu no Canadá em 1993, para o tratamento profilático de câncer de bexiga. Subsequentemente, aprovações para o uso deste fármaco foram obtidas na Holanda e França, para o tratamento de câncer avançado de esôfago e pulmão. Posteriormente na Alemanha e Japão, utilizou-se este fármaco para o tratamento de câncer de pulmão em estágio inicial e, nos Estados Unidos, para o câncer avançado de esôfago (RADU et al., 2000). Em 1998 a QLT Phototherapeutics de Vancouver (Canadá) recebeu a aprovação da FDA para utilização do PHOTOFRIN[®] no tratamento de câncer inicial de pulmão (DOUGHERTY et al., 1998). O tratamento de tumores no trato digestivo por terapia fotodinâmica utilizando fármacos como o PHOTOFRIN[®] e ALA foi aprovado pelo ministério da saúde japonês desde 1994 (NANASHIMA e NAGAYASU, 2015).

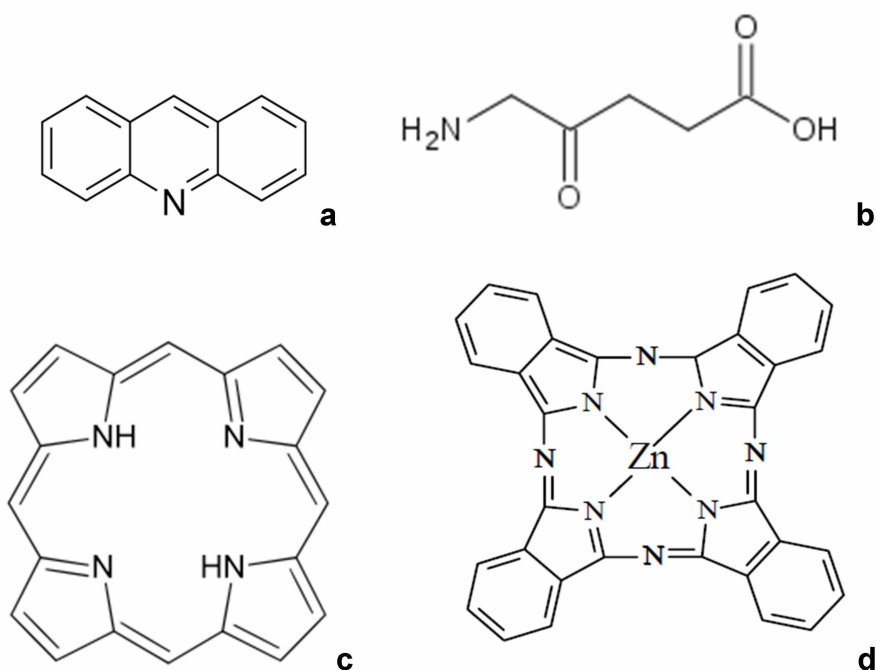


Figura 3. Estrutura química de diversos fotossensibilizadores: (a) acridina, (b) estrutura básica de uma porfirina, (c) ALA e (d) ftalocianina de zinco.

Embora existam várias indicações favoráveis ao uso do PHOTOFRIN[®] na terapia fotodinâmica para a eliminação de certos tumores, este fotossensibilizador possui alguns efeitos colaterais. Fármacos para terapia fotodinâmica utilizados nas décadas de 90 e 2000 eram eliminados do corpo muito lentamente, e isto podendo ocasionar ao paciente fotossensibilidade na pele por um período de 6

semanas após o tratamento, o obrigando a evitar exposição ao sol neste período (KAKUSHIMA e FUJISHIRO, 2008).

Desta forma, as pesquisas foram direcionadas à síntese de outros sensibilizadores, que teriam melhor eficiência de ação citotóxica, associado a menores efeitos colaterais. Tais compostos designados de fotossensibilizadores de segunda geração possuem absorção em comprimento de onda superior a 650nm para reduzir a absorção por componentes teciduais; tenham uma maior habilidade de se concentrar em tumores, bem como possuir uma menor retenção na pele. Destacam-se a obtenção de derivados de porfirinas, como a benzoporfirina, as texafirinas, a temoporfirina (conhecida comercialmente como FOSCAN[®]), as ftalocianinas, as naftalocianinas, corantes catiônicos e outros fármacos (PASZKO et al., 2011).

As ftalocianinas se mostram eficientes por se adequarem bem à janela terapêutica, pois absorvem luz na região de comprimento de onda de maior penetração no tecido humano (entre 650 e 700 nm), sendo também estáveis, não-tóxicas no escuro, e possuírem boa penetrabilidade nas membranas celulares tendendo a se localizar na região interna do tumor (ORMOND e FREEMAN, 2013).

Os fotossensibilizadores de segunda geração apresentam menor toxicidade no escuro que as porfirinas, que são primeira geração, porém a maioria desses agentes fotossensibilizadores é hidrofóbica. Por isso, as ftalocianinas são encapsuladas em sistemas de entrega de fármacos, como os lipossomas (PASZKO et al., 2011).

A ftalocianina de zinco (ZnPc), Figura 3d, apresenta considerável capacidade de gerar oxigênio singleto e facilita o encapsulamento em transportadores, como os lipossomas, por causa da sua hidrofobicidade em meio aquoso. Outra vantagem de sua utilização é que o metal zinco presente na estrutura adequa-se ao comprimento de onda para a fotossensibilização na janela terapêutica (RIBEIRO, 2003, RICCI-JÚNIOR, 2006, OLIVEIRA et al., 2010).

A ação fotodinâmica de certas ftalocianinas em células normais e tumorais tem sido extensivamente estudada, sendo principalmente dependente da localização intracelular do fotossensibilizador, uma consequência direta das suas

características físico-químicas, em particular, o grau de hidrofobicidade (OLIVEIRA et al., 2010).

Atualmente, muitos estudos têm como objetivo o desenvolvimento e experimentação de fotossensibilizadores de terceira geração, sendo um dos principais parâmetros também a eficiência na geração de oxigênio singleto. Dentre esses compostos podemos citar as clorinas e seus análogos, e outros derivados de ftalocianinas (MUEHLMANN et al. 2014). Esses fotossensibilizadores de terceira geração também buscam melhor seletividade para células danosas ao organismo e são desenvolvidos para, também, atuarem na destruição de vasos sanguíneos na região do tumor e aumentar a eficácia do tratamento ao causar hipóxia no tecido e obstruindo o transporte de nutrientes (OLIVO et al., 2010).

Os mecanismos envolvidos na distribuição preferencial dos sensibilizadores nas células tumorais estão relacionados às propriedades intrínsecas destas células. Similarmente a outras células que se dividem rapidamente, estas possuem um elevado número de receptores para LDL para facilitar a captação de colesterol necessário à síntese de membranas. Sabe-se que as lipoproteínas são os principais carreadores de porfirinas lipofílicas na corrente sanguínea, sendo este uma provável forma de entrada destes compostos nas células tumorais (JORI et al., 1984).

Também o alto teor de lipídeos das células tumorais favorece uma distribuição preferencial de sensibilizadores hidrofóbicos (FREITAS e PONTIGGIA, 1990). Outras evidências apontam para a elevada habilidade fagocítica e pinocítica de agregados de porfirinas por células tumorais. Também tem sido demonstrada a participação de macrófagos como elementos do sistema imune, responsáveis pela concentração de fármacos fotossensibilizadores em tumores (ALLEN e CULLIS, 2013).

Sendo assim, em conjunto com o desenvolvimento de fármacos de terceira geração, alternativas para que o fotossensibilizador chegue à região-alvo são também estudadas com o intuito de que a maior dose possível de medicamento alcance o tecido a ser tratado. Os sistemas de entrega de fármacos (*Drug delivery system* - DDS) são uma opção para que a maior parte do fármaco disponibilizado entre em contato com as células-alvo.

1.2 LIPOSSOMAS

Os sistemas de entrega de fármacos têm como objetivo a entrega seletiva de fármacos e princípios ativos diretamente para células e tecidos, principalmente nos casos em que há a dificuldade destes medicamentos em atingir tais localidades. Os exemplos comuns destes sistemas de entrega de fármacos podem ser encontrados em uma área particular da ciência denominada nanomedicina ou tecnologia farmacêutica.

Na nanomedicina podemos observar a aplicação médica da nanotecnologia no diagnóstico e tratamento de doenças humanas. Em geral, as nanopartículas utilizadas nesta modalidade tem tamanho entre 1 e 1000 nm e são vastamente aplicadas dentro da terapia fotodinâmica, sendo este fato justificado na compreensão de que os fotossensibilizadores mais eficientes atualmente são hidrofóbicos e dificilmente atingiriam a região de interesse clínico em uma administração endovenosa (PATZKO et al., 2011). Estudos sobre nanomateriais presentes nesta área, como nanopartículas poliméricas, nanocristais, micelas, dendrímeros, microcápsulas, óxidos metálicos e nanoplateformas de carbono, estão inclusos em uma miríade de artigos (TORCHILIN, 2007, SIBANI et al., 2008, ZHANG et al., 2008, KOZLOWSKA et al., 2009, KATEB et al., 2010).

Dentre estes exemplos podemos citar os lipossomas (Figura 4). Estas vesículas nanométricas, chamadas lipossomas, são estruturas em que os fosfolípidios organizados em bicamadas circundam compartimentos aquosos, sendo essas nanopartículas relativamente pouco imunogênicas e não tóxicas. As bicamadas lipídicas dos lipossomas têm estrutura similar àquelas encontradas nas membranas de células vivas. Devido às propriedades anfipáticas, os lipossomas podem incorporar substâncias no seu compartimento aquoso, na bicamada lipídica ou ainda distribuídas entre estes dois compartimentos (AKBARZADEH et al., 2013). Esta característica torna estas nanopartículas muito versáteis e de longo espectro de aplicação, principalmente no que tange ao transporte de fármacos hidrofóbicos.

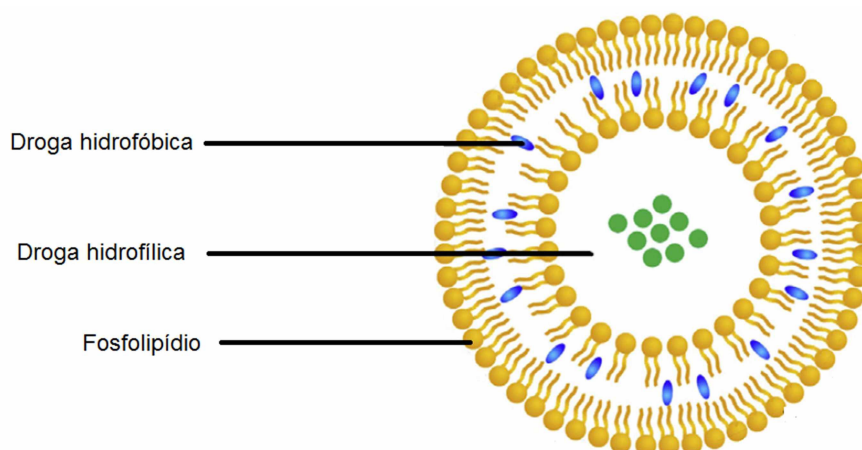


Figura 4. Representação esquemática de um lipossoma (adaptado de ALAVI et al., 2017).

As primeiras experimentações com esta estrutura datam 1965 (BANGHAM et al., 1965). Nesta ocasião, Bangham e seus colaboradores observaram a formação de estruturas concêntricas formadas espontaneamente em meio aquoso, e que poderiam servir como um modelo artificial de membranas. Porém, em pouco tempo, outros pesquisadores puderam vislumbrar a possível aplicação destas nanopartículas como carreadores de fármacos e agentes terapêuticos (GREGORIADIS e RYMAN 1971), comprovando assim, alterações na distribuição de fármacos *in vivo* (KIMELBERG et al., 1976).

Atualmente é possível encontrar diversas técnicas para o preparo de lipossomas, dependendo de sua finalidade ou propriedades. Características como farmacocinética e a capacidade de liberação de fármacos, bem como o tipo de interação lipossoma/célula podem ser determinadas dependendo da metodologia de preparo da nanopartícula utilizada (ALLEN e CULLIS, 2013). O método de preparo pode gerar diferentes estruturas que são classificadas, de forma geral, em:

- Lipossomas multilamelares (MLV – *multilamellar vesicles*): apresentam várias bicamadas lipídicas, podendo o seu diâmetro variar entre 400 e 3500 nm.
- Lipossomas unilamelares grandes (LUV – *large unilamellar vesicles*): são constituídos por apenas uma bicamada, de diâmetro superior a 100 nm.

- Lipossomas unilamelares pequenos (SUV – *small unilamellar vesicles*): apresentam apenas uma bicamada e um pequeno compartimento aquoso, com diâmetro entre 20 e 50 nm.
- Lipossomas unilamelares gigantes (GUV – *giant unilamellar vesicles*): são constituídos por apenas uma membrana, mas com uma cavidade aquosa muito grande, com dimensões superiores a 1 µm, podendo chegar às dezenas de micrometros.
- Lipossomas multivesiculares (MVL - *multilamellar vesicles liposomes*): quando várias estruturas lipossomais se encontram dentro de uma grande vesícula.

Quando há presença de fármacos na porção lipídica da estrutura lipossomal, pode ocorrer a alteração significativa das propriedades dos lipossomas, de maneira que a sua composição necessita ser otimizada para cada fármaco e indicação terapêutica (LASIC, 1997).

Os lipossomas podem ser formados a partir de vários tipos diferentes de fosfolipídios. Porém, a composição mais utilizada é formada por fosfatidilcolina de ovo com ou sem colesterol, e com ou sem lipídeos iônicos, como o ácido fosfatídico (aniônico) e estearilamina (catiônico) (AKBARZADEH et al., 2013).

Os fosfolipídios somente formam lipossomas à temperatura na qual suas cadeias de ácidos graxos são fluídas. A dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), exemplificada na Figura 5, não forma lipossomas à temperatura abaixo de sua temperatura de transição de 41°C. A habilidade dos lipossomas em capturar água e solutos, é estritamente dependente de sua composição química. Lipossomas contendo lipídios com carga positiva não são permeáveis a cátions, enquanto que lipossomas negativamente carregados são permeáveis a cátions (NICHOLLS e MILLER, 1974).

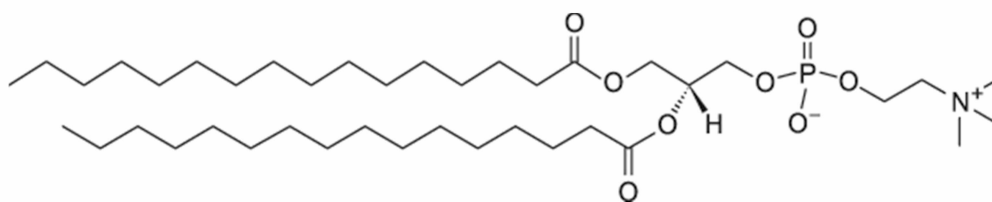


Figura 5. Estrutura molecular da dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC)

A permeabilidade das bicamadas a solutos em geral, depende do grau de saturação e do tamanho das cadeias acíclicas dos fosfolipídios. Um aumento no grau de saturação destas cadeias leva a um aumento nas temperaturas de transição, com diminuição na fluidez das cadeias. Uma diminuição da fluidez das bicamadas lipídicas pode ser conseguida pela adição de colesterol à fosfolipídios de ocorrência natural (SAHOO e LABHASETWAR, 2003). O colesterol é um componente importante das membranas biológicas que possui a capacidade de quebrar as interações de Van der Waals e diminuir o empacotamento das caudas dos fosfolipídios. Este rompimento é o que torna a membrana menos fluida. Consequentemente, um modo da célula controlar a fluidez de sua membrana é regulando seu nível de colesterol (LEHNINGER, 2007).

O colesterol (Figura 6a) não só aumenta a estabilidade mecânica e a rigidez da bicamada como, também, reduz o vazamento de substâncias que são incorporadas nas vesículas. A importância do uso de lipossomas contendo colesterol, como veículos de fármacos, é a sua habilidade em diminuir a permeabilidade da bicamada lipídica a íons e pequenas moléculas polares (PAPAHADJOPOULOS et al., 1973).

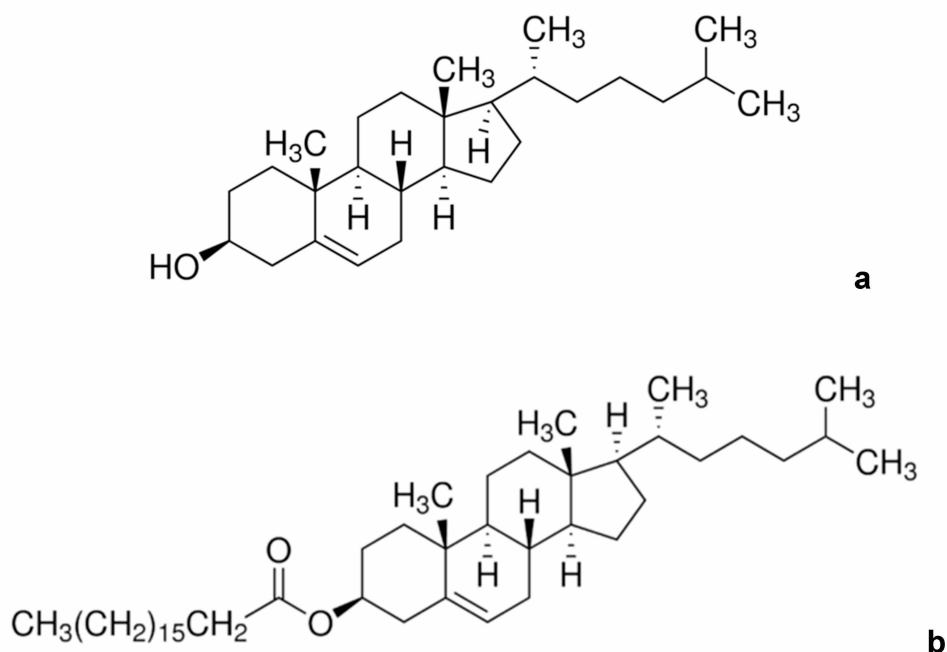


Figura 6. Em (a) a molécula de colesterol (CHOL). Em (b) a molécula de estearato de colesterol (CHOL-éster).

O colesterol em membranas dos lipossomas além de reduzir a permeabilidade da bicamada, proporcionando uma maior resistência à desestabilização de fluídos biológicos, melhora sua estabilidade e aumenta a vida útil da circulação de lipossomas no organismo (CHORILLI et al., 2007). A presença de colesterol nas partículas de lipossomas melhora a sua estabilidade mecânica, evitando a desintegração estrutural no sangue, (OLIVEIRA et al., 2005) e reduz seu diâmetro de 1000 nm para 100 nm (OLIVEIRA et al., 2010).

Nos organismos cujo colesterol faz parte do metabolismo, é possível encontrá-lo tanto na forma livre quanto em sua forma esterificada. A molécula de colesterol possui um grupo cabeça polar, o grupo hidroxila. O resto da molécula é uma estrutura apolar relativamente rígida (LEHNINGER, 2007). Já o colesterol esterificado (Figura 6b) não possui o grupo polar do colesterol livre, já que sua hidroxila encontra-se ocupada pela função éster. Essa diminuição da lipofilicidade acarreta modificações significativas quando a mesma é adicionada como aditivo nas formulações lipossomais (MOSCA et al., 2011).

Quando na estrutura do lipossoma está presente o colesterol em sua forma esterificada, os ésteres de colesterol causam alterações na entalpia de transição de fase da bicamada, quando em comparação ao colesterol livre. Porém, lipossomas contendo estearato de colesterol e colesterol livre possuem comportamentos semelhantes quando submetidos à calorimetria exploratória diferencial (*Differential Scanning Calorimetry* - DSC) (MALCOLMSON et al., 1997). Em lipossomas aditivados com estearato de colesterol, as propriedades biofísicas da bicamada são alteradas e a membrana se torna mais resistente a ataques radiculares em sua estrutura (MOSCA et al., 2011).

Lipossomas convencionais são frequentemente capturados por células do retículo endotelial, como macrófagos ou as células de Kupfer hepáticas, o que limita a destinação destes as células tumorais. Alguns trabalhos têm promovido modificações em lipossomas, incluindo a adição de ácido glicurônico e polietilenoglicol 2000 (LUO et al., 2016). Tais lipossomas possuem maior tempo de circulação na corrente sanguínea permitindo uma acumulação mais efetiva em células tumorais, favorecendo o diagnóstico e tratamento de tumores.

A utilização de vesículas de destinação para a entrega de fotossensibilizadores também foi delineada pela observação de que a afinidade

de fotossensibilizadores por tecidos neoplásicos aumenta com o aumento do seu grau de hidrofobicidade. A distribuição seletiva de fotossensibilizadores é elevada pela sua incorporação em sistemas anfifílicos, tais como vesículas de fosfolipídios ou emulsões de óleos que sejam estáveis em meio aquoso, possuindo um compartimento apolar onde substratos hidrofóbicos possam ser veiculados (OLIVEIRA et al., 2005).

Desta forma, tornou-se atrativa a utilização de lipossomas como veículos de destinação de fotossensibilizadores para a terapia fotodinâmica, o que possibilita o aumento da eficiência e seletividade à célula tumoral, em comparação a sistemas onde fotossensibilizadores são administrados em uma solução aquosa homogênea.

Atualmente, estudos experimentais e computacionais são combinados com a finalidade de compreender qual seria a melhor composição lipossomal para garantir uma interação eficiente entre os sistemas de entrega de fármacos e células-alvo (BUNKER et al., 2016, RAMEZANPOUR et al., 2016).

É importante destacar o uso de modelos celulares para a avaliação da interação com os lipossomas, dentre estes modelos, os eritrócitos se constituem um excelente exemplo para esta finalidade.

1.3 ERITRÓCITOS E FOTOINATIVAÇÃO CELULAR

Os eritrócitos (ou hemácias, ou células vermelhas do sangue) maduros dos mamíferos são células anucleadas, com diâmetro de 7-9 μm e que normalmente circulam na corrente sanguínea por alguns meses, dependendo da espécie animal. Por não possuírem núcleo e nem mitocôndria, não são capazes de fazer síntese protéica, ciclo de Krebs e nem a respiração celular, sendo assim totalmente dependentes da via glicolítica para produção de ATP (energia) e de NADPH (energia na forma de poder redutor) para manutenção dos mecanismos antioxidantes (ALBERTS et al., 2014).

O ATP é necessário para manutenção da forma, deformabilidade, fosforilação de fosfolipídios e proteínas de membrana, transporte ativo de várias moléculas e síntese da glutatona reduzida (GSH). O NADPH mantém a glutatona no estado reduzido, a qual faz parte dos mecanismos naturais de defesa dos

eritrócitos contra os efeitos deletérios de espécies reativas do oxigênio (ERO), geradas durante diversos processos oxidativos do metabolismo celular e corpóreo (ALBERTS et al., 2014).

Já em aves, répteis e peixes, os eritrócitos circulantes contêm um núcleo central que ocupa considerável parte do volume celular, bem como mitocôndrias. Tais organelas são importantes para a determinação da sobrevida destas células, pois além de participarem de vários processos bioquímicos relacionados com a vida das células, fazem parte da maquinaria envolvida em processos de apoptose ou autofagia (KAESTNER et al., 2004).

Atualmente se sabe que a sobrevida do eritrócito varia com a taxa metabólica, que está intimamente ligada à taxa de estresse oxidativo que a célula sofre e que é inversamente proporcional ao tamanho e a longevidade da espécie (tabela 04). A precisão destes relógios biológicos, os quais são constantes dentro de uma mesma espécie, têm levado muitos pesquisadores a identificar os sinais que marcam os eritrócitos como células senescentes, que devem ser removidas da circulação por macrófagos residentes (ALBERTS et al., 2014).

Tabela 4. Sobrevida do eritrócito para algumas espécies (HOFFBRAND, 2013)

Espécie	Sobrevida média (dias)
Sapo	≈ 900
Tartaruga	≈ 700
Vaca	≈ 130
Carneiro	≈ 120
Homem	≈ 120
Cão	≈ 100 a 115
Gato	≈ 73
Camundongo	≈ 43
Galinha	≈ 30

A membrana eritrocitária é essencialmente constituída de lipídeos e proteínas e é um modelo primário para estudo de membrana plasmática celular animal pelo fato de ser desprovida de núcleo e organelas (MURADOR e

DEFFUNE, 2007) e por ser de fácil obtenção em grande número. Em especial, é um modelo para o estudo da atividade fotodinâmica devido ao fato de ser facilmente monitorada pela liberação de hemoglobina para o meio extracelular (KAESTNER et al., 2004).

A utilização de eritrócitos como modelos para o estudo da atividade fotodinâmica de fotossensibilizadores, é bastante empregada, podendo ser facilmente monitorada pela liberação de íons potássio e hemoglobina para o meio extracelular. É relatada na literatura a eficácia de fotossensibilizadores utilizados na terapia fotodinâmica de tumores também em promover a inativação de eritrócitos de diferentes espécies animais, incluindo carneiro, humano, coelho, aves, e outros, sendo estas células modelos adequados para estudos dos mecanismos fisiológicos e moleculares envolvidos na terapia fotodinâmica (OLIVEIRA et al, 2010).

Por outro lado, a terapia fotodinâmica de eritrócitos a serem utilizados em bancos de sangue, visa promover uma eventual eliminação de vírus, bactérias e outros patógenos, minimizando os riscos de contaminação por transfusão de sangue. Entretanto, para esta situação particular, o objetivo primordial é destruir fotodinamicamente os patógenos de interesse, sem comprometimento significativo na sobrevivência e funcionalidade dos eritrócitos. Neste caso, os fotossensibilizadores utilizados para este propósito devem possuir propriedades específicas que permitam uma seletividade dos efeitos oxidativos sobre os patógenos de interesse. Tais propriedades incluem, por exemplo, habilidade em ligar-se à membrana dos patógenos, sofrer interiorização e ligação com ácidos nucleicos, exercendo poucos efeitos adversos sobre os eritrócitos, mesmo quando estes são armazenados no escuro, sob refrigeração (KAESTNER et al., 2003) (PERUSSI, 2007).

1.4 SIMULAÇÕES COMPUTACIONAIS EM MEMBRANAS LIPÍDICAS

Desde o início da década de 90, as bicamadas fosfolipídicas hidratadas passaram a ser investigadas também usando métodos computacionais de modelagem. Comparando-se com métodos experimentais que fornecem informações estruturais e dinâmicas sobre sistemas de grande número de moléculas, e dentro da janela temporal do método experimental, os métodos computacionais, particularmente a simulação de dinâmica molecular (MD), podem ter resolução atômica e extensão de tempo de observação em escala de 10^{-6} s. Observações nesta magnitude de resolução são indispensáveis para obter avanços significativos sobre os mecanismos básicos do funcionamento de membranas (PASENKIEWICZ-GIERULA et al., 2016).

Atualmente, a química computacional se mostra como uma das mais importantes ferramentas na predição e planejamento de novas intervenções, sejam elas no *design* de novos fármacos ou no entendimento de interações de medicamentos com sistemas biológicos (BUNKER et al., 2016).

Neste contexto, a simulação do comportamento de biomembranas lipídicas se mostra uma área promissora, não só por suas aplicações no entendimento de membranas celulares, mas também por sua aplicação a diversos sistemas de entregas de fármacos amplamente utilizados e estudados durante as últimas décadas (RAMEZANPOUR et al., 2016).

O entendimento do comportamento de biomoléculas em membranas é de importância primordial para o desenvolvimento de novas formulações que sejam cada vez mais eficientes na liberação e entrega de fármacos em meios biológicos (ERIKSSON e ERIKSSON, 2014).

Um sistema de entrega de fármacos que tem sido alvo de estudos desde os primeiros avanços em simulações de biomembranas são os lipossomas (PASENKIEWICZ-GIERULA et al., 2016). Os lipossomas são sistemas de membrana relativamente mais simples que as complexas estruturas celulares - em que estão presentes diversas proteínas e ocorre grande variedade de lipídios e açúcares presentes em cada tipo de célula- e o planejamento racional destas estruturas pode ser fundamental na eficiência de sua aplicação clínica. (BUNKER et al., 2016).

Toda a discussão sobre o comportamento de movimentação das moléculas em uma membrana está intrinsecamente ligada ao entendimento dos parâmetros que alteram a fluidez de uma bicamada lipídica. Sem dúvida, o colesterol é o que confere às membranas biológicas dinamismo suficiente para se comportar de forma adaptada em meio a diversas condições de temperatura quando comparamos modelos celulares diferentes (RÓG e VATTULAINEN, 2014).

Recentemente estudos por simulação de dinâmica molecular avaliaram a participação do colesterol e seus derivados na estabilidade e comportamento de membranas lipídicas, principalmente em sua eficácia em acomodar outras moléculas em bicamadas através da ordenação dos fosfolipídios vizinhos (KHAJEH e MODARRESS, 2014, RÓG et al., 2008, 2009, 2014, TIELEMAN, 2009).

Alwarawrah e colaboradores, em 2010, realizaram simulações com diversas concentrações de colesterol, para avaliar o efeito de condensação do colesterol numa bicamada fosfolipídica. Esta análise detalhada revelou que a condensação de bicamada era resultado do empacotamento dos anéis das moléculas de colesterol. Também foi constatado que a área de superfície por fosfolipídio por molécula de colesterol sofreu grandes variações como, por exemplo, a área por colesterol que variou de 0,27 nm² a 0,43 nm² (ALWARAWRAH et al. 2010)

Um dos mecanismos mais discutidos associados aos efeitos de condensação e de ordenação do colesterol é o chamado "modelo guarda-chuva" (HUANG e FEIGENSON, 1999). Nesse modelo, o colesterol, que tem um grupo polar hidroxila muito pequeno, evita a exposição do seu anel hidrofílico à água e formando estruturas compactadas com fosfolipídios. Dai et al. (2010) realizaram simulações de *clusters* pré-formados de colesterol em bicamadas (Figura 7). Eles descobriram que em membranas com alta proporção molar de colesterol, os *clusters* eram instáveis e rapidamente desintegrados. A presença de um grande aglomerado foi associada com numerosas instabilidades e deformações bicamadas, incluindo movimentos de um evento denominado '*flip-flop*' nestas moléculas de colesterol, mas que raramente eram observadas nos estudos de MD (DAI et al., 2010).

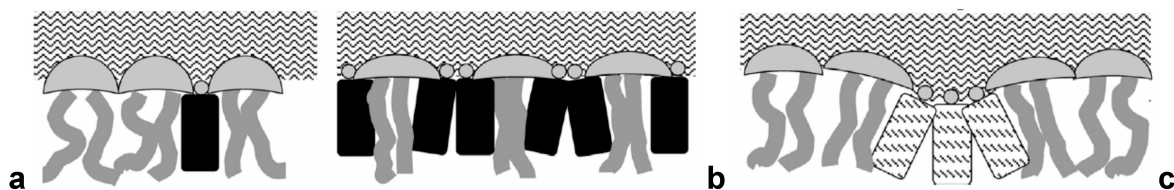


Figura 7. Representação esquemática do modelo guarda-chuva. Em (a) mostra o empacotamento de lipídios de membrana (grupo de cabeça em forma de cogumelo, caudas carbônicas cinzentas) e colesterol (grupo hidroxila é a cabeça circular pequena, corpo quadrado preto) na membrana em concentrações baixas de colesterol. As linhas onduladas indicam a solução aquosa. (b) Em concentrações intermediárias de colesterol, as caudas lipídicas de membrana se condensam, e os grupos de cabeça podem oferecer ao colesterol (seu corpo hidrofóbico) mais proteção contra a solução aquosa. Em (c) mostra o comportamento de aglomeração de moléculas de colesterol. Fonte: (DAI et al., 2010).

O '*flip-flop*' acontece quando um colesterol é capaz de sair de uma região da camada fosfolipídica e migrar para o lado inverso da membrana, como se saísse da região interna para a externa de uma bicamada, e vice-versa (RÓG e VATTULAINEN, 2014).

Devido ao aumento da eficiência dos programas de simulação e ao aumento contínuo da capacidade de computação, há grande demanda por novas ferramentas de análise e muito trabalho está sendo dedicado no entendimento de sistemas moleculares diversos. A comparação de simulações computacionais com estudos experimentais deve ser feita sempre que possível e seja apropriado, levando-se em conta a validade de simulações moleculares e o valor agregado resultante da junção de experimentos com simulações.

Caracterização e fotobiologia de ftalocianinas de zinco lipossomais

Capítulo 2

2.1 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

2.1.1 Justificativa

Diversos estudos relatam sobre o aumento na encapsulação de fotossensibilizadores e na eficiência fotodinâmica de corantes lipossomais quando adicionados aditivos como colesterol e seus análogos nestas formulações (FRANÇA, 2008, OLIVEIRA et al., 2010, KERDOUS et al., 2011, PASZKO et al., 2011).

Este estudo se pauta na necessidade de compreender como o colesterol e seus derivados podem interferir em um processo fotodinâmico induzido por um fotossensibilizador lipossolúvel, através da entrega de fármacos que potencialize esta atividade fotodinâmica.

2.1.2 Objetivo geral

O objetivo principal foi a investigação dos efeitos fotodinâmicos de ftalocianinas lipossomais sobre eritrócitos de carneiro, avaliando a participação do colesterol livre e colesterol esterificado no processo fotodinâmico *in vitro*.

2.1.3 Objetivos específicos

- Estudo da estabilidade, carga, tamanho e taxa de encapsulação das ftalocianinas lipossomais;
- Estudo da formulação lipossomal utilizada: efeitos do colesterol livre e esterificado na atividade fotodinâmica;
- Estudo da fluência de luz sobre a mortalidade celular por inativação fotodinâmica.

2.2 METODOLOGIA

2.2.1 Materiais e reagentes

A ftalocianina de zinco de grau analítico foi obtida da Aldrich Chemical Co. O colesterol (CHOL), estearato de colesterol (CHOL-ÉSTER), difosfatidilcolina (DPPC) e dimetilformamida, também em grau analítico, foram obtidos da Aldrich Chemical Co.

As irradiações e controles foram feitos em placas de acrílico de 6 poços para teste em eritrócitos de carneiro. As medidas de concentrações de hemoglobina e os espectros de absorção dos compostos estudados foram feitos através de um espectrofotômetro HACH DR-4000U.

2.2.2 Preparo de soluções

A solução salina foi utilizada para manter a isotonicidade (0,9%) no preparo de soluções que seriam posteriormente misturadas às suspensões de eritrócito. Na solução salina, ou comumente chamada de soro fisiológico, foram pesadas 8,5-9,0 g de cloreto de sódio (NaCl) e dissolvidos em 1000 mL de água destilada. A solução de Alsever's foi utilizada para o armazenamento dos eritrócitos, sendo um meio isotônico, anticoagulante e contendo suprimento energético para mantê-los vivo. Para a solução de Alsever's, foram pesadas 4,2 g de NaCl, 8,0 g de citrato trissódico e 20,5 g de glicose, e dissolvidos em 1000 mL de água destilada. O pH desta solução foi corrigido para 6,1 utilizando uma solução de ácido cítrico $0,5 \text{ mol L}^{-1}$.

Uma solução estoque 1 mmol L^{-1} de ftalocianina de zinco, ZnPC, foi feita em dimetilformamida e conservada sob refrigeração até o momento de uso.

2.2.3 Produção dos lipossomas

Lipossomas unilamelares (LUV) foram produzidos pelo método de injeção etanólica, como descrito em experimentações prévias. Uma solução etanólica de lipídeos contendo a ftalocianina foi rapidamente injetada, por meio de uma seringa hipodérmica (insulina) de 1 mL, em 10 mL de solução salina, mantida a 50-60 °C

e sob agitação. A composição da solução etanólica variou de acordo com a natureza do teste, sendo também adicionado colesterol livre e colesterol esterificado (estearato de colesterol). O excesso de etanol e de ftalocianina não incorporada aos lipossomas foi removido por 2 diálises de 1 hora em solução salina. Em trabalhos anteriores demonstrou-se que este procedimento produz lipossomas de diâmetro uniforme contendo 80-90% do fotossensibilizador incorporado na bicamada lipossomal. A concentração final do fotossensibilizador é de $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ e as suspensões foram acondicionadas sob resfriamento à 4°C , protegidas da luz, até o momento de sua utilização, sem adição de nenhum componente extra para sua conservação (OLIVEIRA, 2005).

As composições lipossomais utilizadas são descritas a seguir:

- Apenas DPPC:

Sem colesterol - DPPC 150 mg

- 9:1 (m/m) DPPC/CHOL:

A - DPPC 135 mg/ CHOL 15 mg

B - DPPC 135 mg/ CHOL 10 mg/ CHOL-éster 5 mg

C - DPPC 135 mg/ CHOL 5 mg/ CHOL-éster 10 mg

D - DPPC 135 mg/ CHOL-éster 15 mg

- 7:1 (m/m) DPPC/CHOL:

A - DPPC 131,25 mg/ CHOL 18,75 mg

B - DPPC 131,25 mg/ CHOL 12,5 mg/ CHOL-éster 6,25 mg

C - DPPC 131,25 mg/ CHOL 6,25 mg/ CHOL-éster 12,5 mg

D - DPPC 131, 25 mg/ CHOL-éster 18,75 mg

- 5:1 (m/m) DPPC/CHOL:

A - DPPC 125 mg/ CHOL 25 mg

B - DPPC 125 mg/ CHOL 16,67 mg/ CHOL-éster 8,33 mg

C - DPPC 125 mg/ CHOL 8,33 mg/ CHOL-éster 16,67 mg

D - DPPC 12 5mg/ CHOL-éster 25 mg

2.2.4 Preparo das suspensões de hemácias

Eritrócitos de carneiro foram obtidos de um biotério da Universidade Federal de Uberlândia, através de punção venosa, utilizando solução de *A/sever's* como anticoagulante e preservante da integridade dos eritrócitos. O sangue obtido foi conservado sob refrigeração a 4° C e utilizado num prazo máximo de 24 horas. Os eritrócitos foram separados do plasma e dos glóbulos brancos (presentes no concentrado superficial), por centrifugação a aproximadamente 2000 x g por 10 minutos. O concentrado eritrocitário obtido foi ressuspense em solução salina (NaCl 0,15 mol L⁻¹) e centrifugado novamente por igual período. O processo foi repetido 2 a 4 vezes até obtenção de um sobrenadante límpido, sem evidências visuais da presença de hemoglobina.

A partir de uma suspensão inicial a 8% em solução salina, foi obtida uma suspensão final a 0,4%, que ficou armazenada sob refrigeração até o momento de sua utilização, em no máximo 2 horas. A utilização desta concentração celular foi determinada em trabalhos anteriores (FRANÇA, 2008)

2.2.5 Determinação da eficiência de encapsulação

A taxa de encapsulação foi determinada através de espectroscopia eletrônica de absorção molecular (ABS) na região do visível no pico máximo de absorção do fármaco encapsulado. A membrana dos lipossomas foi rompida com etanol e foi realizada a leitura em espectrofotômetro de absorção molecular (668 nm) dos lipossomas não dialisados (LND) e dos lipossomas dialisados (LD). A taxa de encapsulamento foi calculada através da seguinte equação:

$$\% \text{encap.} = (\text{ABS}_{\text{LD}} / \text{ABS}_{\text{LND}}) * 100$$

2.2.6 Caracterização dos lipossomas

Os lipossomas foram caracterizados através de seu diâmetro hidrodinâmico das formulações, o índice de polidispersão e o potencial zeta. As medidas foram feitas utilizando-se o analisador de partículas e moléculas Zetasizer Nano ZS.

2.2.7 Estudo da estabilidade lipossomal

O estudo da estabilidade dos lipossomas foi feito para verificar as propriedades físico-químicas dos mesmos, garantindo a eficiência terapêutica em função do tempo.

As diferentes composições de lipossomas foram armazenadas sob refrigeração a 4 °C durante 45 dias, sendo que periodicamente (15, 30 e 45 dias) pequenas amostras eram retiradas e verificadas sua absorbância utilizando o espectrofotômetro HACH DR-4000U, em comprimento de onda de 410nm.

2.2.8 Estudo da atividade fotodinâmica

As suspensões de eritrócitos de carneiro foram incubadas, com igual volume (1 mL) de lipossomas, por um período de tempo fixo de 20 minutos em estufa de cultura mantida a 37 °C, e na ausência de luz (FRANÇA, 2008).

A irradiação das células foi conduzida pelo LED-600 (Figura 8a). O LED-600 é um equipamento de irradiação desenvolvido em trabalhos anteriores do grupo de pesquisa. Constitui-se de um arranjo 600 diodos emissores de luz de alto brilho na cor vermelha e com emissão no comprimento de onda 650 nm aproximadamente (PAULA, 2010). Este equipamento possui diversas opções para fluência de luz, pois é composto por diversas plataformas, o que garante que o usuário possa escolher a quantidade de luz adequada a atingir a amostra. As placas foram irradiadas em 3 fluências diferentes (fluências de 14,58 mW cm⁻², 4,44 mW cm⁻² e 2,09 mW cm⁻²), a fins de comparação, em um período fixo de 20 minutos (FRANÇA, 2008).

Após o tempo de irradiação no LED-600 as células foram removidas para tubos plásticos de 15 mL de centrífuga e centrifugadas (2000 x g por 10 minutos). Os sobrenadantes foram coletados e submetidos à análise espectrofotométrica de absorção.

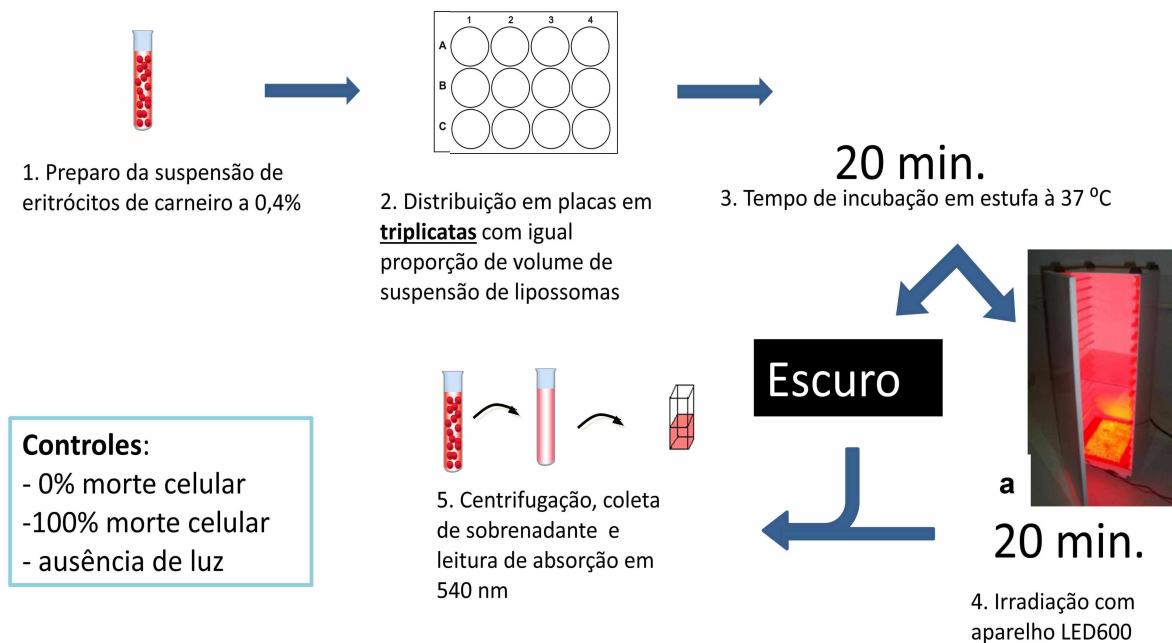


Figura 8: Esquema representativo da rotina metodológica utilizada.

Quando uma hemácia sofre lise (hemólise), libera para o meio extracelular seu conteúdo interno, que também é rico em hemoglobina. Quanto maior o número de hemácias que sofre lise, maior será a concentração de hemoglobina no sobrenadante. A dosagem foi feita por espectrofotometria, baseando-se na determinação da concentração de hemoglobina presente no sobrenadante. A hemoglobina absorve em comprimentos de onda compreendidos entre 520-550 nm, sendo seu pico em 540 nm. As análises foram feitas baseando-se no pico de absorção da hemoglobina, 540 nm, em espectrofotômetro HACH DR-4000U (NAOUM, 2004).

Controles adequados foram feitos com suspensão de eritrócitos incubados com o fotossensibilizador lipossomal no escuro, mas irradiados nas mesmas condições descritas anteriormente. Sendo assim, um controle com 100% de morte celular, com suspensão em água destilada, e um controle com 0% de morte celular, com suspensão em salina, foram estabelecidos para critérios de comparação. A taxa de morte celular foi dada pela equação abaixo, sendo o resultado dado em percentagem de morte celular ou fotohemólise.

$$\% \text{Hemólise} = \frac{(\text{abs amostra} - \text{abs } 0\%) \times 100}{\text{abs } 100\%}$$

Também foram feitos controles no escuro, suspensão de hemácias mais fotossensibilizador lipossomal, para todos os experimentos, como forma de comprovar que a mortalidade celular se dá por conta da presença de luz em conjunto ao fármaco.

Quanto à avaliação de fotohemólise induzida pelos lipossomas, é importante citar que existe uma dada mortalidade celular causada pela manipulação da suspensão celular, a qual é dada o nome neste trabalho de 'abs 0%'. Esta é uma referência que serve como linha base para a quantidade de células que são rompidas por diversos fatores, tais como: choques mecânicos e osmóticos, pipetagem brusca, oxidação de proteínas etc. Para que estas células hemolisadas não indiquem um falso positivo, uma média da absorção hemolítica realizada em triplicata é feita com células submetidas ao mesmo tratamento de dissolução e transferências de tubos e subtraída de todas as leituras nos valores de absorção indicados pelos gráficos neste trabalho.

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.3.1 Irradiância espectral efetiva

As ftalocianinas são conhecidas por terem um destacado rendimento quântico, acompanhado de uma boa geração de oxigênio singlete quando aplicadas à fotoinativação de células, além de estarem dentro da janela terapêutica (absorvem entre 650 nm e 700 nm). Sendo assim, foram escolhidas para este trabalho por seu potencial de aplicação em tumores e em patógenos de interesse clínico (OLIVEIRA et al, 2010).

No espectro de absorção no visível (Figura 9) a ftalocianina de zinco tem alta absorção na região do vermelho (600–730 nm), tendo o seu pico próximo à 670 (banda Q). Devido a essa característica, o sistema de irradiação foi o LED-600 para utilização na fotossensibilização, pois este dispositivo irradia em um comprimento de onda entre 600-660 nm (PAULA, 2010).

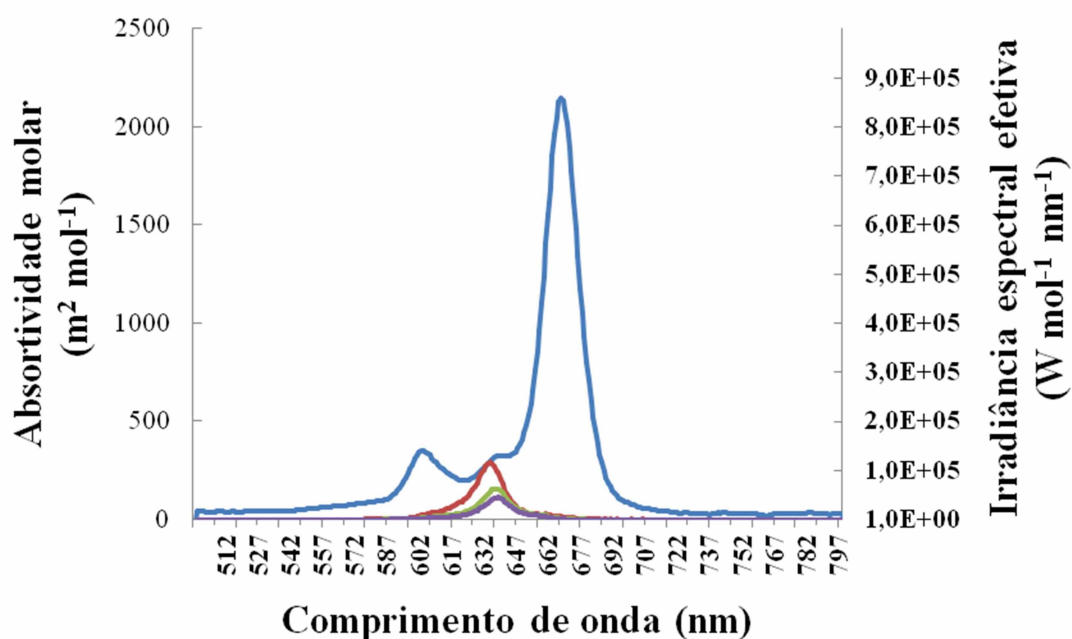


Figura 9. Em azul, a absortividade molar no visível da ftalocianina de zinco, ZnPc, à $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ em N,N-dimetilformamida (DMF) versus comprimento de onda em nanômetros. No eixo secundário a irradiância espectral efetiva do equipamento LED600 em 3 diferentes fluências luminosas utilizadas nos experimentos propostos: $17,50 \text{ J s}^{-1}$ (vermelho), $5,33 \text{ J s}^{-1}$ (verde) e $2,51 \text{ J s}^{-1}$ (lilás).

No gráfico é possível observar 3 valores para a irradiância espectral efetiva do equipamento de irradiação utilizado. Estes dados podem ser calculados a partir do espectro de irradiação do conjunto de LED em 3 diferentes distâncias da placa irradiada para a fonte de luz (MENEZES, 2017). Primeiramente foram verificados os valores de irradiância para as diferentes distâncias, da mais próxima à mais distante: $14,58 \text{ mW cm}^{-2}$, $4,44 \text{ mW cm}^{-2}$ e $2,09 \text{ mW cm}^{-2}$. A partir destes valores foi possível calcular a dose luminosa incidente sobre as amostras por um período de 20 minutos: $17,50 \text{ J s}^{-1}$, $5,33 \text{ J s}^{-1}$ e $2,51 \text{ J s}^{-1}$. As doses luminosas calculadas foram aplicadas nos experimentos de fotohemólise para a avaliação de diversas composições lipossomais. Porém, é importante destacar que apesar da variação entre as distâncias propostas ser de apenas de alguns centímetros, a fluência luminosa é influenciada de forma considerável.

Os LED utilizados conseguem excitar a ftalocianina de zinco com eficácia, mesmo não incidindo a luz no comprimento de onda em que se situa o pico de absorção do corante utilizado. Este fato pode ser comprovado pela eficiência fotodinâmica dos sistemas lipossomais que será discutida posteriormente em 4.5. Porém, ainda é possível que a utilização das composições lipossomais, alinhada à um sistema de irradiação ainda mais adequado, potencialize a atividade fotodinâmica avaliada.

Para dar prosseguimento a este estudo, devido à hidrofobicidade do fotossensibilizador utilizado, lipossomas com proporções diferentes de fosfolípidios e colesterol livre e/ou estearato de colesterol foram desenvolvidos.

2.3.2 Taxa de encapsulação dos fotossensibilizadores

O preparo dos lipossomas por injeção etanólica foi baseado em estudos anteriores desenvolvidos no próprio grupo de pesquisa, e se trata de uma metodologia rápida e eficiente, que dispensa o uso de extrusores ou sonificadores. Uma das principais características da metodologia é formar lipossomas com pequena variação em tamanho e com boa taxa de encapsulação (OLIVEIRA et al., 2005).

A determinação da taxa de encapsulação é importante, pois avalia a quantidade de fármaco encapsulado nos lipossomas, sendo determinante na avaliação dos resultados citotóxicos.

A taxa de encapsulação do fotossensibilizador nos lipossomas é determinada pela dissolução total do mesmo em um solvente adequado, neste caso etanol, e a concentração encapsulada é calculada pela razão entre as concentrações do fotossensibilizador total e livre. As concentrações podem ser obtidas por espectrofotometria por absorção no comprimento de onda específico de absorção do fotossensibilizador proposto, no caso da ftalocianina de zinco utilizada, 668 nm.

Foram analisadas as taxas de encapsulação do corante em lipossomas nas proporções em massa/massa 9:1, 7:1 e 5:1 de DPPC/CHOL, sendo que em cada proporção variou-se a quantidade de colesterol e estearato de colesterol, partindo desde formulações contendo apenas um dos tipos de colesterol, bem como utilizando-se da mistura das duas substâncias.

Na Figura 10 é possível observar a taxa de encapsulação da ftalocianina de zinco em 5 formulações lipossomais (sem colesterol, A, B, C e D) dentro das 3 proporções DPPC/CHOL propostas.

Neste gráfico, observa-se que em concentrações baixas de colesterol ou estearato de colesterol como nas proporções 9:1, a quantidade de aditivo é baixa e não favorece a encapsulação do fármaco, sendo estes valores de encapsulação próximos aos encontrados na formulação sem aditivo. Sendo assim, a baixa concentração de aditivo não é diferencial em acomodar o fármaco na bicamada fosfolipídica.

Para os lipossomas aditivados com quantidade maior de colesterol livre e esterificado, os valores apresentam maiores taxas de encapsulação. O colesterol deixa o lipossoma com fluidez adequada e estável (MARQUARDT et al., 2016), o que favorece a acomodação da ftalocianina de zinco em sua bicamada.

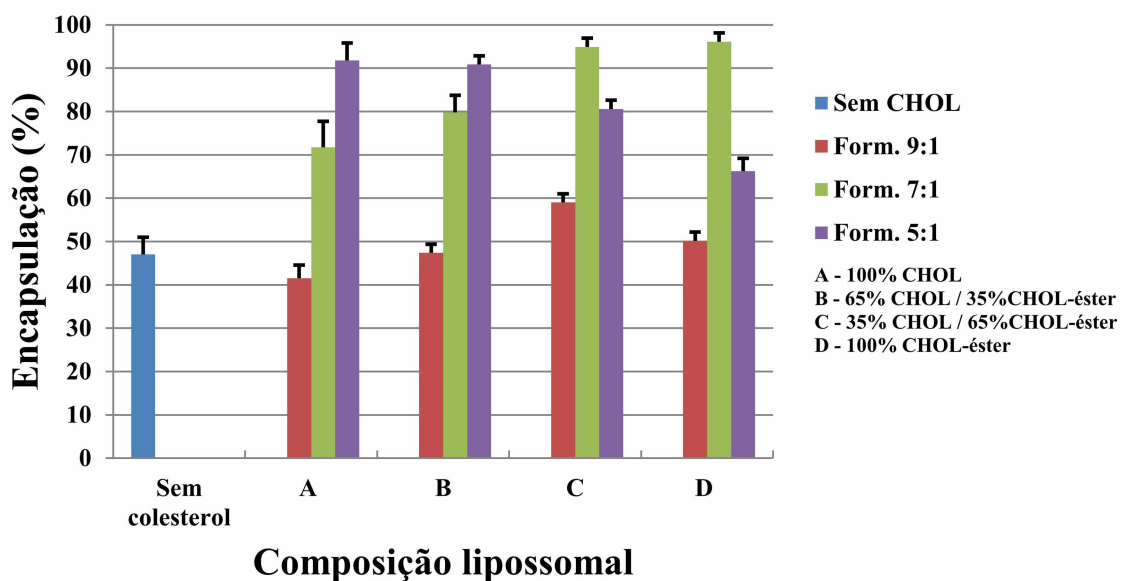


Figura 10. Taxa de encapsulação da ftalocianina de zinco nas 5 composições lipossomais nas proporções 9:1, 7:1 e 5:1 DPPC:CHOL na sequência: vermelho, verde e lilás, respectivamente. Em azul a formulação contendo apenas DPPC. (n=3).

Na proporção de maior quantidade de colesterol (5:1), com o aumento da quantidade de colesterol esterificado é possível observar que o aumento da concentração desta estrutura na membrana diminui a eficiência de encapsulamento. A presença deste tipo de molécula torna a membrana rígida em comparação aos lipossomas com colesterol livre (MOSCA et al., 2011), permitindo menor alocação de moléculas grandes como a ftalocianina dentre as bicamadas lipídicas. Porém, quando reduzimos a concentração de estearato de colesterol na estrutura (7:1), ela passa outra vez a ter fluidez suficiente para comportar a molécula de ftalocianina de zinco em sua estrutura, encapsulando até mesmo com maior eficiência o fármaco.

É importante comentar que as proporções molares dentro das composições lipossomais propostas não são similares, mesmo que a proporção massa:massa seja a mesma, a massa molecular do estearato de colesterol ($653,12 \text{ g mol}^{-1}$) é significativamente maior que a do colesterol livre ($386,65 \text{ g mol}^{-1}$). Equiparando-se as proporções molares, seria difícil promover uma comparação entre as formulações, já que há na estrutura do estearato de colesterol uma longa cadeia

de 18 carbonos substituinte à hidroxila e que ocupa um volume molecular muito grande. Estas diferenças estruturais podem ser responsáveis por alterações estruturais no tamanho e carga destes lipossomas e que serão discutidas no próximo experimento.

2.3.3 Caracterização dos lipossomas

Para a caracterização dos lipossomas utilizados, foi feita a análise do diâmetro hidrodinâmico e o potencial zeta para as formulações lipossomais propostas relacionadas na tabela a seguir:

Tabela 5: Diâmetro hidrodinâmico (DH/nm) e Potencial Zeta (mV) de formulações lipossomais aditivadas com colesterol ou estearato de colesterol, ZnPC ou apenas contendo DPPC:

Formulações	DH (nm)	Potencial Zeta (mV)
DPPC	158.4	-0.678
DPPC + ZnPc	154.2	-0.214
9:1 DPPC/CHOL + ZnPc	196.9	-3.86
7:1 DPPC/CHOL + ZnPc	208.4	-6.24
5:1 DPPC/CHOL + ZnPc	311.6	-19.3
9:1 DPPC/CHOL-éster + ZnPc	819.7	-2.71
7:1 DPPC/CHOL-éster + ZnPc	1643.0	-1.13
5:1 DPPC/CHOL-éster + ZnPc	509.4	-8.46

Os resultados da Tabela 5 mostram que os lipossomas seguem o padrão de tamanho encontrado na literatura para os lipossomas unilamelares grandes (LUV) e também em consonância com experimentos realizados pelo próprio laboratório (OLIVEIRA et al., 2005, FRANÇA. 2008), sempre se mantendo em um tamanho apreciável para a sua aplicação em células. Podemos considerar as partículas abaixo de 1000 nm as mais viáveis para aplicação.

Quando a opção de aditivo adicionado ao lipossoma é o colesterol em sua forma livre, os valores de diâmetro hidrodinâmico são menores comparando-se aos valores dos lipossomas contendo o colesterol na forma esterificada. O colesterol livre possui um grupo hidroxila que interage com a parte polar dos fosfolípidios, fazendo com que sua orientação seja paralela em conjunto com as

moléculas de DPPC vizinhas. Quando este grupo -OH se encontra convertido a forma de éster, provavelmente a molécula se aloja na porção lipídica da bicamada, ficando sem localização fixa. Este comportamento explica a diferença entre os perfis de fluidez das nanopartículas, bem como a diferença entre seus tamanhos, já que a grande cadeia lipídica do estearato de colesterol contribui efetivamente para o aumento do domínio lipídico da nanopartícula. O colesterol livre forma uma membrana melhor organizada, menos fluida e mais bem estabilizada que o estearato de colesterol, favorecendo estruturas de tamanho menor (RÓG et al., 2009).

Outro parâmetro importante a ser citado é a carga de superfície encontrada nos lipossomas. Podemos afirmar que as cargas encontradas nas formulações lipossomais analisadas seguem o padrão para formulações que têm como base o DPPC em que a ocorrência de carga negativa é preponderante entre as amostras (VONARBOURG et al., 2006). A utilização de lipossomas com carga negativa ou positiva depende de qual será a célula-alvo, ou se o objetivo da substância carregada é ser reconhecida ou não pelo sistema imunológico. Nanopartículas com carga positiva se comportam melhor como partículas de longo tempo circulação em organismos (QI et al., 2016). Lipossomas com carga negativa se mostram excelentes sistemas de entrega de fármacos no tratamento contra bactérias (LI et al., 2016).

A presença de carga na superfície da membrana, seja positiva ou negativa, também tem sua importância ao prevenir que as partículas formem agregados, aumentando a estabilidade das vesículas em meio aquoso (RAMEZANPOUR et al., 2016). Esta estabilidade é verificada no próximo tópico abordado nesta discussão.

2.3.4 Estabilidade lipossomal

Foram feitos testes de estabilidade com formulações lipossomas propostas. As Figuras 11, 12, e 13 apresentam a estabilidade da vesícula através das absorbâncias em 410 nm das amostras de lipossomas, com ftalocianina de zinco, nas formulações massa/massa 9:1, 7:1 e 5:1 (DPPC:CHOL), respectivamente, em função do tempo e armazenados sob refrigeração (4 °C) por 45 dias.

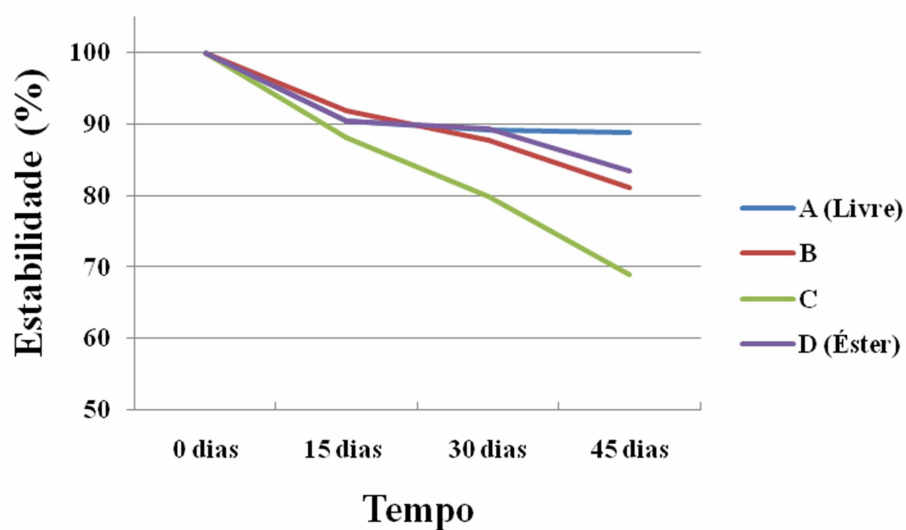


Figura 11. Estabilidade das 4 formulações lipossomais com ftalocianina de zinco nas proporções massa/massa 9:1 DPPC/CHOL. As composições lipossomais com ftalocianina de zinco são: A (DPPC 135 mg/ CHOL 15 mg), B (DPPC 135 mg/ CHOL 10 mg/ CHOL-éster 5 mg), C (DPPC 135 mg/ CHOL 5 mg/ CHOL-éster 10 mg) e D (DPPC 135 mg/ CHOL-éster 15 mg).

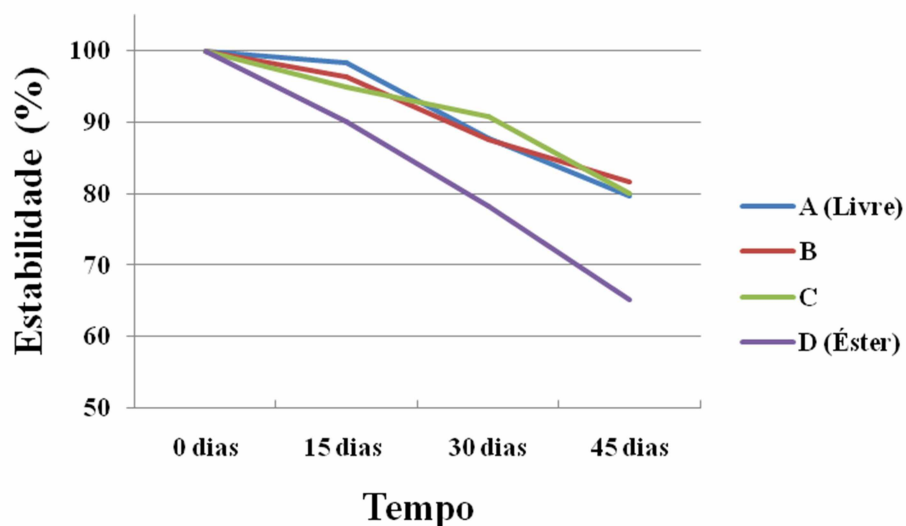


Figura 12. Estabilidade das 4 formulações lipossomais com ftalocianina de zinco nas proporções massa/massa 7:1 DPPC/CHOL. As composições lipossomais com ftalocianina de zinco são: A (DPPC 131,25 mg/ CHOL 18,75 mg), B (DPPC 131,25 mg/ CHOL 12,5 mg/ CHOL-éster 6,25 mg), C (DPPC 131,25 mg/ CHOL 6,25 mg/ CHOL-éster 12,5 mg) e D (DPPC 131, 25 mg/ CHOL-éster 18,75 mg).

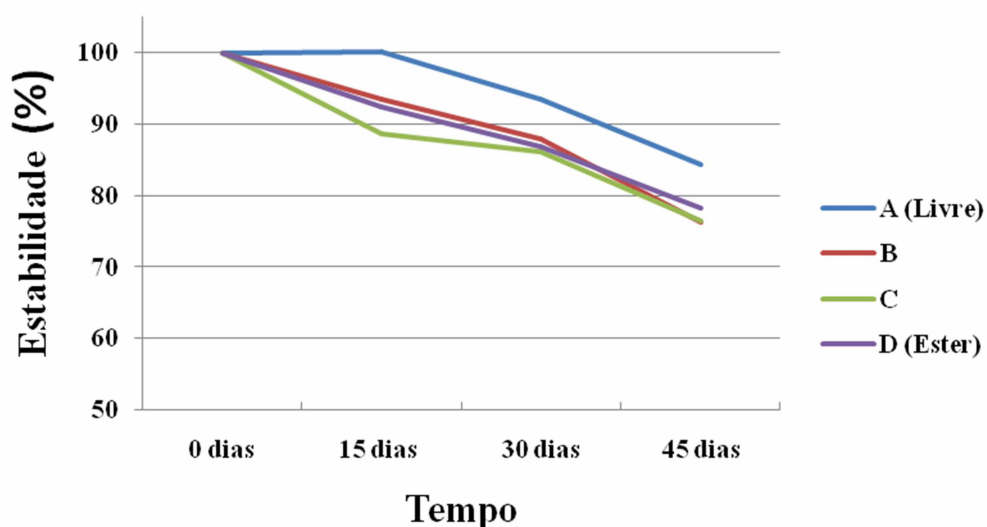


Figura 13. Estabilidade das 4 formulações lipossomais com ftalocianina de zinco nas proporções massa/massa 5:1 DPPC/CHOL. As composições lipossomais com ftalocianina de zinco são: A (DPPC 125 mg/ CHOL 25 mg), B (DPPC 125 mg/ CHOL 16,67 mg/ CHOL-éster 8,33 mg), C (DPPC 125 mg/ CHOL 8,33 mg/ CHOL-éster 16,67 mg) e D (DPPC 125 mg/ CHOL-éster 25 mg).

Com o passar do tempo, os lipossomas perdem sua estabilidade, liberando o fármaco para o meio e se degradam. Um dos principais motivos para que isto aconteça é a atividade de autodegradação intermediada pelos fotossensibilizadores. Mesmo a amostra sendo protegida o máximo possível da exposição à luz, nos pequenos intervalos de tempo em que alguma luminosidade atinja a amostra, a produção de oxigênio singlete acontece, oxidando o corante e as estruturas ao seu entorno, como o colesterol (MACHADO, 2000). Estes produtos da oxidação do colesterol desestabilizam a membrana lipossomal, causando a ruptura da mesma (KERDOUS et al., 2011, KULIG et al., 2016).

Sendo assim, quanto maiores as proporções de colesterol, menos estáveis as membranas serão com o passar do tempo, o que está de acordo com os gráficos apresentados, já que os valores de melhor estabilidade são verificados nas proporções 9:1 e as formulações menos estáveis são as de proporção 5:1. Os lipossomas na proporção 9:1, em geral, mantiveram suas formulações com integridade entre 80% e 90%, o que torna esta formulação lipossomal bastante

estável. No caso das formulações com maior quantidade de colesterol, a estabilidade se deu com valores abaixo de 80%.

Os resultados também indicam que os lipossomas aditivados totalmente ou parcialmente com estearato de colesterol apresentam uma piora na estabilidade frente às outras formulações. Isso provavelmente está ligado à acomodação do fármaco na bicamada, já que o colesterol esterificado se encontra completamente imerso na mesma, aumentando o domínio lipídico e o diâmetro da partícula e conseqüentemente, tornando-a mais instável. Este comportamento de aprisionamento de moléculas feito por colesterol e seus derivados em função de seu perfil apolar ou polar é bem descrito inclusive por métodos de modelagem molecular (OLSEN et al., 2012, WILKOSZ et al., 2017).

A presença de colesterol nas formulações de lipossomas adequando a fluidez das bicamadas fosfolipídicas, reduz a permeabilidade e o torna mais estável em fluídos biológicos (KULIG et al., 2015). Este comportamento confere a estes lipossomas aditivados uma interessante biocompatibilidade para a sua utilização como sistemas de entregas de fármacos para células-alvo, sendo este assunto o tema abordado a seguir.

2.3.5 Atividade fotodinâmica de ZnPc lipossomal

O sucesso e a efetividade de um evento fotodinâmico mediado por lipossomas dependem de vários fatores como aditivos, fluência da luz, e também a polaridade, concentração e rendimento quântico do fotossensibilizador, dentre outros (BACELLAR et al., 2015). Um dos motivos que determina a escolha destas condições utilizadas é qual célula-alvo se deseja inviabilizar.

As células escolhidas para este trabalho foram os eritrócitos de carneiro, por sua facilidade de manuseio, baixo risco biológico, a desnecessidade do uso de meios de cultura caros, semelhanças com a membrana de células-alvo de importância clínica e também pela sua imediata avaliação de mortalidade celular (OLIVEIRA et al., 2010).

Escolhidos a célula-alvo e a fonte luminosa, experimentos utilizando as formulações lipossomais desenvolvidas foram realizados. O primeiro teste é descrito na Figura 14 a seguir e mostra a fotohemólise de eritrócitos de carneiro

quando irradiados juntamente com lipossomas aditivados com ZnPC e colesterol livre (CHOL).

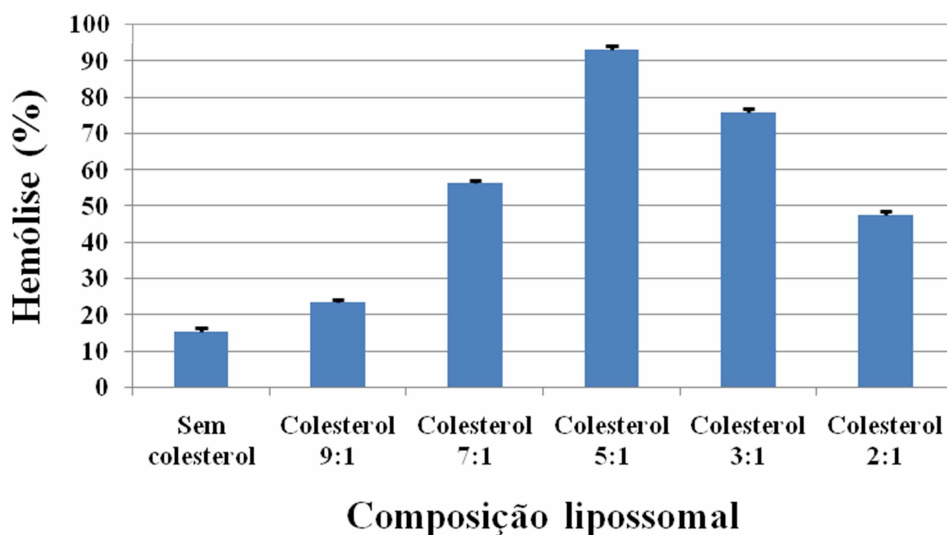


Figura 14. Fotohemólise percentual de composições lipossomais de ftalocianina de zinco na ausência (DPPC 150 mg) ou na presença de diferentes proporções massa/massa de fosfolípido/colesterol: 9:1 (DPPC 135 mg/ CHOL 15 mg), 7:1 (DPPC 131,25 mg/ CHOL 18,75 mg), 5:1 (DPPC 125 mg/ CHOL 25 mg), 3:1 (DPPC 113 mg/ CHOL 38 mg) e 2:1 (DPPC 100 mg/ CHOL 50 mg). Os controles de escuro foram subtraídos em todos os valores no gráfico. Dose luminosa: $17,50 \text{ J s}^{-1}$. (n=3).

O colesterol livre possui um grupo -OH que interage com a porção polar das moléculas de fosfolípídios, tornando a membrana menos fluida e mais estável (RÓG et al., 2009). Esta boa estabilidade mecânica ajuda na incorporação de lipossomas nas membranas de células-alvo e aumenta a quantidade de fármaco admitido para dentro das células, principalmente através de mecanismos de endocitose (RAMEZANPOUR et al., 2016).

Sob outra ótica, a orientação do colesterol livre em paralelo com os fosfolípídios da membrana induz a moléculas com comportamento apolar similar a se orientarem na mesma posição (OLSEN et al., 2012). Este posicionamento provavelmente permite que a ftalocianina de zinco seja transferida mais facilmente para as hemácias, já que se localiza mais próxima ao meio aquoso que

quando no interior da bicamada lipídica, como no caso proposto para os lipossomas contendo estearato de colesterol e com resultados mostrados Figura 15.

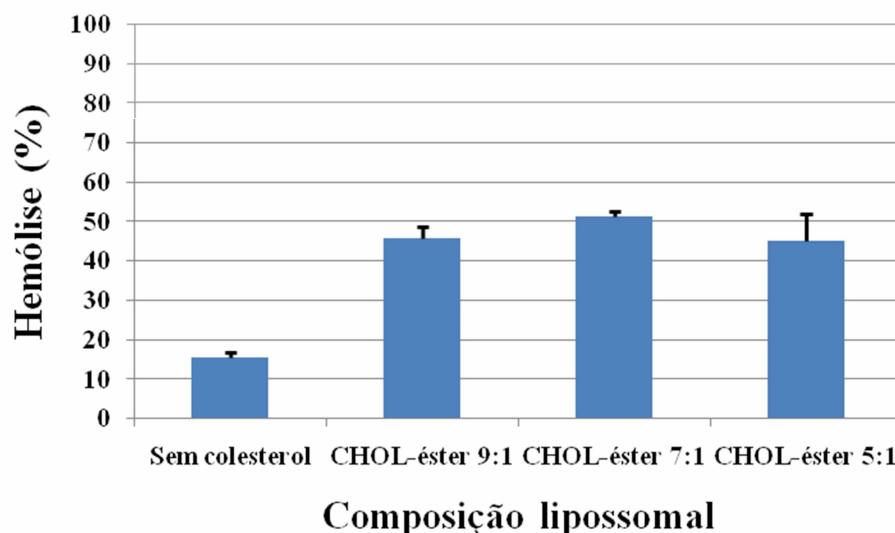


Figura 15. Fotohemólise percentual de composições lipossomais de ftalocianina de zinco na ausência (DPPC 150 mg) ou na presença de diferentes proporções massa/massa de fosfolipídio/colesterol-éster: 9:1 (DPPC 135 mg/ CHOL-éster 15 mg), 7:1 (DPPC 131,25 mg/ CHOL-éster 18,75 mg), 5:1 (DPPC 125 mg/ CHOL-éster 25 mg). Os controles de escuro foram subtraídos em todos os valores no gráfico. Dose luminosa: $17,50 \text{ J s}^{-1}$. (n=3).

O colesterol esterificado, seguindo a lógica inversa aos sistemas lipossomais com colesterol livre, estaria distribuído na porção mais interna da bicamada fosfolipídica, consequentemente aprisionando o corante nesta região. A presença de estearato de colesterol no interior da bicamada a torna um meio ainda mais apolar e congestionado espacialmente, restando à ftalocianina de zinco, que não consegue alojar a sua grande estrutura neste entremeio, ocupar os espaços mais internos na organização dos fosfolipídios. Este tipo de interação entre grupos apolares e polares de moléculas hidrofóbicas e a sua disposição espacial em membranas é objeto de estudo de trabalhos de modelagem molecular que buscam entender o comportamento destas moléculas em sistemas biológicos (RAMEZANPOUR et al., 2016, WILKOSZ et al., 2017)

A posição do fármaco na membrana é fundamental para a eficiência fotodinâmica, pois até mesmo a distância percorrida pelo oxigênio singleto, antes de reagir, pode ser um diferencial neste processo. É conhecido que o raio de atuação e o tempo de vida do oxigênio singleto são muito curtos, sendo assim, quanto mais próximo o fotossensibilizador estiver de seu alvo, mais eficiente será o processo fotodinâmico (PAULA, 2010).

Neste contexto, é importante ressaltar que a presença do colesterol e/ou do colesterol esterificado muda as características de mobilidade de moléculas dentro da bicamada (MARQUARDT et al., 2016). Quando diferentes formulações são comparadas, espera-se que para cada uma delas exista uma proporção em que melhor o fármaco se acomoda no interior da membrana. Adicionalmente, é preciso levar em consideração que ao variarmos tanto a proporção DPPC:CHOL, bem como a composição entre colesterol livre e esterificado, o comportamento do efeito fotodinâmico seja bastante diversificado, já que a mobilidade do fármaco em cada formulação lipossomal será dependente de como os fosfolipídios se compactarão e em como o colesterol ou estearato de colesterol estarão distribuídos na vesícula (MANNOCK et al., 2010, MARTINEZ-SEARA et al., 2010).

Traçando um comparativo entre os 2 experimentos explicitados é notável que, as melhores formulações lipossomais são a que possuem a proporção massa/massa 5:1 DPPC:CHOL. Embora pareça lógico que tanto maior a quantidade de colesterol, livre ou esterificado, melhor fosse a atividade fotodinâmica das partículas lipossomais, esta afirmação não se garante como verdadeira, visto que as proporções lipossomais 3:1 e 2:1 no caso do colesterol livre não possuem uma apreciável fotohemólise. É interessante ressaltar que não foi possível desenvolver tais formulações lipossomais utilizando o estearato de colesterol, pois a baixa solubilidade do mesmo em etanol a quente não permite a adequada injeção da solução etanólica eficiente. Problemas como o entupimento da seringa durante o procedimento de síntese lipossomal e altos desvios nos valores obtidos na fotohemólise tornaram a utilização destes resultados inviável.

Porém, é importante explicitar os resultados das proporções lipossomais com colesterol livre (3:1 e 2:1) não utilizadas no experimentos posteriores para

mostrar que esta concentração exacerbada de colesterol não garante uma boa eficiência para a fotoinativação celular.

Como discutido acerca da estabilidade dos lipossomas, o oxigênio singlete é uma espécie reativa de oxigênio de vida muito curta e com alta tendência a reagir com estruturas em seu entorno que possuam duplas ligações, como neste caso, o colesterol (KERDOUS et al., 2011). Estes produtos da oxidação do colesterol desestabilizam a membrana, podendo causar a sua degradação mesmo antes de alguma interação com o meio celular (KULIG et al., 2015, KULIG et al., 2016). Sendo assim, uma alta incidência de moléculas com insaturações nas imediações do fotossensibilizador gera produtos oxidados que nem sempre terão valor terapêutico caso não estejam próximas de uma célula-alvo (OLSEN et al., 2012).

Porém, uma quantidade adequada de colesterol, seja livre ou esterificado, se mostra interessante nestas formulações, pois favorece a entrega do fármaco às células-alvo, ainda que parte das espécies reativas de oxigênio sejam suprimidas pelas estruturas químicas no entorno do fotossensibilizador. Este fato é indicado pelos resultados da Figura 14, em que a eficiência fotodinâmica do sistema lipossomal 9:1 quase se equipara ao sistema lipossomal que não possui o aditivo colesterol. Em seguida, nota-se que há reduzido aporte do fármaco à célula-alvo também na proporção 7:1, em relação à 5:1.

As formulações lipossomais de colesterol livre (CHOL) de proporções inferiores do aditivo no meio lipídico, além possuírem diminuta encapsulação do fármaco frente aos lipossomas mais ricos em colesterol, também têm a sua estabilidade mecânica prejudicada (OLIVEIRA et al. 2005, SODT et al. 2014). Esta diminuição da taxa de encapsulação não é interessante, pois a relação em massa-lipossomal/fármaco torna os lipossomas pouco eficientes no tratamento, sendo necessário o uso de uma grande quantidade de lipossomas para atingir a dose correta do medicamento a ser ministrado (FRANÇA, 2008).

No intuito de compreender melhor a eficiência fotodinâmica das formulações lipossomais quando na presença de colesterol livre e esterificado, foram propostas experimentações em que houvesse a mistura das duas estruturas em diferentes proporções. Desta forma, seria possível entender melhor a contribuição de cada um deles para a eficiência fotodinâmica.

Estes testes foram divididos nas 3 séries de proporção massa/massa: 9:1, 7:1 e 5:1. Porém, em cada gráfico é possível observar a ausência de colesterol, a presença de colesterol livre e de estearato de colesterol, e mais outras 2 misturas entre os dois tipos de colesterol. As proporções das massas pesadas para as formulações lipossomais estão detalhadas na legenda dos gráficos, sendo o primeiro da série, a seguir, a Figura 16 que detalha a fotohemólise para a proporção massa/massa 9:1.

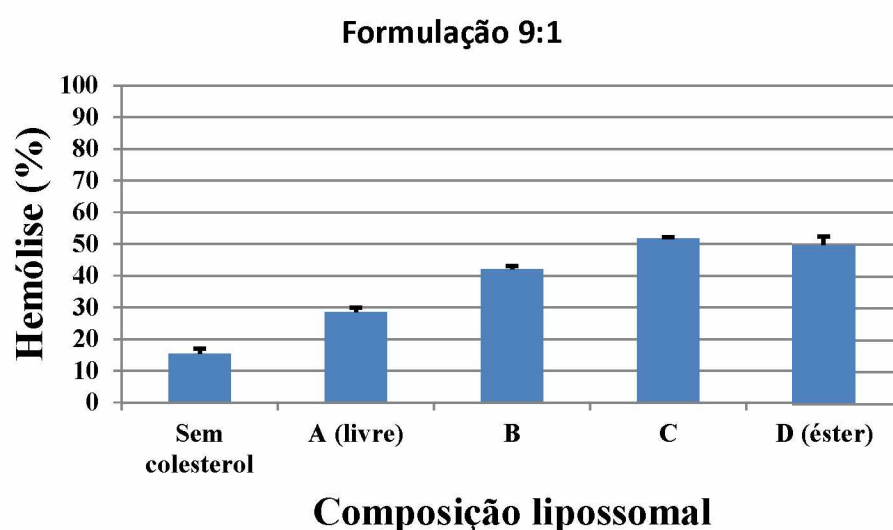


Figura 16. Fotohemólise percentual de composições lipossomais de ftalocianina de zinco na ausência (DPPC 150 mg) ou na presença de diferentes proporções massa/massa de fosfolípido/colesterol-éster 9:1 (DPPC:CHOL): A - Livre (DPPC 135 mg/ CHOL 15 mg), B (DPPC 135 mg/ CHOL 10 mg/ CHOL-éster 5 mg), C (DPPC 135 mg/ CHOL 5 mg/ CHOL-éster 10 mg) e D - Éster (DPPC 135 mg/ CHOL-éster 15 mg). Os controles de escuro foram subtraídos em todos os valores no gráfico. Dose luminosa: $17,50 \text{ J s}^{-1}$. (n=3).

Em baixas concentrações não é possível observar alterações que sejam muito significativas para comparar as diferentes formulações. Porém, um dos pontos importantes a se discutir é que com o aumento da quantidade de estearato de colesterol no meio lipídico, há um leve favorecimento para a fotohemólise. A eficiência fotodinâmica maior, para este caso, pode ser melhor entendida levando-se em consideração que a contribuição do estearato de colesterol para a

estabilidade da estrutura é maior, já que esta molécula possui uma longa cauda lipídica de 18 carbonos.

Um estudo mostra que alterações no grupamento -OH da molécula de colesterol afeta parâmetros como estabilidade da membrana, área por fosfolípido, densidade da membrana, orientação e movimentação do colesterol e seus derivados na membrana e também ângulos torcionais na cabeça polar dos fosfolípidos em relação à suas cadeias lipídicas (RÓG et al., 2009). Porém, nenhum estudo aprofundado sobre a contribuição de moléculas esterificadas de colesterol para membranas fosfolipídicas foi realizado ainda.

Na Figura 17 são apresentados os resultados para a fotohemólise da composição lipossomal sem colesterol e também de massa/massa 7:1 de 2 diferentes misturas entre colesterol livre e estearato de colesterol, bem como formulações que contenham apenas um dos aditivos.

Estes resultados indicam que as formulações mais eficientes desta série são aquelas em que ocorre a mistura dos dois aditivos (C e D), mostrando que há contribuição das duas estruturas na estabilidade da membrana e também para o aporte do fármaco à célula. Mas é importante citar que, em geral, os valores para taxa de mortalidade encontradas nesta série de experimentos 7:1 foram maiores que as taxas obtidas na série 9:1, mostrando que o aumento da quantidade de colesterol, livre ou esterificado, acarretou em uma tendência de aumento de fotohemólise.

Mesmo diante de tais evidências, mais estudos e experimentações detalhadas são necessários para compreender aprofundadamente a contribuição de cada uma das estruturas de colesterol para as propriedades apresentadas pelos lipossomas.

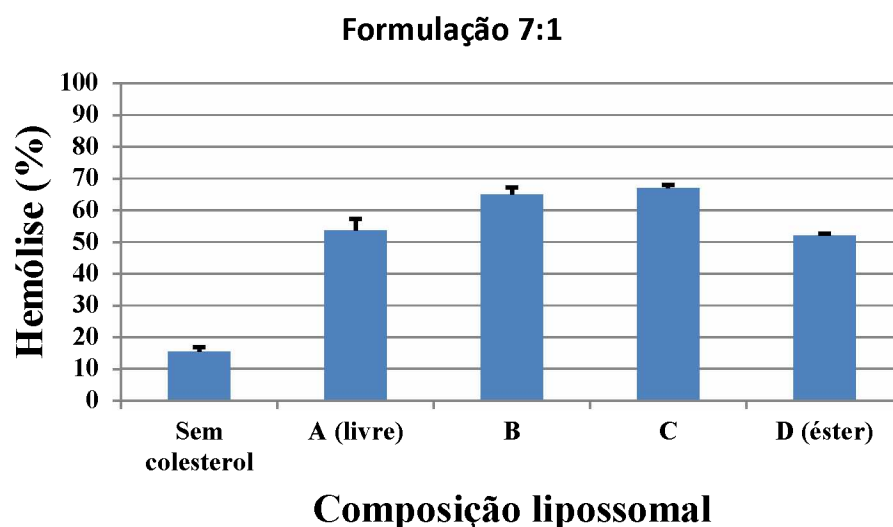


Figura 17. Fotohemólise percentual de composições lipossomais de ftalocianina de zinco na ausência (DPPC 150 mg) ou na presença de diferentes proporções massa/massa de fosfolípido/colesterol-éster 7:1 (DPPC:CHOL): Livre (DPPC 131,25 mg/ CHOL 18,75 mg), B (DPPC 131,25 mg/ CHOL 12,5 mg/ CHOL-éster 6,25 mg), C (DPPC 131,25 mg/ CHOL 9,375 mg/ CHOL-éster 9,375 mg) D (DPPC 131,25 mg/ CHOL 6,25 mg/ CHOL-éster 12,5 mg) e Éster (DPPC 131, 25 mg/ CHOL-éster 18,75 mg). Os controles de escuro foram subtraídos em todos os valores no gráfico. Dose luminosa: $17,50 \text{ J s}^{-1}$. (n=3).

Com o aumento da quantidade de colesterol nas estruturas estudadas, o perfil de fotohemólise também foi alterado de forma a favorecer à fotohemólise causada pelas formulações ricas em colesterol na forma livre. Estes resultados são apresentados na Figura 18, em que são relacionadas as formulações lipossomais na série massa/massa 5:1 em quantidades exclusivas de colesterol livre e esterificado, 2 misturas destas substâncias, bem como a formulação lipossomal contendo apenas DPPC.

É possível notar com clareza neste experimento que em maiores concentrações de colesterol livre (A) na membrana fosfolipídica, a taxa de mortalidade celular supera qualquer outro experimento de fotohemólise proposto neste trabalho, mesmo quando ainda misturado com pequenas proporções de estearato de colesterol (B).

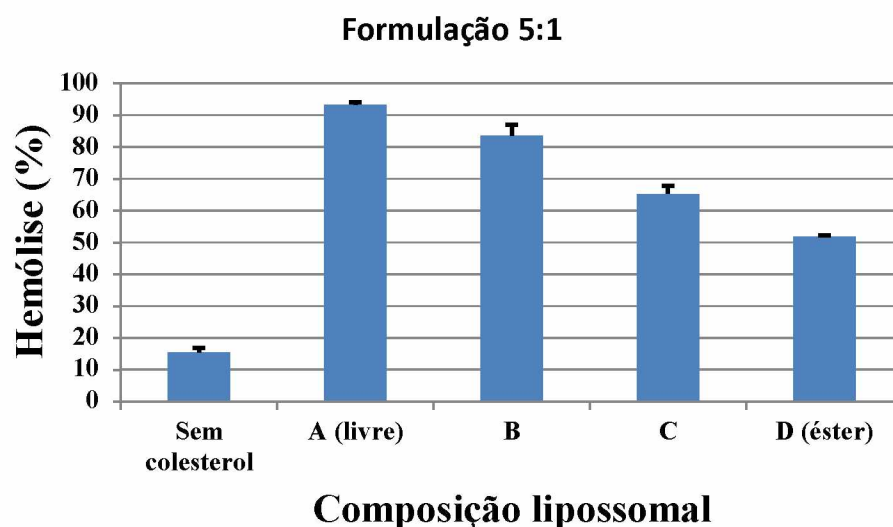


Figura 18. Fotohemólise percentual de composições lipossomais de ftalocianina de zinco na ausência (DPPC 150 mg) ou na presença de diferentes proporções massa/massa de fosfolípido/colesterol-éster 5:1 (DPPC:CHOL): Livre (DPPC 125 mg/ CHOL 25 mg), B (DPPC 125 mg/ CHOL 16,67 mg/ CHOL-éster 8,33 mg), C (DPPC 125 mg/ CHOL 8,33 mg/ CHOL-éster 16,67 mg) e Éster (DPPC 125 mg/ CHOL-éster 25 mg). Os controles de escuro foram subtraídos em todos os valores no gráfico. Dose luminosa: $17,50 \text{ J s}^{-1}$. (n=3).

Como discutido em diversas ocasiões neste trabalho, é inegável concluir que a participação do colesterol em sua forma livre neste sistema lipossomal contribui para que a membrana da vesícula seja tanto resistente mecanicamente, quanto possua maior afinidade com membranas celulares, facilitando a entrega do fármaco. Ainda assim, é interessante ressaltar que um trabalho recente demonstra que membranas aditivas com colesterol livre, em específico, são capazes de se organizar de forma tal em que seja possível uma orientação estérica de um fármaco, mantendo-o numa posição dentro da bicamada em que a sua liberação seja facilitada (WILKOSZ et al., 2017).

Consta nas próximas discussões desta tese, experimentos que confirmem como o colesterol livre pode contribuir para uma melhor entrega da ftalocianina de zinco, porém com uma abordagem computacional a nível molecular, em que serão tratadas estas características discutidas na parte experimental procedida em meio *in vitro*.

2.3.6 Influência da irradiância na atividade fotodinâmica de ZnPc lipossomal

A fonte de irradiação utilizada frente a fotoinativação celular é um importante componente a ser avaliado por serem diversas as variáveis envolvidas em sua utilização. Comprimento de onda adequado, intensidade luminosa e temperatura do sistema devem ser ajustados para uma melhor eficiência fotodinâmica.

O sistema de irradiação utilizado foi o LED600, um aparelho com 600 diodos de luz, que irradia em um comprimento de onda de 650 nm. Este equipamento possui peculiaridades muito interessantes para o procedimento proposto, pois irradia em faixa de comprimentos de onda bem restrita e ao contrário de outros equipamentos baseados em lâmpadas halógenas, não aquece a amostra na região do comprimento de onda do infravermelho. Além de possuir um invólucro metálico que protege a amostra da interferência da luz externa, ainda permite que a amostra fique a diversas distâncias da fonte luminosa, podendo-se avaliar a fluência luminosa que atinge a amostra. Sua fonte energética também permite a regulação de corrente que passa no circuito da placa de LED, o que permite uma boa precisão na dosagem de luz que o equipamento emite.

A fotoinativação celular para as diferentes formulações lipossomais de ftalocianina de zinco, aditivadas com colesterol livre nas proporções em massa/massa 9:1, 7:1 e 5:1 de DPPC:CHOL foram avaliadas em três fluências diferentes, como mostra a Figura 19.

A variação da fluência de luz no experimento com as formulações lipossomais contendo colesterol livre se mostrou diferencial para a eficiência da inativação fotodinâmica dos eritrócitos, principalmente na proporção 5:1. Os maiores valores para a fotohemólise das células são observados para as duas maiores fluências luminosas. Este fato pode ser explicado não só pela maior taxa de encapsulação das formulações que possuam a maior quantidade de colesterol, mas também pela disponibilidade do fármaco em ser fotossensibilizado (WILKOSZ et al., 2017).

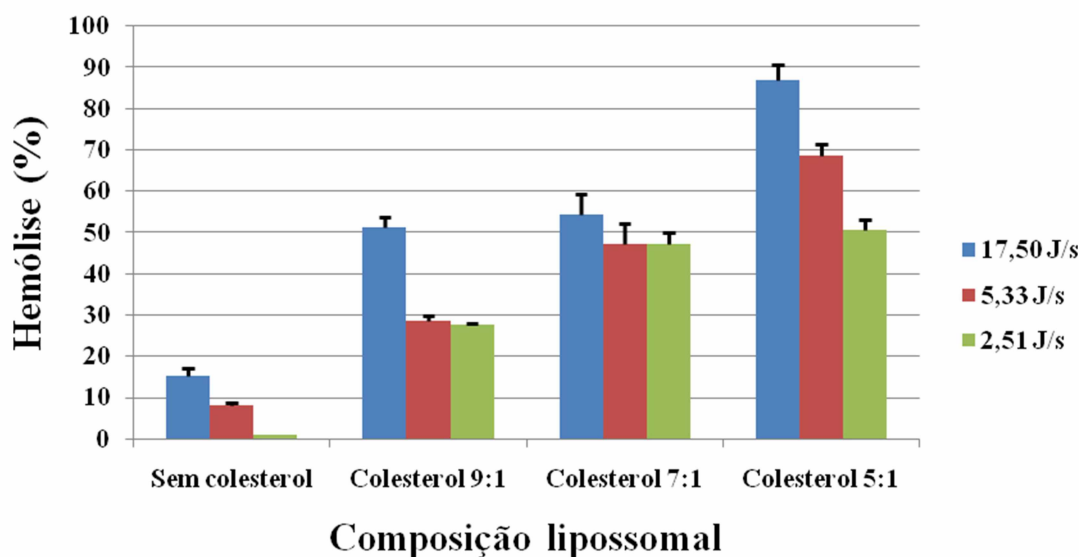


Figura 19. Fotohemólise percentual de composições lipossomais de ftalocianina de zinco na ausência (DPPC 150 mg) ou na presença de diferentes proporções massa/massa de fosfolípido/colesterol: 9:1 (DPPC 135 mg/ CHOL 15 mg), 7:1 (DPPC 131,25 mg/ CHOL 18,75 mg) e 5:1 (DPPC 125 mg/ CHOL 25 mg). Em cada uma das sequências azul, vermelho e verde representam as doses luminosas $17,50 \text{ J s}^{-1}$, $5,33 \text{ J s}^{-1}$ e $2,51 \text{ J s}^{-1}$, respectivamente, no equipamento de irradiação LED600. Os controles de escuro foram subtraídos em todos os valores no gráfico. (n=3).

Avaliando-se a fotoinativação celular para diferentes formulações lipossomais de ftalocianina de zinco, aditivadas com estearato de colesterol, os resultados da Figura 20 mostram as proporções em massa/massa 9:1, 7:1 e 5:1 de DPPC:CHOL-éster em três fluências diferentes.

Antes de qualquer discussão acerca da fotohemólise causada por estas formulações lipossomais, é importante citar que os lipossomas utilizados nestes experimentos apresentaram citotoxicidade mesmo no escuro. Para que pudéssemos avaliar apenas a fototoxicidade, estes valores foram subtraídos nos valores finais da taxa de mortalidade celular explicitada na Figura 20. A explicação para tal fato não pôde ser investigada a fundo, sendo necessário um experimento específico para a determinação da citotoxicidade do estearato de colesterol para hemácias de mamíferos e outros modelos celulares.

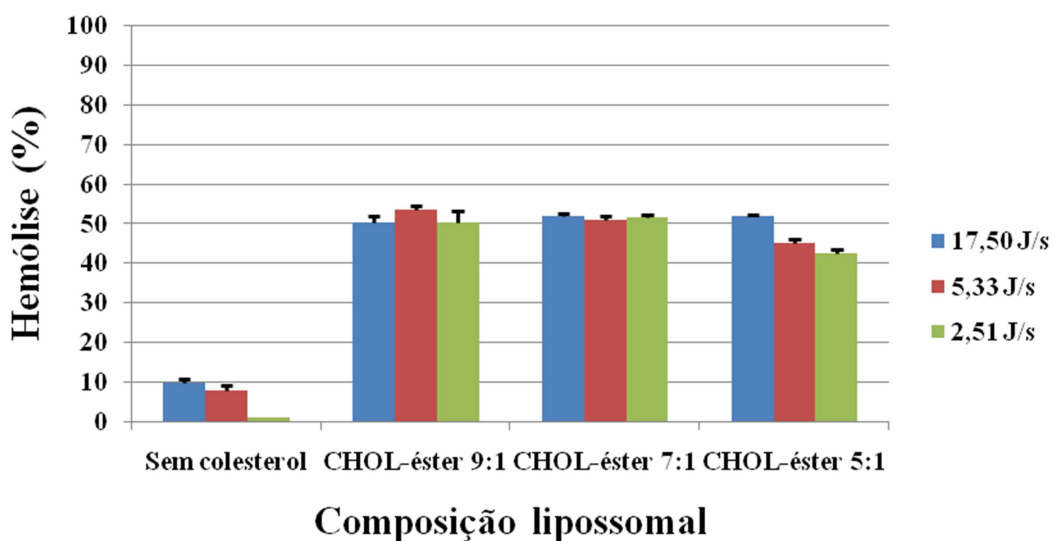


Figura 20. Fotohemólise percentual de composições lipossomais de ftalocianina de zinco na ausência (DPPC 150 mg) ou na presença de diferentes proporções massa/massa de fosfolípido/colesterol-éster: 9:1 (DPPC 135 mg/ CHOL-éster 15 mg), 7:1 (DPPC 131,25 mg/ CHOL-éster 18,75 mg), 5:1 (DPPC 125 mg/ CHOL-éster 25 mg). Em cada uma das sequências azul, vermelho e verde representam as doses luminosas $17,50 \text{ J s}^{-1}$, $5,33 \text{ J s}^{-1}$ e $2,51 \text{ J s}^{-1}$, respectivamente, no equipamento de irradiação LED600. Os controles de escuro foram subtraídos em todos os valores no gráfico. (n=3).

Comparando-se a eficiência do tratamento em baixas fluências de luz, é possível observar que a intensidade luminosa não altera de forma significativa a fotohemólise na medida em que a composição do lipossoma se altera nas formulações contendo estearato de colesterol para formulações com colesterol livre.

Mas quando analisamos o mesmo evento em altas fluências de luz, é indicado que estes valores reduzem significativamente nestas formulações em relação ao indicado com o colesterol livre (Figura 19). Levando-se em consideração a posicionamento do fármaco na bicamada, é possível que a intensidade de luz incidente na amostra não seja suficiente para promover um forte evento fotodinâmico quando o fotossensibilizador está aprisionado no interior da bicamada (MOSCA et al., 2011).

Simulação computacional de membranas contendo ftalocianina de zinco

Capítulo 3

3.1 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

3.1.1 Justificativa

Na literatura consta uma série de estudos que dissertam sobre a importância do colesterol em membranas biológicas, sejam em suas propriedades estruturais ou em parâmetros físico-químicos (RÓG et al., 2008, 2009, 2014, RAMEZANPOUR et al., 2016). Porém ainda são poucos os estudos envolvendo a participação deste esterol em sistemas de membranas com fármacos usando campo de força OPLS-AA.

A proposta do trabalho desenvolvido neste capítulo se pauta na necessidade buscar um melhor entendimento acerca das interações entre a ftalocianina de zinco e a membrana de DPPC/Colesterol, e que esclareçam questionamentos acerca do posicionamento espacial e mobilidade do fármaco dentro de uma bicamada.

3.1.2 Objetivo geral

O objetivo principal foi investigar através de simulações computacionais por dinâmica molecular o comportamento da ftalocianina de zinco em bicamadas de DPPC aditivadas ou não com colesterol.

3.1.3 Objetivos específicos

- Parametrizar no campo de força OPLS-AA as moléculas de DPPC e Colesterol;
- Desenvolver 2 sistemas de bicamadas contendo DPPC na presença e ausência de colesterol;
- Definir o perfil de densidade dos sistemas de membranas montadas;
- Avaliar a mobilidade da ftalocianina de zinco dentro de bicamadas de DPPC com ou sem colesterol;
- Avaliar as interações entre a ftalocianina de zinco e o colesterol dentro de bicamadas fosfolipídicas.

3.2 METODOLOGIA

3.2.1 Desenho e otimização estrutural

Para os estudos realizados na etapa computacional desta tese foi necessário obter os parâmetros e topologias no campo de força das moléculas utilizadas nos sistemas de membrana propostos. As estruturas moleculares do fosfolípido dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), colesterol (CHOL) e ftalocianina de zinco (ZnPC) foram desenhadas no software GABEDIT 2.4.8 (ALLOUCHE, 2011) e otimizadas as estruturas através de cálculos quânticos realizados no programa ORCA 3.0.3 (NEESE, 2011). Neste cálculo *ab initio* no método de Hartree-Fock foi utilizado como conjunto de bases o 6-31G*. Também foi ajustado o potencial eletrostático clássico da molécula através do RESP (*Restrained Electrostatic Potential*) no programa NWCHEM 5.1 (VALIEV et al., 2010).

3.2.2 Sistemas simulados

Dois sistemas foram propostos para os estudos de dinâmica molecular:

- Sistema S1:
 - 128 moléculas de DPPC;
 - 1 molécula de ZnPC.

- Sistema S2:
 - 80 moléculas de DPPC;
 - 54 moléculas de CHOL;
 - 1 molécula de ZnPC.

As caixas de simulação utilizadas em ambos os sistemas continham as medidas 4,942 nm x 4,942 nm x 10,784 nm, totalizando um volume final de aproximadamente 263,3 nm³.

As topologias utilizadas foram adaptadas de estudos anteriores em composições de membrana semelhantes aos sistemas S1 (JÄMBECK e LYUBARTSEV, 2012) e S2 (WENNBORG et al., 2012), porém resolvidos em campos de força distintos.

Ambos os sistemas foram solvatados explicitamente com moléculas de água TIP4P.

3.2.3 Dinâmica molecular

Na simulação por dinâmica molecular o pacote computacional GROMACS versão 5.1.4 (HESS et al., 2008) foi utilizado baseando-se no campo de força OPLS-AA (*Optimized Potentials for Liquids Simulations - all atom*) (JORGENSEN et al., 1996).

Os sistemas S1 e S2 foram minimizados em sua energia com o algoritmo *steepest descent* (QIAN, 1999) em 4 etapas de 1000 passos totalizando 10 ns, em temperaturas progressivas de 50, 150, 298 e 310 K. Este algoritmo é importante para a termalização do sistema, para evitar artificialidades no sistema.

Por fim, foram realizadas as simulações por dinâmica molecular em 50.000 passos totalizando 50 ns utilizando *ensemble* NPT (isotérmico e isobárico) a 310 K e 1 bar. Outros parâmetros utilizados foram a utilização de interações eletrostáticas e de van der Waals utilizando um raio de corte de 1,5 nm. As contribuições eletrostáticas de longa distância foram tratadas com o método PME (Particle Mesh Ewald). Taxa de compressibilidade de $4,5 \cdot 10^{-5} \text{ bar}^{-1}$ em pressão mantida a 1 bar pelo acoplamento do barostato de Berendsen e temperatura mantida a 310 K através do termostato *v-rescale*. O integrador utilizado foi o *leap-frog* em intervalo de tempo de integração de 2 fs.

3.2.4 Ferramentas computacionais para análise de dados

3.2.4.1 Densidade

É bastante comum encontrar em trabalhos computacionais envolvendo membranas, gráficos de perfil de densidade para a distribuição de massa em uma membrana. O programa '*gmx density*', encontrado dentro do pacote GROMACS bem como todos os programas '*gmx*', calcula a densidade de massa dos grupos e é capaz de gerar um gráfico desta densidade em relação a um eixo de caixa. Isto é útil para observar a distribuição de grupos ou átomos através da interface.

O '*gmx densmap*' calcula mapas de densidade em duas dimensões do sistema avaliado. A análise padrão é um mapa de densidade para um grupo selecionado de átomos no plano x-y. Três grupos devem ser fornecidos, os centros de massa dos dois primeiros grupos definem o eixo ea terceira define o grupo de análise.

3.2.4.2 Volume médio de membrana

O cálculo do volume médio da membrana é realizado pelo conjunto de ferramentas contidas no programa '*gmx sasa*' na qual é aplicado o método de rede cúbica dupla (EISENHABER et al., 1995). O método de rede cúbica dupla (*double cubic lattice method* - DCLM) é uma aproximação para calcular numericamente áreas de superfície molecular (tal como a superfície acessível a solventes - SAS - ou de Van der Waals) e o volume e compacidade de montagens moleculares.

3.2.4.3 Raiz quadrada do desvio quadrático médio (RMSD) e raiz quadrada da flutuação quadrática média (RMSF)

A raiz quadrada do desvio quadrático médio (*root mean square deviation* - RMSD) de certos átomos de uma molécula em relação a uma estrutura de referência pode ser calculada com o programa '*gmx rms*'(MAIOROV e CRIPPEN, 1995). A RMSD pode ser obtido a partir da seguinte equação

$$RMSD(t_1, t_2) = \left[\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N m_i |r_i(t_1) - r_i(t_2)|^2 \right]^{\frac{1}{2}}$$

onde $M = \sum_{i=1}^N m_i$ corresponde à somatória da massa de todos os N átomos da molécula e $r_i(t)$ é a posição do átomo i no tempo t.

A raiz quadrada da flutuação quadrática média (*root mean square fluctuation* - RMSF) calcula a variação média das posições atômicas na trajetória e pode ser obtida pela ferramenta '*gmx rmsf*' do pacote computacional e pode ser obtida pela equação

$$RMSF_i = \left[\frac{1}{\tau} \sum_{j=1}^{\tau} |r_i(j) - r_i|^2 \right]^{\frac{1}{2}}$$

onde, $r_i(j)$ são as coordenadas do i-ésimo átomo no passo de tempo j, r_i são suas posições médias e τ é o tempo expresso como o número de passos da simulação (NAMBA et al., 2008).

3.2.4.4 Deslocamento quadrático médio (mean square displacement - MSD)

A ferramenta responsável por realizar este cálculo é a '*gmx msd*' em que é utilizada a relação de Einstein para movimentos brownianos em um sistema bidimensional homogêneo. O coeficiente de difusão lateral D_{lat} pode ser definido através da seguinte forma:

$$D_{lat} = \lim_{t \rightarrow \infty} \frac{1}{4} \frac{d}{dt} \langle (r(t + \tau) - r(\tau))^2 \rangle_{\tau}$$

em que $\langle (r(t + \tau) - r(\tau))^2 \rangle$ é o desvio quadrático médio do centro de massa da molécula, t é o tempo final e τ é o tempo inicial (HOCKNEY e EASTWOOD, 1988).

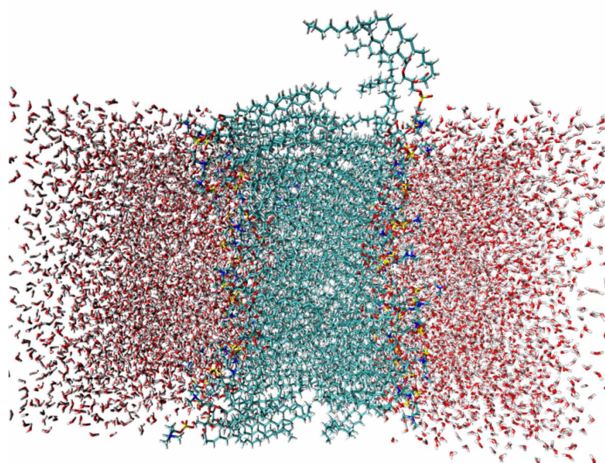
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A fidelidade na predição e análise computacional do comportamento de um fármaco em um sistema de membrana, em parte, está intrinsecamente ligada ao campo de força utilizado para realizar os cálculos da dinâmica molecular. No caso do sistema proposto neste trabalho, todas as simulações foram feitas sob as mesmas condições aplicando-se o campo de força OPLS-AA, em que são levados em consideração todos os átomos do sistema. Esta metodologia, em comparação às metodologias com átomos de hidrogênio implícitos, gera resultados mais precisos e ainda mais próximos de valores obtidos experimentalmente. Apesar do custo computacional maior, o campo de força OPLS-AA também foi escolhido por não serem frequentes os trabalhos envolvendo biomembranas utilizando este nível de detalhamento (LYUBARTSEV e RABINOVICH, 2016).

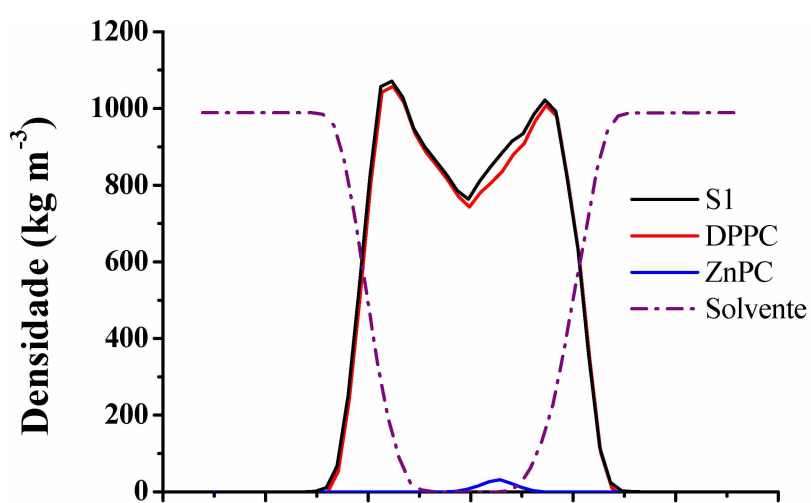
Neste trabalho foram montados dois sistemas de possibilitando indicar o melhor resultado experimental, encontrado nas formulações lipossomais contendo DPPC:colesterol livre na proporção massa:massa 5:1, com a formulação lipossomal sem colesterol. Sendo assim, a composição da membrana montada para as simulações varia entre a composição DPPC+ZnPC (S1) e DPPC+CHOL+ZnPC (S2).

Para avaliar a contribuição de cada substância na distribuição de massa na membrana lipossomal, foram analisados os perfis de densidade de massa dos diferentes componentes moleculares ao longo do eixo perpendicular à bicamada fosfolipídica e descritos nas Figuras 21b e 21c.

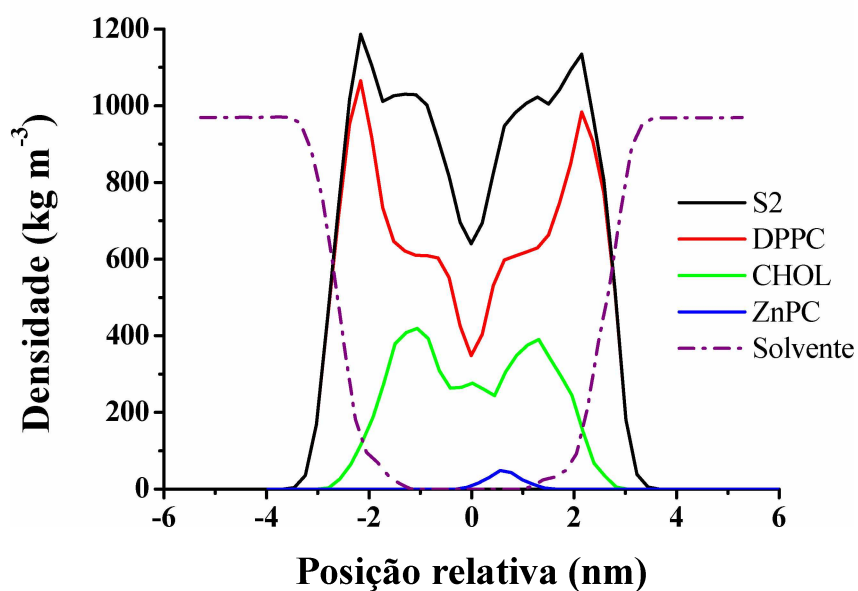
Nos gráficos é possível observar em preto a densidade total do sistema com exceção ao solvente (H_2O). A linha que segue abaixo, em vermelho, é a contribuição do fosfolipídio (DPPC) para a densidade. É importante indicar que o perfil de distribuição de DPPC do sistema S2 em comparação com o sistema S1 é bastante diferente. Este comportamento pode ser explicado pela ordenação que a presença do colesterol provoca na organização da bicamada. Em geral, os sistemas de fosfolipídios saturados que não possuem colesterol em sua composição se mantêm de forma desorganizada e não apresentam suas caudas carbônicas alinhadas em paralelo (RITWISSET et al., 2016).



21a



21b



21c

Figura 21. (a) Representação atomística da configuração inicial do sistema S1 solvante/bicamada/solvante. Perfis de densidade de massa dos diferentes componentes moleculares ao longo do eixo perpendicular à bicamada fosfolipídica no sistema S1 (b) e S2 (c).

Tanto no gráfico 21b quanto no gráfico 21c, o perfil de densidade de massa a ftalocianina de zinco nos sistemas indica que ela permanece predominantemente no domínio lipídico da membrana, não apresentando tendência em migrar para as proximidades polares da bicamada. Este resultado está de acordo com a baixa solubilidade do fármaco em água e a também confirma a sua apreciável taxa de encapsulação em formulações lipossomais.

O perfil de densidade encontrado no sistema S2 também mostra que o colesterol se encontra acomodado em regiões ligeiramente internas em relação ao DPPC, na bicamada lipídica. Este perfil pode ser explicado pela Figura 22:

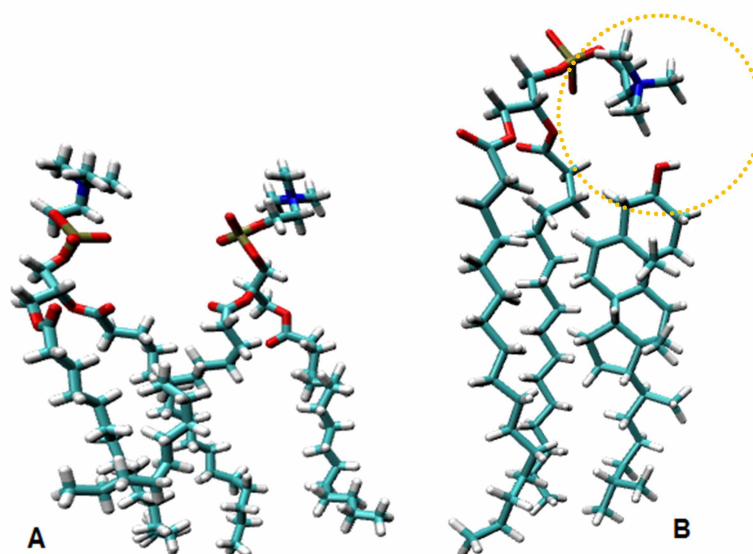


Figura 22: Representação atomística de fosfolipídios vizinhos no sistema S1 (A) e de fosfolipídio vizinho à molécula de colesterol livre no sistema S2(B). Átomos de carbono em verde, oxigênio em vermelho, hidrogênio em branco, nitrogênio em azul e fósforo em marrom.

Neste comparativo é possível observar que o alinhamento das cadeias carbônicas no sistema S1 é desorganizado e aleatório, em relação ao perfil encontrado no sistema S2. O colesterol é capaz de ordenar o alinhamento das caudas lipídicas da molécula vizinha pela interação entre o grupo hidroxila que interage com a subunidade polar dos fosfolipídios (em destaque na Figura 22b) e o seu domínio apolar volumoso organiza as cadeias carbônicas vizinhas através de interações de Van der Waals (RÓG et al., 2009). A interação das regiões polares dessas biomoléculas faz com que essa região polar da molécula de DPPC sofra uma torção de seu ângulo (*tilt angle*) em relação às cadeias

carbônicas, sendo que esta intensa restrição de movimento também contribui para que o sistema S2 seja mais organizado (PASENKIEWICZ-GIERULA et al., 2016).

Outro indício que comprova a maior organização da membrana no sistema S2 é o volume ocupado pela mesma no espaço da caixa. Este volume é ditado principalmente pela espessura da membrana (KHAJEH e MODARRESS, 2014) e tem seus valores apresentados, em função do tempo, na Figura 23.

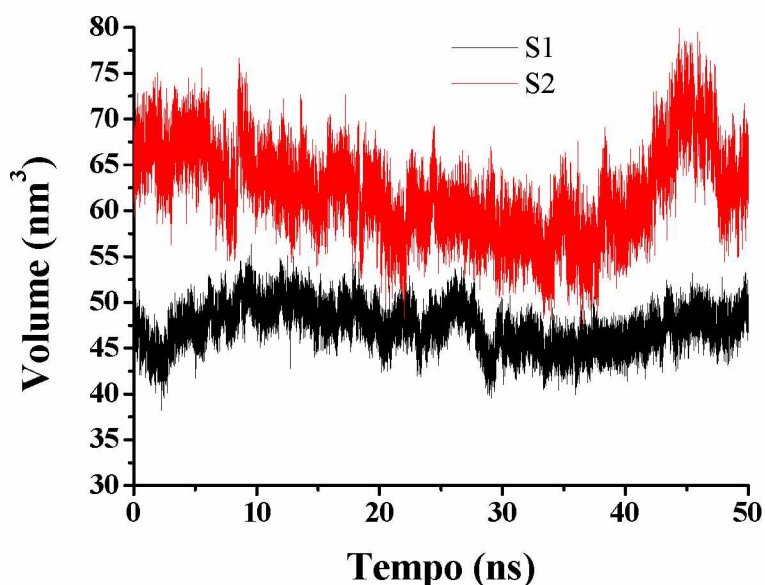


Figura 23. Média da variação de volume da bicamada fosfolipídica em função do tempo de simulação (ns). Em preto o sistema S1 (DPPC+ZnPC) e em vermelho o sistema S2 (DPPC+CHOL+ZnPC).

Ao contrário dos perfis de densidade que foram apresentados nos resultados discutidos anteriormente, o gráfico da Figura 23 não apresenta a variação média do sistema, mas sim em função do tempo. Entre 40 ns e 50 ns é observado um comportamento de aumento brusco no volume no sistema S2, pois a membrana sofreu readequações espaciais em função da distribuição e organização do colesterol no sistema. Estes eventos serão discutidos conjuntamente com a mobilidade do colesterol e da ZnPC.

Apesar de ambos os sistemas apresentarem uma oscilação nos valores encontrados para o volume da membrana, foi possível calcular o volume médio do sistema S1 ($V_{mS1} = 47,3348 \pm 3,4778 \text{ nm}^3$) e S2 ($V_{mS2} = 62,0731 \pm 4,8014 \text{ nm}^3$).

Com os valores encontrados foi possível concluir que o maior grau de organização do sistema S2 reflete em um volume médio aumentado para o sistema da bicamada, bem como citado na literatura em outros sistemas montados com fosfolipídios diversos (KHAJEH e MODARRESS, 2014). A capacidade do colesterol de compactar os fosfolipídios em arranjos diminui o volume ocupado por cada molécula de DPPC, mas por outro lado torna a espessura da bicamada maior, fato este observado nas Figuras 12b e 12c em que as espessuras totais dos sistemas S1 (≈ 6 nm) e S2 (≈ 7 nm) puderam ser aferidas, bem como o interstício entre os fosfolipídios em S2 aparece mais pronunciadamente.

Outra análise importante acerca da organização dos 2 sistemas de bicamadas estudados é o que chamamos de *root mean square fluctuation* (RMSF), ou o que em uma tradução direta seria a 'raiz quadrada da flutuação quadrática média', e que é indicada no gráfico da Figura 24, a seguir.

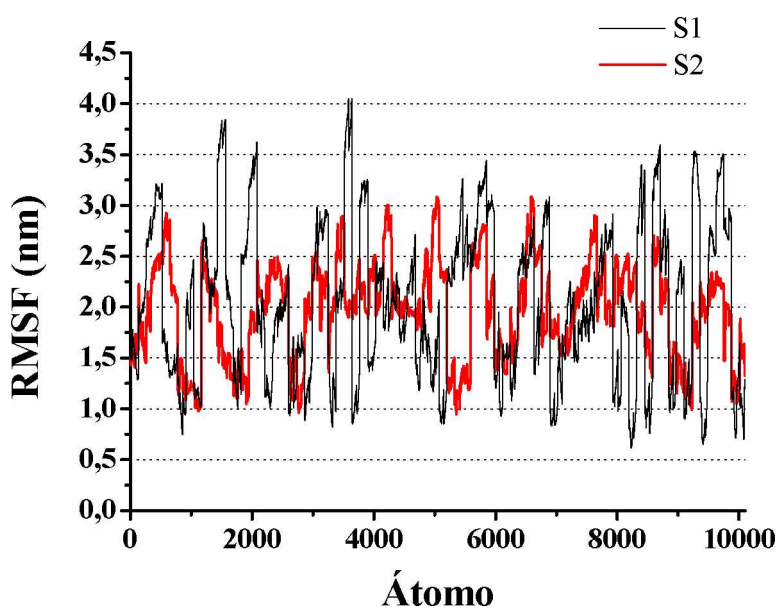


Figura 24. Raiz quadrada da flutuação quadrática média (RMSF/nm) para os átomos de cada sistema proposto, excluindo-se o solvente. Em preto o sistema S1 (DPPC+ZnPC) e em vermelho o sistema S2 (DPPC+CHOL+ZnPC).

Pode-se dizer que esta análise calcula a média de variação de posição de cada átomo que esteja presente no sistema estudado. Neste caso, os valores de

variação dos átomos do solvente não são considerados, mas sim apenas do sistema lipídico.

É visível, no gráfico da Figura 24, que para o sistema S1 os átomos da bicamada flutuaram em posição de forma mais frequente e intensa que no sistema S2, visto que os valores de máximo encontrados para a membrana sem colesterol são mais pronunciados, chegando até mesmo a 4 nm. Mais uma vez a explicação para este fato está no grau de liberdade de movimentação para as caudas lipídicas e no quão organizado o sistema S2 se tornou com a presença do colesterol.

É imprescindível observar que todas as características discutidas até aqui são importantes para predizer e justificar o comportamento da eficiência fotodinâmica encontrado nos diversos lipossomas estudados experimentalmente neste trabalho. Para analisarmos melhor o comportamento da membrana em relação ao fármaco encapsulado, parâmetros como a mobilidade, disposição e interação da ZnPC são primordiais para o entendimento de como o fármaco pode ser mais efetivo em um sistema em detrimento de outro (AZIZI e KOLI, 2016).

Na avaliação da mobilidade do fármaco na bicamada podemos citar a difusão lateral, calculada com a ferramenta *mean square displacement* (MSD), em que é possível avaliar o quanto a molécula analisada se deslocou em um plano.

A mobilidade do fármaco na membrana pode ser diferencial para o sucesso de sua transferência do transportador para a célula-alvo. A capacidade de uma molécula em se difundir por dentro uma bicamada fosfolipídica aditivada com colesterol é diretamente ligada à proporção molar entre DPPC:CHOL, bem como a temperatura do sistema (MARQUARDT et al., 2016).

A Figura 25 mostra a difusão lateral da ftalocianina de zinco em uma membrana contendo apenas DPPC e outra contendo a combinação de DPPC e colesterol livre.

De acordo com o gráfico, claramente a mobilidade maior da ZnPC acontece no sistema aditivado com CHOL, principalmente a partir de 30 ns, em que é possível observar uma grande variação na difusão neste sistema. A redução apresentada para S2 a partir de 43 ns não se trata de que a mobilidade foi reduzida, mas sim que a molécula regrediu em sua trajetória, porém apresentando uma grande mobilidade ainda sim.

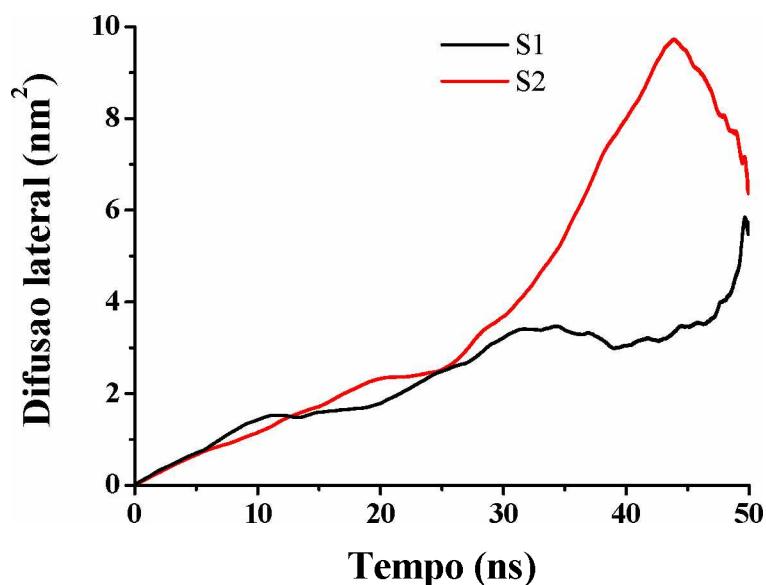


Figura 25. Difusão lateral (MSD/nm^2) no plano para ZnPC contida cada sistema proposto em função do tempo (ns). Em preto o sistema S1 (DPPC+ZnPC) e em vermelho o sistema S2 (DPPC+CHOL+ZnPC). Valores para o coeficiente de difusão lateral encontrados foram: $D_{S1} = 0,174 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1} (\pm 0,011)$ e $D_{S2} = 5,471 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1} (\pm 0,754)$.

Em geral, com a presença do colesterol e a redução da fluidez é de se esperar que a mobilidade das moléculas do sistema seja reduzida com a maior organização da bicamada lipídica. É o que acontece na maioria das simulações realizadas para moléculas diversas em bicamadas lipídicas (KHAJEH e MODARRESS, 2014). Porém, neste caso os resultados indicaram justamente o contrário: a presença do colesterol favoreceu fortemente a mobilidade da ftalocianina de zinco.

Uma das explicações pode estar na planaridade da molécula de ftalocianina de zinco, visto que o deslocamento apresentado pelo fármaco se deu em maior parte através de um dos eixos do plano da membrana, tal como explicitado na Figura 26 e descrito em sua legenda. A organização da membrana faz com que haja menor impedimento para locomoção da ZnPC, sendo que no sistema S1 as duas caudas lipídicas estão abertas em angulações que impedem a permeabilidade do corante por dentre os fosfolipídios.

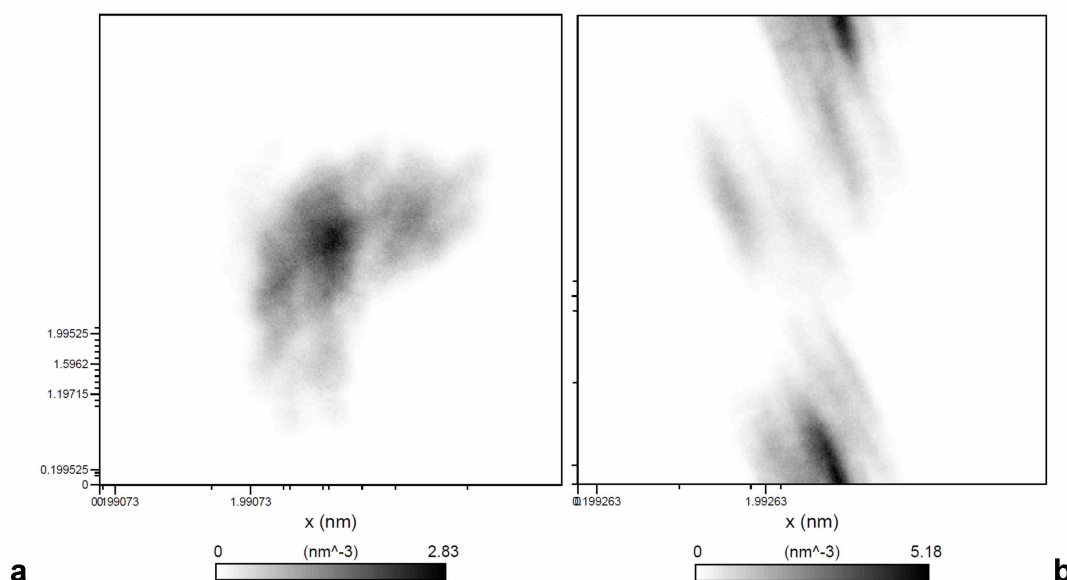


Figura 26: Mapa da distribuição densidade de massa da molécula de ftalocianina de zinco no plano da membrana ao longo de 50 ns de simulação. Na esquerda (a) o sistema S1 e na direita (b) o sistema S2. Quanto mais intensa a coloração, maior a quantidade de tempo em que a molécula se fez presente nestas coordenadas. A posição referente ao ponto de partida ($t = 0$ ns) da ZnPC nos sistemas é central com orientação paralela ao eixo 'y'.

A distribuição de densidade indicada na Figura 26 mostra que a movimentação da ftalocianina de zinco varreu uma área maior do plano da bicamada lipídica do sistema S2, chegando até mesmo a cruzar a borda da caixa. Enquanto no sistema S1 o fármaco permaneceu nas mesmas imediações em que foi colocado nas condições iniciais. É válido ressaltar que em ambos os casos as moléculas foram posicionadas nas mesmas coordenadas dentro da caixa.

Esta maior mobilidade do fármaco na membrana simulada pode estar diretamente ligada ao fato das formulações contendo colesterol serem mais efetivas na entrega do fármaco e eficiência fotodinâmica

Mais um importante aspecto a ser comentado seria a avaliação do RMSD (*root mean square deviation*) que poderia ser traduzido como 'raiz quadrada do desvio quadrático médio', ou seja, o quanto a estrutura de uma molécula flutuou em um dado tempo. O gráfico da Figura 27 a seguir representa a flutuação

(RMSD) da ftalocianina de zinco dentro dos sistemas contendo apenas DPPC (S1) e também DPPC+CHOL (S2), em função do tempo de simulação.

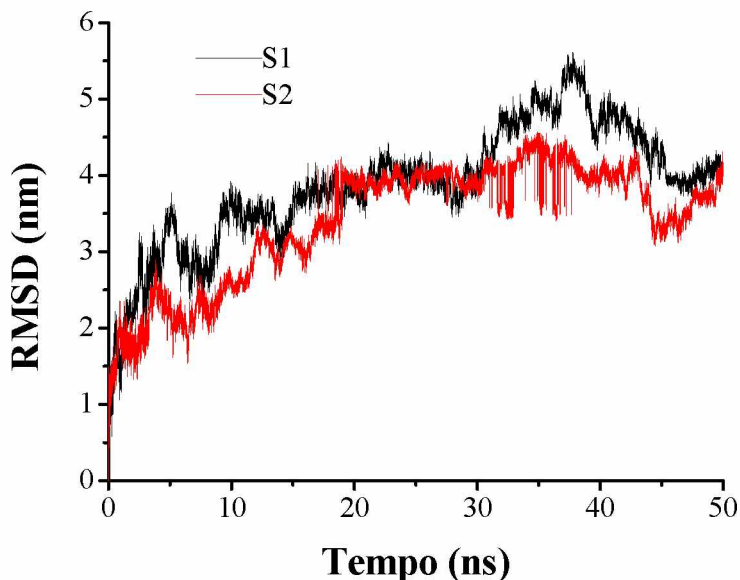


Figura 27. Raiz quadrada do desvio quadrático médio (RMSD/nm) para ZnPC contida cada sistema proposto em função do tempo. Em preto o sistema S1 (DPPC+ZnPC) e em vermelho o sistema S2 (DPPC+CHOL+ZnPC).

Levando-se em conta a estrutura planar e rígida da ftalocianina de zinco, este estudo apresenta pequena variação do comportamento do fármaco em um comparativo entre os dois sistemas propostos. No sistema S1 a molécula possui um grau de liberdade maior em relação a um sistema mais rígido e compactado como o sistema S2, sendo assim, os valores encontrados para RMSD da ftalocianina de zinco são ligeiramente maiores.

Um comportamento amplamente discutido acerca da posição do colesterol, e também seus análogos, em camadas fosfolipídicas é o '*flip-flop*'. Este acontecimento é a alternância da posição do colesterol na membrana, quando este passa da parte interna para a externa na bicamada, ou vice-versa. Este é um evento que acontece frequentemente, porém de forma muito rápida, em meio biológico e também observado não só em experimentações *in vitro*, como também em simulações computacionais (RÓG, 2008).

Na dinâmica molecular realizada no sistema S2 foi possível não só observar esta inversão de posição, mas também analisar a influência da

ftalocianina neste acontecimento. Uma destas ocasiões pode ser observada na Figura 28, em que é demonstrada a posição inicial de uma molécula de colesterol que em seguida entra em processo de *flip-flop*, mas é impedida pela presença da ZnPC na bicamada.

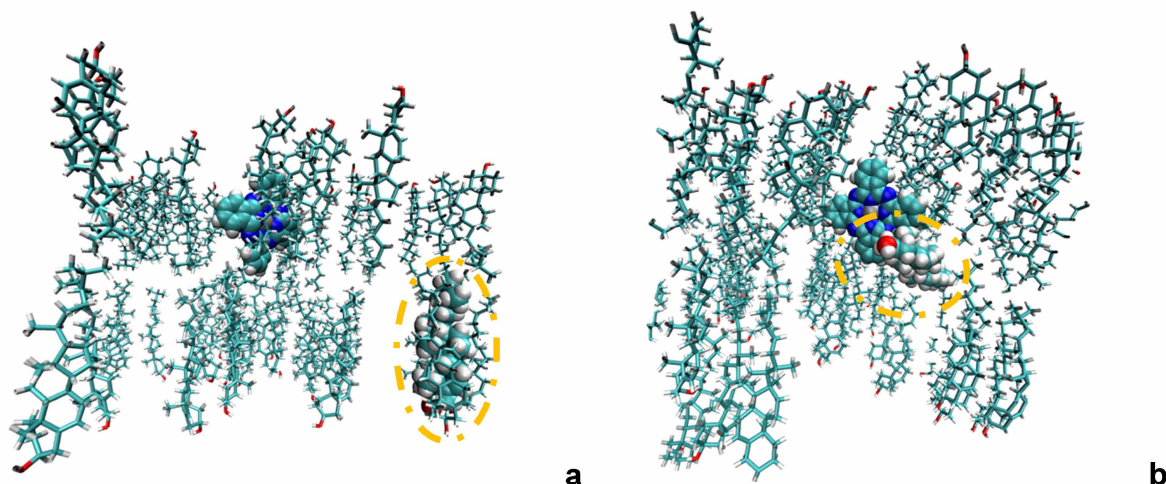


Figura 28. Representação atomística do sistema S2 em que são omitidas as moléculas de solvente e de DPPC. Em (a), $t = 0$ ns, e todas as moléculas estão na posição inicial. Em (b) $t = 50$ ns. Em destaque a molécula de colesterol que entra em processo de '*flip-flop*'.

O '*flip-flop*' é um evento muito rápido e extremamente dependente da composição da membrana. Estudos mostram que em bicamadas pobres em colesterol esta alteração na orientação de uma molécula de colesterol dura cerca de 20ns. Porém, com o aumento da quantidade de colesterol, este tempo pode ser aumentado, devido às forças de interação que acontecem com moléculas de colesterol vizinhas (BENNETT et al. 2009).

Na representação da Figura 28 é possível perceber uma interação que ocorre entre a ftalocianina de zinco e o colesterol que está em transição de posição. Esta interação foi possível ser observada logo no início da dinâmica molecular e permaneceu até o final da simulação. Foram mais de 40 ns de interação, sendo que a partir de 45 ns, uma segunda molécula de colesterol que havia entrado em processo de inversão de posição na bicamada também passou a interagir com a ftalocianina de zinco, assim como demonstrado na Figura 29.

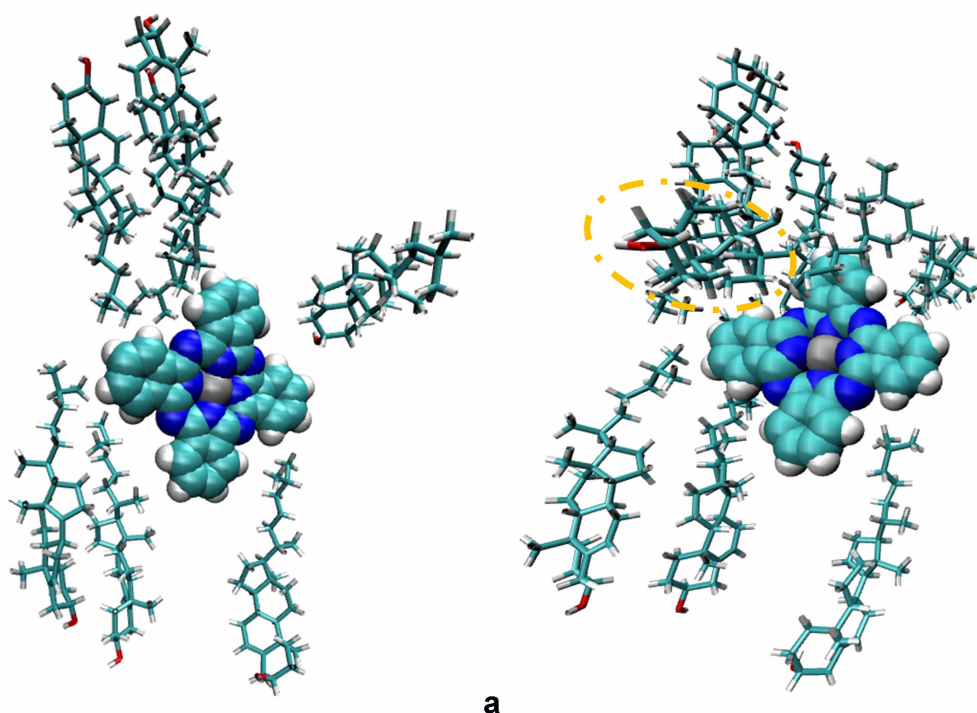


Figura 29. Representação atomística do sistema S2 em que são omitidas as moléculas de solvente e de DPPC. Em (a), $t = 10$ ns, e todas as moléculas estão na posição inicial. Em (b) $t = 50$ ns. Em destaque uma segunda molécula de colesterol que entra em processo de '*flip-flop*', e interage com o fármaco.

O período de tempo aproximado que a segunda molécula em inversão de posição se dá entre 40 ns e 45 ns, e neste instante esta mesma molécula interage com a ftalocianina de zinco. Neste momento da simulação é possível observar que a difusão lateral discutida anteriormente no gráfico da Figura 25 também sofre alteração na sua orientação e o fármaco se desvia de sua trajetória. Outra característica já discutida e que também sofre alterações é o volume da membrana tratado no gráfico da Figura 23, em que o volume sofre aumento abrupto nesta mesma faixa de tempo, indicando que a aglomeração de colesterol junto à ftalocianina de zinco alterou significativamente a dinâmica da bicamada fosfolipídica. O volume na região da ftalocianina foi em média 13% maior que pontos distantes do fármaco, ao final da simulação.

A capacidade da ZnPC em aglomerar moléculas de colesterol também é evidenciada na Figura 29, em que nos momentos finais da dinâmica molecular foi possível perceber que no entorno do fármaco as moléculas de colesterol estavam empilhadas. No primeiro instante ($t = 0$ ns) haviam 6 moléculas de colesterol em

interação efetiva com a ftalocianina de zinco, e ao final da simulação haviam 8 moléculas de CHOL no entorno do fotossensibilizador.

É relatado na literatura que o colesterol presente em uma bicamada de DPPC em proporções entre 20% e 40% mol:mol é capaz de formar os denominados '*rafts*' em simulações na ordem de microssegundos. Estas estruturas são aglomerações gigantescas de moléculas de colesterol, que formam '*clusters*' navegantes por dentre a bicamada fosfolipídica, alterando toda a dinâmica presente na membrana, outrora rígida (BENNETT e TIELEMAN. 2013).

Como anteriormente discutido na Figura 25 ocorre um pronunciado aumento da difusão lateral da ftalocianina de zinco depois de 30 ns. A aglomeração de moléculas de colesterol sobre a ftalocianina de zinco que se inicia em 26 ns pode explicar o aumento da mobilidade do fármaco neste instante da simulação.

É possível observar a formação dos '*rafts*' analisando o mapa de densidade de massa de colesterol no plano da membrana ilustrado na Figura 30 a seguir.

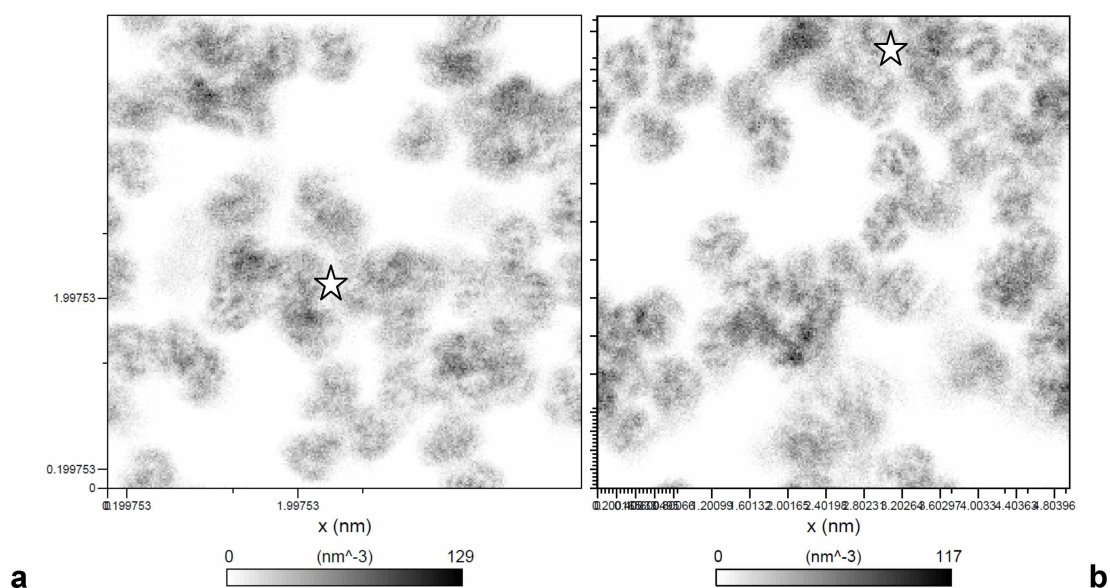


Figura 30. Mapa da distribuição de densidade de massa das 54 moléculas de colesterol no plano da membrana ao longo de 50 ns de simulação. Na esquerda (a) sistema S2 no tempo inicial (b) o sistema S2 em 50 ns. Quanto mais intensa a coloração, maior a quantidade de tempo em que a molécula se fez presente nestas coordenadas. A marcação se refere à posição da ZnPC nos sistemas.

Ao final da simulação é possível observar na distribuição de densidade de massa do CHOL uma aglomeração da molécula no entorno do fotossensibilizador, que acarreta em uma mobilidade do mesmo por dentro a membrana através da formação de '*rafts*', que são capazes de alterar diversas propriedades de uma bicamada, como permeabilidade, fluidez e espessura (NIEMELÄ et al., 2009). A espessura média final da membrana na região da ftalocianina de zinco foi de 6,2 nm, enquanto em regiões distantes do sítio de interação com o fármaco a espessura média foi 5,2 nm.

A aglomeração de moléculas de colesterol no entorno da ZnPC pode ser diferencial no processo de fotossensibilização, visto que a melhor mobilidade do corante quando em *clusters* de colesterol pode facilitar a transferência do fármaco para a célula-alvo, melhorando a eficiência do tratamento. Outro aspecto que ainda pode contribuir para a melhor eficiência da inativação fotodinâmica das células utilizando sistemas lipossomais com colesterol é que estes '*rafts*' vizinhos à ZnPC podem sofrer oxidações na insaturação da molécula do esterol e desestabilizar toda a estrutura, liberando o fármaco para o meio e aumentando a sua internalização pelas células.

Considerações finais

Capítulo 4

4.1 CONCLUSÕES

Lipossomas contendo ftalocianina de zinco foram preparados variando-se a quantidade de colesterol e colesterol esterificado em suas estruturas. Estas vesículas foram preparadas com cargas de superfície e diâmetros adequados para possível uso em tratamentos de diversos modelos celulares.

Verificou-se que as formulações lipossomais apresentaram uma boa estabilidade em 45 dias, principalmente as formulações de ftalocianina de zinco lipossomais aditivadas apenas com colesterol livre, bem como em menores proporções de colesterol. Resultados que indicam possibilidade de armazenamento de tais lipossomas, em caso de futuras aplicações comerciais, mediante a um apropriado acondicionamento protegido da luz.

As formulações lipossomais com maior quantidade de colesterol são as que obtiveram a maior eficiência de encapsulação da ftalocianina de zinco.

O colesterol e o estearato de colesterol foram determinantes para o evento fotodinâmico proposto, seja interferindo negativamente quando o estearato de colesterol está em maior concentração dentro do sistema, quanto positivamente em proporções massa/massa de 5:1 para o colesterol livre. O melhor o aporte do fármaco no meio celular promove fotoinativação de cerca de 90% das células em formulações lipossomais contendo expressiva quantidade de colesterol livre (5:1).

Simulações computacionais de sistemas contendo DPPC/ZnPC aditivados ou não com colesterol mostraram-se efetivos na predição do comportamento do fármaco na bicamada fosfolipídica, indicando sua maior mobilidade nos sistemas contendo colesterol, e também a formação de *rafts* e a ocorrência de uma interação pronunciada entre a ZnPC e as moléculas de colesterol em seu entorno, o que pode potencializar a atividade fotodinâmica do fotossensibilizador.

O sucesso da eficiência dessa terapia está na combinação de uma fluência correta de luz que seja capaz de ativar o fármaco dependendo de sua disponibilidade espacial, à interação entre o fármaco e o sistema lipídico e também à uma proporção fosfolipídio/colesterol suficiente para que o fármaco seja encapsulado, mas sem inibir a ação de espécies reativas de oxigênio.

4.2 TRABALHOS FUTUROS

- Realizar os testes de estabilidade mais longos, e utilizando aditivos, para melhor analisar a durabilidade das formulações;
- Desenvolver, testar e simular computacionalmente estruturas lipossomais com ésteres de colesterol de cadeias carbônicas menores;
- Utilizar nas formulações lipossomais ftalocianinas que possuam grupos polares em sua estrutura, como a tetranitroftalocianina de zinco;
- Pretende-se também realizar microscopias eletrônicas no intuito de compreender melhor o que ocorre na interação entre o lipossoma e célula-alvo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADEGOKE, O.; FORBES, P. B. C. Challenges and advances in quantum dot fluorescent probes to detect reactive oxygen and nitrogen species: A review. *Analytica Chimica Acta*, v. 862, p. 1-13, 2015.

AKBARZADEH, A.; REZAEI-SADABADY, R.; DAVARAN, S.; JOO, S. W.; ZARGHAMI, N.; HANIFEHPOUR, Y.; SAMIEI, M.; KOUHI, M.; NEJATI-KOSHKI, K. Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale research letters*, v. 8, n. 1, p. 1, 2013.

ALAVI, S.; HAERI, A.; DADASHZADEH, S. Utilization of chitosan-caged liposomes to push the boundaries of therapeutic delivery. *Carbohydrate Polymers*, v. 157, p. 991–1012, 2017.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; MORGAN, D.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. *Molecular Biology of the Cell*. 6a. Edição, Editora Garland Science, 2014.

ALLEN, T. M.; CULLIS, P. R. Liposomal drug delivery systems: from concept to clinical applications. *Advanced drug delivery reviews*, v. 65, n. 1, p. 36-48, 2013.

ALLOUCHE, A. R. Gabedit - A graphical user interface for computational chemistry softwares. *Journal of Computational Chemistry*. v. 32, p. 174-182, 2011.

ALWARAWRAH, M.; DAI, J.; HUANG, J. A molecular view of the cholesterol condensing effect in DOPC lipid bilayers. *Journal of Physical Chemistry B*, v. 114, p. 7516–7523, 2010.

AZIZI, K.; KOLI, M. G. Molecular dynamics simulations of Oxprenolol and Propranolol in aDPPC lipid bilayer. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*. v. 64, p. 153–164, 2016.

BACELLAR, I. O. L.; TSUBONE, T. M.; PAVANI, C.; BAPTISTA, M. S. Photodynamic efficiency: from molecular photochemistry to cell death. *International journal of molecular sciences*, v. 16, n. 9, p. 20523-20559, 2015.

BANGHAM, A. D.; STANDISH, MALCOLM, M.; WATKINS, J. C. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *Journal of molecular biology*, v. 13, n. 1, p. 238-IN27, 1965.

BENNETT, W. F. D.; MACCALLUM, J. L.; HINNER, M. J.; MARRINK, S. J.; TIELEMAN, D. P. Molecular View of Cholesterol Flip-Flop and Chemical Potential in Different Membrane Environments. *Journal of the American Chemical Society*. v. 131, p. 12714–12720, 2009.

BENNETT, W. F. D.; TIELEMAN, D. P. Computer simulations of lipid membrane domains. *Biochimica et Biophysica Acta- Biomembranes*. v. 1828, p. 1765–1776, 2013.

BOWN, S. G. Photodynamic therapy for photochemists. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London A*. v. 371, n. 1995, 2013

BUNKER, A.; MAGARKAR, A.; VIITALA, T. Rational design of liposomal drug delivery systems, a review: Combined experimental and computational studies of lipid membranes, liposomes and their PEGylation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, v. 1858, n. 10, p. 2334–2352, 2016.

CHORILLI, M.; RIMÉRIO, T. C.; OLIVEIRA, A. G.; SCARPA, M. V. Estudo da estabilidade de lipossomas compostos de fosfatidilcolina de soja e fosfatidilcolina de soja hidrogenada adicionados ou não de colesterol por método turbidimétrico. *Latin America Journal of Pharmacy*. v. 26, n. 1, p. 31-7, 2007.

DAI, J.; ALWARAWRAH, M.; HUANG J.; Instability of Cholesterol Clusters in Lipid Bilayers and The Cholesterol's Umbrella Effect. *Journal of Physical Chemistry B*, v. 114, n. 2, p. 840–848, 2010.

DENIS, T. G. S.; AZIZ, K.; WAHEED, A. A.; HUANG, Y. Y.; SHARMA, S. K.; MROZ, P.; HAMBLIN, M. R. Combination approaches to potentiate immune response after photodynamic therapy for cancer. *Photochemical & Photobiological Sciences*, v. 10, n. 5, p. 792-801, 2011.

DOUGHERTY, T. J.; GOMER, C. J.; HENDERSON, B. W.; JORI, G.; KESSEL, D.; KORBELIK, M.; MOAN, J.; PENG Q. Photodynamic therapy. *Journal of the National Cancer Institute*, v. 90, n. 12, p. 889-905, 1998.

EDELSON, R. L. Light-activated drugs. *Scientific American*, v. 259, p. 68-75, 1988.

EISENHABER, F; LIJNZAAD, P.; ARGOS, P.; SANDER, C.; SCHARF, M. The double cubic lattice method: Efficient approaches to numerical integration of surface area and volume and to dot surface contouring of molecular assemblies. *Journal of Computational Chemistry*, v. 16, p. 273-284, 1995.

ERIKSSON E. S. E.; ERIKSSON L. A. The Influence of Cholesterol on the Properties and Permeability of Hypericin Derivatives in Lipid Membranes. *Journal of Chemical Theory and Computation*, v. 7, p. 560–574, 2011.

FERREIRA, A. L. A., MATSUBARA, L. S.; Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Revista Associação Médica Brasileira*; v.43, n.1, p. 61-8 1997.

FRANÇA, E. G. *Avaliação das variáveis metodológicas na atividade fotodinâmica de ftalocianinas lipossomais utilizando-se eritrócitos como modelo celular*. Trabalho de conclusão de curso bacharelado em química - UFU. Uberlândia, 2008.

FREITAS, I.; PONTIGGIA, P. Identification of hypoxic and oxygenated tumor subpopulations with enzyme and fluorescent probes. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v. 4, n. 3, p. 340-342, 1990.

GREGORIADIS, G.; RYMAN, B. E. Liposomes as carriers of enzymes or drugs: a new approach to the treatment of storage diseases. *Biochemical Journal*, v. 124, n. 5, p. 58P, 1971.

HENDRICH, C.; HÜTTMANN, G.; VISPO-SEARA, J. L.; HOUSEK, S.; SIEBERT, W. E. Experimental photodynamic laser therapy for rheumatoid arthritis with a second generation photosensitizer. *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy*, v. 8, n. 3, p. 190-194, 2000.

HESS, B. KUTZNER, C.; VAN DER SOEL, D.; LINDAHL, E. GROMACS 4: Algorithms for highly efficient load-balanced, and scalable molecular simulation. *Journal of Chemical Theory and Computation*. v. 4, n. 3, p. 435-447, 2008.

HETTIARATCHY, S.; CLARKE, J.; TAUBEL, J.; BESA, C. Burns after photodynamic therapy. *BMJ*, v. 320, n. 7244, p. 1245, 2000.

HOFFBRAND, A. V.; MOSS, P. A. H. *Fundamentos em Hematologia*. 6a. Edição, Editora Artmed, 2013.

HOCKNEY, R. W.; EASTWOOD, J. W. Computer Simulation Using Particles. A. Hilger, 1988.

HUANG, J.; FEIGENSON, G. W. A Microscopic Interaction Model of Maximum Solubility of Cholesterol in Lipid Bilayers. *Biophysical Journal*. v. 76, n. 4, p. 2142–2157, 1999.

JÄMBECK, J. P. M.; LYUBARTSEV, A. P. Derivation and Systematic Validation of a Refined All-Atom Force Field for Phosphatidylcholine Lipids. *The Journal of Physical Chemistry B*. v. 116, n. 10, p. 3164-3179, 2012.

JORI, G.; BELTRAMINI, M.; REDDI, E.; SALVATO, B.; PAGNAN, A.; ZIRON, L.; TOMIO, L.; TSANOV, T. Evidence for a major role of plasma lipoproteins as hematoporphyrin carriers in vivo. *Cancer letters*, v. 24, n. 3, p. 291-297, 1984.

JORGENSEN, W. L.; MAXWELL, D. S.; TIRALDO-RIVES, J. Development and testing of the OPLS all atom force field on conformational energetics and properties of organic liquids. *Journal of American Chemical Society*. v. 118, p.11225-11236, 1996.

JÚNIOR, A. M. Y., *Estudo dos Efeitos da Terapia Fotodinâmica em Periodontite Induzida em Ratos*. Tese de Doutorado em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear – Materiais, IPEN, 2007.

KAESTNER, L. Evaluation of human erythrocytes as model cells in photodynamic therapy. *General physiology and biophysics*, v. 22, n. 4, p. 455-466, 2003.

KAESTNER, L.; JUZENIENE, A.; MOAN, J. Erythrocytes—the ‘house elves’ of photodynamic therapy. *Photochemical & Photobiological Sciences*, v. 3, n. 11-12, p. 981-989, 2004.

KHAJEH, A.; MODARRESS, H. The influence of cholesterol on interactions and dynamics of ibuprofen in a lipid bilayer. *Biochimica et Biophysica Acta*. v. 1838, p. 2431–2438, 2014.

KAKUSHIMA N.;FUJISHIRO M. Endoscopic submucosal dissection for gastrointestinal neoplasms. *World Journal of Gastroenterology*. May 21; v.14, n. 19, p.2962-2967, 2008.

KATEB, B.; CHIU, K.; YAMAMOTO, V. et al. Nanoplatfoms for constructing new approaches to cancer treatment, imaging, and drug delivery: what should be the policy? *Neuroimage*, v. 54, p. S106-S124, 2011.

KIMELBERG, H. K.; TRACY, T. F.; BIDDLECOME, S. M.; BOURKE, R. S. The effect of entrapment in liposomes on the in vivo distribution of 3H-methotrexate in a primate. *Cancer Research*. v.36, p.2949–2957, 1976.

KERDOUS, R.; HEUVINGH, J.; BONNEAU, S. Photo-dynamic induction of oxidative stress within cholesterol-containing membranes: Shape transitions and permeabilization. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1808, p. 2965–2972, 2011.

KERR, J. F. R.; WINTERFORD, C. M.; HARMON, B. V. Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer*, v. 73, n. 8, p. 2013-2026, 1994.

KORBELIK, M.; KROSL G. OLIVE P. L.; CHAPLIN D. J. Distribution of Photofrin between tumour cells and tumour associated macrophages. *British journal of cancer*, v. 64, n. 3, p. 508, 1991.

KOZLOWSKA, D.; FORAN, P.; MACMAHON, P.; SHELLY, M. J.; EUSTACE, S.; O'KENNEDY, R. Molecular and magnetic resonance imaging: The value of immunoliposomes. *Advanced drug delivery reviews*, v. 61, n. 15, p. 1402-1411, 2009.

KULIG, W.; OLŻYŃSKA, A.; JURKIEWICZ, P.; KANTOLA, A. M.; KOMULAINEN, S.; MANNA, M.; POURMOUSA, M.; VAZDAR, M.; CWIKLIK, L.; ROG T.; KHELASHVILI, G.; HARRIES, D.; TELKKI, V. V.; HOF, M.; VATTULAINEN, I.; JUNGWIRTH, P. Cholesterol under oxidative stress — How lipid membranes sense oxidation as cholesterol is being replaced by oxysterols. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 84 p. 30–41, 2015.

KULIG, W.; CWIKLIK, L.; JURKIEWICZ, P.; ROG T.; VATTULAINEN, I. Cholesterol oxidation products and their biological importance. *Chemistry and Physics of Lipids*, v. 199 p. 144–160, 2016.

LASIC, D. D. Recent developments in medical applications of liposomes: sterically stabilized liposomes in cancer therapy and gene delivery in vivo. *Journal of controlled release*, v. 48, n. 2, p. 203-222, 1997.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. *Princípios de Bioquímica*. 4a. Edição, Editora Sarvier. 2007.

LI, Y.; TANG, C.; ZHANG, E.; YANG, L. Colistin-entrapped liposomes driven by the electrostatic interaction: Mechanism of drug loading and in vivo characterization. *International Journal of Pharmaceutics*, 2016.

LUO, D.; CARTER, K. A.; RAZI, A.; GENG, J.; SHAO, S.; GIRALDO, D.; LOVELL, J. F. Doxorubicin encapsulated in stealth liposomes conferred with light-triggered drug release. *Biomaterials*, v. 75, p. 193-202, 2016.

LYUBARTSEV, A. P.; RABINOVICH, A. L. Force Field Development for Lipid Membrane Simulations. *Biochimica et Biophysica Acta*. v. 1858, p. 2483–2497, 2016.

MACHADO, A. E. H. Terapia Fotodinâmica: Princípios, potencial de aplicação e perspectivas. *Química Nova*, v. 23, n. 2, p. 237-243, 2000.

MACDONALD, I. J.; DOUGHERTY, T. J. Basic principles of photodynamic therapy. *Journal of Porphyrins Phthalocyanines* v. 5, p.105, 2001.

MAIOROV, V. N. ; CRIPPEN, G. M. Size-independent comparison of protein three-dimensional structures. *Proteins*. v. 22, p. 273–283, 1995.

MALCOLMSON, R. J.; HIGINBOTHAM, J.; BESWICK, P. H.; PRIVAT, P. O.; SAUNIER, L. DSC of DMPC liposomes containing low concentrations of cholesteryl esters or cholesterol. *Journal of membrane science*, v. 123, n. 2, p. 243-253, 1997.

MANNOCK, D. A.; LEWIS, R. N.; MCMULLEN, T. P.; MCELHANEY, R. N. The effect of variations in phospholipid and sterol structure on the nature of lipid–sterol interactions in lipid bilayer model membranes. *Chemistry and physics of lipids*, v. 163, n. 6, p. 403-448, 2010.

MARQUARDT, D.; KUČERKA, N.; WASSALL, S. R.; HARROUN, T. A.; KATSARAS, J. Cholesterol's location in lipid bilayers. *Chemistry and physics of lipids*, v. 199, p. 17-25, 2016.

MARTINEZ-SEARA, H.; RÓG, T.; KARTTUNEN, M.; VATTULAINEN, I.; REIGADA, R. Cholesterol induces specific spatial and orientational order in cholesterol/phospholipid membranes. *PloS one*, v. 5, n. 6, p. e11162, 2010.

MENEZES, H. D. *Efeito da inativação fotodinâmica com fotossensibilizadores fenotiazínicos em microconídios não germinados e germinados dos fungos Fusarium oxysporum, Fusarium moniliforme e Fusarium solani*. Tese de Doutorado em Biociências Aplicadas à Farmácia – USP. Ribeirão Preto, 2017.

MOSCA, M.; CEGLIE, A.; AMBROSONE, L. Effect of membrane composition on lipid oxidation in liposomes. *Chemistry and Physics of Lipids*, v. 164, n. 2, p. 158-165, 2011.

MUEHLMANN, L. A.; MA, B. C.; LONGO J. P.; ALMEIDA-SANTOS M. F.; AZEVEDO, R. B. Aluminum–phthalocyanine chloride associated to poly (methyl vinyl ether-co-maleic anhydride) nanoparticles as a new third-generation photosensitizer for anticancer photodynamic therapy. *International journal of nanomedicine*, v. 9, p. 1199, 2014.

MURADOR, P.; DEFFUNE, E. Aspectos Estruturais da Membrana Eritrocitária. *Revista brasileira de hematologia e hemoterapia*. v. 29, n. 2, p. 168-178, 2007.

NAMBA, A. M.; DA SILVA, V. B.; DA SILVA, C. H. T. P. Dinâmica molecular: Teoria e aplicações em planejamento de fármacos. *Eclética Química*, v. 33, n. 4, p. 13–24, 2008.

NANASHIMA, A.; NAGAYASU, T. Current status of photodynamic therapy in digestive tract carcinoma in Japan. *International journal of molecular sciences*, v. 16, n. 2, p. 3434-3440, 2015.

NEESE, F. The ORCA program system. *Computational Molecular Science*. v. 2, p. 73-78, 2011.

NICHOLLS, P.; MILLER, N. Chloride diffusion from liposomes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, v. 356, n. 2, p. 184-198, 1974.

NIEMELÄ, P. S.; HYVÖNEN, M. T.; VATTULAINEN, I. Atom-scale molecular interactions in lipid raft mixtures. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1788, p. 122–135, 2009.

ODA, K., OGURA, S., OKURA, I. Preparation of a water-soluble fluorinated zinc phthalocyanine and its effect for photodynamic therapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. v. 59, p. 20 – 25, 2000.

OLIVEIRA, C. A.; MACHADO, A. E. H.; PESSINE, F. B. T. Preparation of 100 nm diameter unilamellar vesicles containing zinc phthalocyanine and cholesterol for use in photodynamic therapy. *Chemistry and Physics of Lipids*. v. 133, n. 1, p. 69-78, 2005.

OLIVEIRA, C. A.; KOHN, L. K.; ANTONIO, M. A.; CARVALHO, J. E.; MOREIRA, M. R.; MACHADO, A. E.; PESSINE, F. B. Photoinactivation of different human tumor cell lines and sheep red blood cells in vitro by liposome-bound Zn(II) Phthalocyanine: Effects of cholesterol. *Journal of Photochemistry and Photobiology*. v. 100, p. 92-99, 2010.

OLIVO, M.; BHUVANESWARI, R.; LUCKY, S. S.; DENDUKURI, N.; SOO-PING THONG, P. Targeted therapy of cancer using photodynamic therapy in combination with multi-faceted anti-tumor modalities. *Pharmaceuticals*, v. 3, n. 5, p. 1507-1529, 2010.

OLSEN, B. N.; SCHLESINGER, P. H.; ORY, D. S.; BAKER, N. A. Side-chain oxysterols: from cells to membranes to molecules. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, v. 1818, n. 2, p. 330-336, 2012.

ORMOND, A. B.; FREEMAN, H. S. Dye Sensitizers for Photodynamic Therapy. *Materials*, v. 6, n. 3, p. 817-840, 2013.

PAPAHADJOPOULOS, D.; POSTE, G.; SCHAEFFER, B. E. Fusion of mammalian cells by unilamellar lipid vesicles: influence of lipid surface charge, fluidity and cholesterol. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, v. 323, n. 1, p. 23-42, 1973.

PASENKIEWICZ-GIERULA, M.; BACZYNSKI, K.; MARKIEWICZ, M.; MURZYN K. Computer modelling studies of the bilayer/water interface. *Biochimica et Biophysica Acta*. v. 1858, p. 2305–2321, 2016.

PASZKO, E.; EHRHARDT, C.; SENGE, M. O.; KELLEHER, D. P.; REYNOLDS, J. V. Nanodrug applications in photodynamic therapy. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. v. 8, p. 14-29, 2011.

PAULA, L. F. *Desenvolvimento de Dispositivos de Irradiação Utilizando LED e sua Aplicação à Fotoinativação de Staphylococcus aureus e Trichophyton rubrum*. p. 31. Dissertação de Mestrado em Química – UFU. Uberlândia, 2010.

PERUSSI, J. R. Photodynamic inactivation of microorganisms. *Química nova*, v. 30, n. 4, p. 988-994, 2007.

QI, P.; CAO, M.; SONG, L.; CHEN, C.; LIU, M.; LI, N.; WU, D.; PENG, J.; HU, G.; ZHAO J. The biological activity of cationic liposomes in drug delivery and toxicity test in animal models. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 47, p. 159-164, 2016.

QIAN, N. On the Momentum Term in Gradient Descent Learning Algorithms. *Neural Networks*. v. 12, n. 1, p. 145-151, 1999.

RAAB, O.; Über die Wirkung, fluorescirender Stoffe auf infusorien. *Z. Biol.*, v. 39, p. 524, 1900.

RADU, A.; WAGNIERES, G.; VAN DEN BERGH, H. and MONNIER, P. Photodynamic therapy of early squamous cell cancers of the esophagus. *Gastrointestinal endoscopy clinics of North America*, v. 10, n. 3, p. 439-460, 2000.

RAMEZANPOUR, M.; LEUNG, S. S. W.; DELGADO-MAGNERO, K. H.; BASHE, B. Y. M.; THEWALT, J.; TIELEMAN, D. P. Computational and experimental approaches for investigating nanoparticle-based drug delivery systems. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, v. 1858, n. 7, p. 1688-1709, 2016.

RIBEIRO, J. *Fotofísica e Determinação de Parâmetros Fotodinâmicos da Ftalocianina de Zinco em Meios Homogêneos e Microheterogêneo*. p. 52-59. Dissertação de Mestrado em Química – UFU. Uberlândia, 2003.

RIBEIRO, S. M. R, QUEIROZ, J. H., PELÚZO, M. C .G, COSTA, N. M. B, MATTA, S. L. P, QUEIROZ, M. E. L. R. A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico. *Bioscience Journal*, v.21, n.3, p.133-149, 2005.

RICCI-JÚNIOR, E., MARCHETTI, J. M. Zinc(II) phthalocyanine loaded PLGA nanoparticles for photodynamic therapy use. *International Journal of Pharmaceutics*. v. 310, p. 187-195, 2006.

RITWISSET, A; KRONGSUK, S.; JOHNS, J. R. Molecular structure and dynamical properties of niosome bilayers with and without cholesterol incorporation: A molecular dynamics simulation study. *Applied Surface Science*. v. 380, p. 23–31, 2016.

RÓG, T.;STIMSON, L. S.; PASENKIEWICZ-GIERULA, M.; VATTULAINEN, I.; KARTTUNEN, M. Replacing the Cholesterol Hydroxyl Group with the Ketone Group Facilitates Sterol Flip-Flop and Promotes Membrane Fluidity. *Journal of Physical Chemistry B*, v. 112, p. 1946-1952, 2008.

RÓG, T.; PASENKIEWICZ-GIERULA, M.; VATTULAINEN, I.; KARTTUNEN, M. Ordering effects of cholesterol and its analogues. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, v. 1788, n. 1, p. 97-121, 2009.

RÓG, T.; VATTULAINEN, I. Cholesterol, sphingolipids, and glycolipids: What do we know about their role in raft-like membranes? *Chemistry and Physics of Lipids*, v. 184, p. 82–104, 2014.

SAHOO, S. K.; LABHASETWAR, V. Nanotech approaches to drug delivery and imaging. *Drug discovery today*, v. 8, n. 24, p. 1112-1120, 2003.

SANTOS, N. C., CASTANHO, M. A. R. B. Lipossomas: A bala mágica acertou? *Química Nova*, v. 25, n. 6, p. 1181-1185, 2002.

SIBANI, S. A.; MCCARRON, P. A.; WOOLFSON, A. D.; DONNELLY, R. F. Photosensitiser delivery for photodynamic therapy. Part 2: systemic carrier platforms. *Expert opinion on drug delivery*, v. 5, n. 11, p. 1241-1254, 2008.

SIES, H.; Oxidative Stress: A Concept in Redox Biology and Medicine. *Redox Biology* 4, p.180–183, 2015.

SILVEIRA, L. R. Considerações críticas e metodológicas na determinação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio em células musculares durante contrações. *Arquivo Brasileiro Endocrinologia Metabólica* v.48, n.6, p.812- 822, 2004.

SODT, A. J.; SANDAR, M. L.; GAWRISCH, K.; PASTOR, R. W.; LYMAN, E. The molecular structure of the liquid-ordered phase of lipid bilayers. *Journal of the American Chemical Society*, v. 136, n. 2, p. 725-732, 2014.

STERNBERG, E. D.; DOLPHIN, D.; BRÜCKNER, C. Porphyrin-based photosensitizers for use in photodynamic therapy. *Tetrahedron*, v. 54, n. 17, p. 4151-4202, 1998.

STILTS, C. E.; NELEN, M. I.; HILMEY, D. G.; DAVIES, S. R.; GOLLNICK, S. O.; OSERAFF, A. R.; GIBSON, S. L.; HILF, R. and DETTY, M. R.; Water-soluble, core-modified porphyrins as novel, longer-wavelength-absorbing sensitizers for photodynamic therapy. *Journal of medicinal chemistry*, v. 43, n. 12, p. 2403-2410, 2000.

SZOKA-JUNIOR., F.; PAPAHAADJOPOULOS, D. Comparative properties and methods of preparation of lipid vesicles (liposomes). *Annual review of biophysics and bioengineering*, v. 9, n. 1, p. 467-508, 1980.

TAPPEINER, V.; JODLBAUER A. Über Wirkung der photodynamischen (fluoroieszierenden) Stoffe auf Protozoan und Enzyme. *Disch. Arch Klin Med.* v.80, p. 427-8, 1904.

TORCHILIN, V. P. Targeted pharmaceutical nanocarriers for cancer therapy and imaging. *The AAPS Journal*, v. 9, n. 2, p. E128-E147, 2007.

VALIEV, M.; BYLASKA, E. J.; GOVIND, N.; KOWALSKI, K.; STRAATSMA, T. P.; VAN DAM, H. J. J.; WANG, D.; NIEPLOCHA, J.; APRA, E.; WINDUS, T. L.; de JONG, W. A. NWChem: A comprehensive and scalable open-source solution for large scale molecular simulations. *Computer Physics Communications*, v. 181, n. 9, p. 1477-1489, 2010.

VONARBOURG, A.; PASSIRANI, C.; SAULNIER, P.; BENOIT, J. Parameters influencing the stealthiness of colloidal drug delivery systems. *Biomaterials, Surrey*, v. 27, p.4356-4373, 2006.

WENNBERG, C. L.; VAN DER SPOEL, D.; HUB J. S. Large influence of cholesterol on solute partitioning into lipid membranes. *Journal of the American Chemical Society*. v. 134, p. 5351–5361, 2012.

WILKOSZ, N.; RISSANEN, S.; CYZA, M.; ZYBKA, R.; NOWAKOWSKA, M.; BUNKER, A.; RÓG, T.; KEPCZYNSKI, M. Effect of piroxicam on lipid membranes: Drug encapsulation and gastric toxicity aspects. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 100, n. 30, p. 116–125, 2017.

ZHANG, L.; GU, F. X.; CHAN, J. M.; WANG, A. Z.; LANGER, R. S.; FAROKHZAD, O. C. Nanoparticles in medicine: therapeutic applications and developments. *Clinical pharmacology and therapeutics*, v. 83, n. 5, p. 761-769, 2008.