

AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DA MICROEMULSÃO CONTENDO O FOTOSSENSIBILIZADOR ZnPcSO₄, SOBRE CULTURA DE CÉLULA DE LINHAGEM DE CÂNCER DE MAMA

CYTOTOXICITY EVALUATION OF MICROEMULSION CONTAINING THE PHOTOSSENSIBILIZER ZnPcSO₄ ON BREAST CANCER CELL CULTURE LINE

EVALUACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD DE LA MICROEMULSIÓN QUE CONTIENE EL FOTOSSENSIBILIZADOR ZnPcSO₄ EN LA CULTURA CELULAR DEL CÁNCER DE MAMA

Inys Alexandra Simões de Oliveira*, Fernanda Mori Figueiredo*, Cristhiana Kise Saito*, Marianna Augusta Sansoni Cardoso Gomes*, Fabíola Silva Garcia Praça**, Maria Aparecida Seabra***, Maria Vitória Lopes Badra Bentley****, Wanessa Silva Garcia Medina*****

Resumo

Introdução: O câncer de mama tem alta incidência e mortalidade dentre todos os tipos de câncer e, apesar de todos os avanços tecnológicos recentes, mantém-se ainda como um problema mundial de saúde pública. Novas estratégias terapêuticas, como a Terapia Fotodinâmica, têm sido usadas para tratar vários tipos de tumores de tecidos moles e hiperplasia. **Objetivo:** Caracterizar o efeito citotóxico da microemulsão contendo zinco ftalocianina tetrasulfonada (ZnPcSO₄). **Material e Método:** A microemulsão (ME) foi preparada por adição da fase aquosa (15%) composta de propilenoglicol e água (3:1), em uma mistura de fase oleosa composta pelos surfactantes monooleato de sorbitanol e polissorbato 80 (47%) e óleo de canola (38%). Para o teste de citotoxicidade foi realizado o ensaio de MTT com as células MCF-7 de adenocarcinoma de mama humana. **Resultados:** Os baixos valores de condutividade obtidos (0,63 e 0,53 para ME com e sem ZnPCSO₄, respectivamente) indicaram que a ME era de tipo água/óleo. O diâmetro interno das partículas foi na ordem de 60nm na presença e ausência do ZnPCSO₄ sugerindo que a presença do fotossensibilizante não alterou as propriedades do sistema nanoestruturado. O índice de polidispersividade foi menor do que 0,10, enquanto que a carga superficial da nanopartícula foi negativa, em concordância com as características dos compostos utilizados para o preparo da ME. A atividade metabólica das células não sofreu interferências com as MEs não demonstrando toxicidade significativa; a viabilidade das células tratadas com a ME na presença e ausência do fotossensibilizador foi de 99 e 98% após 1 hora de incubação, e 99 e 93% após 24 horas de incubação, respectivamente, não demonstrando toxicidade intrínseca da formulação. **Conclusão:** A caracterização da ME desenvolvida mostrou que o sistema nanoestruturado contendo ZnPCSO₄ foi em escala nanométrica e com características físicas favoráveis para entrega do ativo, além de demonstrar uma baixa citotoxicidade nas células MCF-7, na ausência da irradiação, para futuros trabalhos. Novos estudos para avaliar a citotoxicidade da formulação na presença da irradiação durante a terapia fotodinâmica serão desenvolvidos.

Palavras-chave: Microemulsão. Terapia fotodinâmica. Câncer de mama. Citotoxicidade.

Abstract

Introduction: Breast cancer has a high incidence and mortality among all types of cancer and, despite all the recent technological advances, still remains a worldwide public health problem. New therapeutic strategies, such as Photodynamic Therapy, have been used to treat various types of soft tissue tumors and hyperplasia. **Objective:** To characterize the cytotoxic effect of the zinc-containing microemulsion containing tetrasulfonated phthalocyanine (ZnPcSO₄). **Material and Method:** The microemulsion (ME) was prepared by addition of the aqueous phase (15%) composed of propylene glycol and water (3: 1), in an oil phase mixture composed by surfactants sorbitanolmonooleate and polysorbate 80 (47%) and canola oil (38%). For the cytotoxicity test, we performed the MTT assay with human breast adenocarcinoma MCF-7 cells. **Results:** The low conductivity values obtained (0.63 and 0.53 for ME, respectively with and without ZnPCSO₄) indicated that ME was water / oil type. The internal diameter of the particles was in the order of 60 nm in the presence and absence of ZnPCSO₄, suggesting that the presence of the photosensitizer did not alter the properties of the nanostructured system. The polydispersity index was lower than 0.10, while the surface charge of the nanoparticle was negative, in agreement with the characteristics of the compounds used to prepare the ME. The metabolic activity of the cells did not interfere with the MEs, showing no significant toxicity, the viability of the cells treated with ME in the presence and absence of the photosensitizer was 99 and 98%, after 1 hour of incubation and 99 and 93%, after 24 hours of incubation, respectively, showing no intrinsic toxicity of the formulation. **Conclusion:** The characterization of the developed ME showed that the nanostructured system containing ZnPCSO₄ was at nanometric scale and with favorable physical characteristics for the delivery of the active, besides of demonstrating a low cytotoxicity in the MCF-7 cells, in the absence of irradiation, for future works. Further studies will be performed to assess the cytotoxicity of the formulation in the presence of irradiation during Photodynamic Therapy.

Keywords: Microemulsion. Photodynamic therapy. Breast neoplasms. Cytotoxicity.

Resumen

Introducción: El cáncer de mama tiene alta incidencia y mortalidad entre todos los tipos de cáncer y, a pesar de todos los avances tecnológicos recientes, sigue siendo un problema mundial de salud pública. Nuevas estrategias terapéuticas, como la Terapia Fotodinámica, se han utilizado para tratar varios tipos de tumores de tejidos blandos e hiperplasia. **Objetivo:** Caracterizar el efecto citotóxico de la microemulsión que contiene el cinc ftalocianina tetrasulfonada (ZnPcSO₄). **Material y método:** La microemulsión (ME) fue preparada por adición de la fase acuosa (15%) compuesta de propilenglicol y agua (3: 1), en una mezcla de fase oleosa compuesta por los surfactantes monooleato de sorbitanol y polisorbato 80 (47%), Y el aceite de canola (38%). Para la prueba de citotoxicidad se realizó el ensayo de MTT con las células MCF-7 de adenocarcinoma de mama humana. **Resultados:** Los bajos valores de conductividad obtenidos (0,63 y 0,53 para ME con y sin ZnPCSO₄, respectivamente) indicaron que la ME era de tipo agua / aceite. El diámetro interno de las partículas fue en el orden de 60 nm en la presencia y ausencia del ZnPCSO₄ sugiriendo que la presencia del fotossensibilizante no alteró las propiedades del sistema nanoestructurado. El índice de polidispersividad fue menor de 0,10, mientras que la carga superficial de la nanopartícula fue negativa, en concordancia con las características de los compuestos utilizados para la preparación de la ME. La actividad metabólica de las células no ha sufrido interferencias con las ME no demostrando toxicidad significativa; La viabilidad de las células tratadas con la ME en presencia y ausencia del fotossensibilizador fue de 99 y 98% después de 1 hora de incubación, y 99 y 93% después de 24 horas de incubación, respectivamente, no demostró toxicidad intrínseca de la formulación. **Conclusión:** La caracterización de la ME desarrollada mostró que el sistema nanoestructurado que contenía ZnPCSO₄ fue a escala nanométrica y con características físicas favorables para la entrega del activo, además de demostrar una baja citotoxicidad en las células MCF-7, en ausencia de la irradiación, para futuros trabajos. Se desarrollarán nuevos estudios para evaluar la citotoxicidad de la formulación en presencia de la irradiación durante la terapia fotodinámica.

Palabras clave: Microemulsión. Terapia fotodinámica. Neoplasias de la mama. Citotoxicidad.

* Graduandas do curso de Medicina das Faculdades Integradas Padre Albino (FIPA), Catanduva-SP.

** Biomédica, doutora em Toxicologia pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-FCFRP-USP; dois pós-doutorados em Ciências Farmacêuticas pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-FCFRP-USP. Professora nível I da disciplina de Farmacologia do curso de Medicina; de Farmacologia, Toxicologia, Uroanálises e Biofísica do curso de Biomedicina; e de Farmacologia do curso de Enfermagem das Faculdades Integradas Padre Albino (FIPA), Catanduva-SP. Contato: wasigame@gmail.com

***Química, pós-graduada - mestrado em Bioquímica pela Kansas State University e doutorado em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Pernambuco. Pesquisadora no LIKA - UFPE

****Farmacêutica, pós-graduada (mestrado e doutorado) em FÁRMACOS e MEDICAMENTOS pela Universidade de São Paulo – USP. Diretora da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto.

*****Biomédica, pós-graduação (mestrado e doutorado) em Ciências Farmacêuticas pela Universidade de São Paulo FCFRP-USP e pós-doutorado no Research Institute for Medicines and Pharmaceutical Sciences – Nanomedicine and Drug Delivery Systems (IMED) na Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa (Portugal). Especialista de laboratório contratada pela Universidade de São Paulo - USP e atua como pesquisadora na área de Sistema de Liberação de drogas.

INTRODUÇÃO

O câncer de mama é um problema mundial de saúde para as mulheres, é o primeiro na incidência e o segundo na mortalidade entre todos os tipos de câncer, mesmo com todos os avanços tecnológicos recentes¹. Realizar uma intervenção precoce é importante, pois um grande número de pacientes ainda apresenta recidiva, mesmo após anos de cura aparente. Os desafios no combate à doença dependem das propriedades intrínsecas de resistência tumoral, heterogeneidade molecular e metástase¹⁻³.

Os subtipos moleculares dos cânceres da mama são definidos com base na presença de receptores de estrogênio (RE), receptores de progesterona (RP) e receptor-2 do fator de crescimento epidérmico humano (REH2). Cerca de 20% dos cânceres de mama são negativos para a expressão de RE, RP e REH2 (câncer de mama triplo-negativo, CMTN), exibindo características patológicas agressivas e altas taxas de metástases e recorrência⁴⁻⁶. Para os pacientes com CMTN, a única opção atual é uma quimioterapia não-direcionada e/ou radioterapia para estender a sobrevivência dos pacientes, mas não previne com segurança uma doença secundária⁷.

A terapia fotodinâmica (TFD) é um tratamento alternativo promissor para o controle de doenças malignas⁸⁻¹⁰. TFD é baseada na fotooxidação da matéria biológica; o tratamento envolve a captação de um fotossensibilizador (Fs) seguido de iluminação com luz de um comprimento de onda apropriado, capaz de excitar os Fs e desencadear reações fotoquímicas que geram espécies reativas de oxigênio, tais como oxigênio singlete (¹O₂) e radicais que conduzem à morte celular¹¹. As vantagens da TFD em comparação com cirurgia, quimioterapia ou radioterapia são a redução da morbidade em longo prazo e o fato de que a TFD não compromete outras opções de tratamento¹¹. Esta terapia tem sido utilizada como uma modalidade de tratamento experimental em muitos países para diversos tipos de cânceres^{12,13}.

Em particular para os tumores não superficiais, a TFD parece promissora no tratamento de tipos de cânceres de elevada recorrência. Recentemente foi demonstrado que a TFD em combinação com a cirurgia em câncer do pâncreas humano implantado ortotopicamente num modelo de rato (sem pelo) era altamente eficaz na eliminação de doenças microscópicas no leito tumoral pós-

cirúrgico, bem como na prevenção de recorrência local e metastática^{14,15}.

Por uma variedade de razões, dentre elas a falta de estudos sobre sua eficácia e segurança, bem como de informações mecanísticas detalhadas, a TFD não é um tipo comum de tratamento^{12,16,17}. Para superar este cenário, muitos estudos usando TFD como foco no aumento da eficiência Fs ou no desenvolvimento de TFD baseado em marcadores estão sendo desenvolvidos^{18,19}. No entanto, devido à complexidade dos sistemas biológicos e possíveis alvos biológicos desconhecidos, os detalhes de como a TFD opera ainda são indescritíveis^{13,20}. Várias abordagens também têm sido desenvolvidas usando derivados de fenotiazínio, como o azul de metileno (AM), como uma nova estratégia de tratamento, levando a um como o protocolo com TFD que é eficiente e também barato²¹⁻²⁵. Além do baixo custo e disponibilidade comercial, o uso de AM também é interessante porque tem sido usado com segurança por décadas em outras aplicações clínicas^{21,22,26,27}.

As ftalocianinas fazem parte de outra classe de Fs que têm atraído muito interesse em função das vantagens em comparação com 5-ALA²⁸, que incluem: i) a retenção seletiva em tecido de tumor; ii) facilidade de síntese; iii) resistência à degradação química e fotoquímica; iv) a vida longa no estado tripletefotoexcitados (fundamental para a produção de oxigênio reativo); e v) baixa toxicidade no escuro²⁹⁻³¹. Dentro desta classe, temos a zincoftalocianinatetrasulfonada (ZnPcSO₄), que é um Fs eficaz, uma vez que tem seu pico de absorção dentro de um comprimento de onda de ótima penetração tecidual, em 670nm^{32,33}.

A ZnPcSO₄, um derivado de ftalocianinas, solúvel em água, apresenta características adequadas para tratamentos fotobiológicos³⁴; possui um fator limitante quanto à penetração celular, pois o seu peso molecular é elevado (898,15)³⁵. Outro fator limitante é a autoagregação, resultante da grande estrutura hidrofóbica da ZnPcSO₄, por uma forte tendência do composto para formar dímeros, especialmente em meios aquosos. A autoagregação de ftalocianinas reduz sua eficiência para a produção de espécies reativas de oxigênio^{32,33}.

A fim de ser empregado com sucesso na FDT, o Fs deve combinar baixa toxicidade intrínseca (escuro) com alta fototoxicidade^{33,36}. Sendo assim, foram caracterizadas

as microemulsões carreadoras de ZnPcSO₄, sabendo que a efetividade da TFD depende de, entre outros fatores, da entrega e acúmulo de fotossensibilizadores nas células-alvo.

MATERIAL E MÉTODO

Aspectos químicos

A ZnPcSO₄ de alta pureza foi comprada da Frontier Scientific. Polissorbato 80, HLB = 15,0; monooleato de sorbitano, HLB = 4,3; propilenoglicol (PG) e polietileno glicol (PEG; grau técnico) foram adquiridos da Sigma - Aldrich (St. Louis, MO, EUA). O óleo de canola de grau alimentício (Cargill, São Paulo-SP, Brasil) foi adquirido de um supermercado local. Dimetil sulfoxido (DMSO; grau analítico) foi adquirido da Merck (Darmstadt, Alemanha). Água foi purificada por destilação dupla e desionizada utilizando o sistema *Millipore Milli-Q®* água (*Millipore Corporation*, Bedford, EUA). Todas as substâncias foram utilizadas sem purificação adicional.

Preparação e caracterização da formulação

Preparação da ME

A ME foi preparada pela adição de fase aquosa (15%), que foi composta por PG/água (3:1, A/A), a uma mistura de monooleato desorbitano e polissorbato 80 (47%) a 3:1 (a/a) e óleo de canola (38%). A formulação foi submetida à vortex a 2500 rpm por 3 min à 25°C. Para preparar a microemulsão carreadora da droga, 27 µL/mL de uma solução de reserva contendo 500 µg/mL de ZnPcSO₄ em DMSO foi adicionada à fase oleosa (surfactantes + óleo de canola), antes da adição da fase aquosa. A concentração final de ZnPcSO₄ na ME foi de 6,7 µg/mL³⁷.

Caracterização físico-química da ME

Condutividade elétrica

A condutividade elétrica da ME livre e da ME contendo ZnPcSO₄ a 6,7 µg/mL foi medida utilizando-se um medidor de condutividade, modelo CD-20 (Digimed, São Paulo-SP, Brasil). Para as medições de condutividade, as MEs foram preparadas usando-se 0,01M de cloreto de sódio aquoso em vez de água destilada.

Espalhamento dinâmico de luz e potencial Zeta

As soluções de ME livre e da ME contendo ZnPcSO₄

a 6,7 µg/mL foram submetidas a medições de dispersão de luz a 25°C utilizando-se um sistema Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Worcestershire, Reino Unido), contendo um sistema de laser de 4mW He-Ne operando a um comprimento de onda de 633nm e incorporando retroespalhamento óptico não-invasivo (NIBS). As medições foram feitas em um ângulo de detecção de 173°; a posição de medição no interior do cuvette foi determinada automaticamente pelo *software*. Doze medidas foram realizadas para cada amostra. O índice de refração para a ME livre e contendo ZnPcSO₄ foi fixado em 1.464. As medições da mobilidade eletroforética das partículas foram realizadas usando o mesmo instrumento. O Zetasizer Nano Series utiliza uma combinação de velocimetria de laser Doppler e espalhamento de luz análise de fase (PALS) em uma técnica patenteada chamada M3 PALS. As amostras foram diluídas em 10 mM de NaCl. Vinte e duas medições foram realizadas com cada amostra.

Cultura de células

A linhagem de células de adenocarcinoma de mama humana MCF-7 (ATCC HTB-22™) foi mantida em meio de Dulbecco Modified Eagle / F-12 Ham (DMEM-F12; Sigma-Aldrich) suplementado com 10% de soro fetal bovino termicamente inativado (FBS) (*Vitrocell Embriolife*). As culturas foram mantidas a 37°C sob a atmosfera saturada de água contendo 5% de CO₂.

Avaliação da citotoxicidade

Para os ensaios nas culturas de células foram semeadas células (2x10⁵/cm²) nas placas com 24 poços em meio DMEM e o ensaio MTT foi realizado de acordo com Maysinger et al. e mantido durante 24 horas³⁸. Após os tratamentos, todos os ensaios foram também realizados em meio suplementado com soro a 2,5%. Em seguida, cada meio foi aspirado e adicionaram-se 500 µl de novo meio a 6 poços (controle) e adicionaram-se 450 µl de novo meio mais 50 µl de amostra da ME na ausência do FBS e ME, contendo ZnPcSO₄ (diluída 1:10) aos outros poços. As placas foram incubadas a 37°C e 5% de CO₂ durante 1 h e 24 h. Adicionou-se solução mãe de MTT (5 mg/mL) a cada poço e incubou-se a 37°C e 5% de CO₂ durante 2-5 h (sob inspeção até a alteração da cor). O meio foi removido suavemente e o DMSO foi adicionado a cada poço e pipetado para cima e para baixo para dissolver cristais.

As placas foram incubadas durante 5-30 minutos a 37°C e lidas a $\lambda = 550\text{nm}$ utilizando um leitor de microplacas de referência Dynex MRX Revelation Plate Reader, Chantilly, VA, EUA.

Análise estatística

Os resultados são apresentados como médias \pm DP. Os dados foram analisados estatisticamente por meio de testes não paramétricos. Foi utilizado o teste Mann-Whitney para comparar dois grupos experimentais. O nível de significância foi estabelecido em $p < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em estudos anteriores, Peixoto et al.³⁹ realizaram a caracterização de microemulsões carreadores de ZnPcSO₄ e conforme as avaliações anteriores de nosso

grupo, escolheu-se a melhor formulação. A ZnPcSO₄ foi incorporada em DMSO de modo que se obtivesse uma concentração final de 6,7 $\mu\text{g/ml}$. A microemulsão composta por 38% de óleo de canola, 47% de surfactantes mistos e 15% PG/água manteve sua estabilidade física após a incorporação da ZnPcSO₄. A adição de ZnPcSO₄ não alterou a estabilidade física da microemulsão após a centrifugação ou após três meses de armazenamento à temperatura ambiente. A visualização microscópica durante esse período demonstrou a permanência da fase isotrópica. A Tabela 1 mostra os resultados da caracterização físico-química da microemulsão na ausência e na presença do fotossensibilizador ZnPcSO₄. Não houve diferença estatística ($p < 0,05$) entre as microemulsões na ausência e contendo ZnPcSO₄ em todos os parâmetros físico-químicos analisados.

Tabela 1 - Propriedades físico-químicas de microemulsão livres e carregadas, compostas de 38% óleo de canola, 47% de surfactantes mistos monooleato de sorbitano/polissorbatato 80 (3:1) e 15% de PG/água (3:1)

Parâmetros	Microemulsão livre	Microemulsão contendo ZnPCSO ₄
Condutividade ($\mu\text{S.m}^{-1}$)*	0,63 \pm 0,04	0,33 \pm 0,03
Potencial Zeta (mV)*	-15,7 \pm 0,15	-23,8 \pm 0,06
Zmédia* (nm)*	20,7 \pm 0,60	15,5 \pm 0,15
Índice de Polidispersividade index*	0,10 \pm 0,05	0,05 \pm 0,04

* Cada valor é a média de três experiências diferentes \pm DP

Parâmetros	Microemulsão livre	Microemulsão contendo ZnPCSO ₄
Condutividade ($\mu\text{S.m}^{-1}$)*	0,63 \pm 1,4	0,53 \pm 1,3
Potencial Zeta (mV)*	-15,7 \pm 1,5	-13,8 \pm 1,3
Zmédia* (nm)*	18.5 \pm 1.5	20.7 \pm 2.6
Índice de Polidispersividade index*	0,10 \pm 0,05	0,05 \pm 0,04

Em virtude da natureza dinâmica e ao pequeno tamanho de agregados tensoativos nas microemulsões (tipicamente menores do que 100 nm de diâmetro), o exame direto da estrutura das microemulsões é difícil, e técnicas de medição indireta, tais como a condutividade elétrica e os estudos reológicos, são usualmente empregadas para obter informações básicas sobre sua estrutura interna^{39,40}. Foram obtidos resultados que indicam que a microemulsão era de tipo A/O, os baixos valores de condutividade, na série de 10-5S/m, e baixa concentração da fase dispersa; microemulsão de água contínua têm condutividade relativamente elevada, em comparação com sistemas

óleo-contínuos (A/O)⁴¹, entretanto a adição de ZnPcSO₄ não alterou significativamente ($p < 0,05$) a condutividade de nossa ME.

Sabe-se que a condutividade de microemulsão A/O podem ser relativamente elevada (na série de 10-6-10-5S/m), quando comparada com a condutividade típica de solventes apolares (10-16-10-12S/m). Os diâmetros de tamanho de partículas em microemulsão livres e carregadas com fármaco foram caracterizados como pequenos (18,5nm e de 20,7nm, respectivamente) e sua distribuição de tamanho muito estreito, tal como determinado por análise de dispersão de luz cumulativa.

As microemulsões também constituíram populações homogêneas em relação à superfície de propriedades de carga. Observou-se que as MEs são constituídas por partículas homogêneas (monodispersos), em consequência da baixa polidispersidade; após a adição de ZnPcSO₄ não sendo observadas alterações significativas (pb 0,05) na polidispersidade. Após a adição de ZnPcSO₄ verificou-se que a média Z (nm) foi ligeiramente, mas não significativamente (pb 0,05), aumentada para 20nm, indicando que o fármaco, em razão de sua natureza hidrofílica, foi incorporado na fase dispersa. O potencial de análise Zeta produziu um valor negativo e a adição de Fs não alterou significativamente (pb 0,05) as propriedades de superfície elétrica das gotículas de ME.

Com a caracterização da formulação, a microemulsão pode ser sugerida como um potencial sistema de entrega no tratamento fotodinâmico para o câncer de mama, sendo assim, foi feita a avaliação da citotoxicidade da ME na presença e ausência da ZnPcSO₄, sendo observado que a citotoxicidade intrínseca da formulação é muito baixa, na ausência ou presença do Fs (Tabela 2).

Tabela 2 – Avaliação da citotoxicidade das microemulsões na ausência e presença da ZnPcSO₄, compostas de 38% óleo de canola, 47% de surfactantes mistos monooleato de sorbitano/polissorbato 80 (3:1) e 15% de PG /água (3:1) após 1 e 24 horas de incubação e 50µL de cada amostra diluída 1:10 com água

	Após 1 hora de incubação	Após 24 horas de incubação
Controle sem ME	1,94746* (100,0%)	1,90631* (100,0%)
ME sem ZnPcSO₄	1,93671* (99,44%)	1,89438* (99,37%)
ME com ZnPcSO₄	1,91359* (98,26%)	1,79064* (93,93%)

* Cada valor é a média de três experiências diferentes.

Desenvolveu-se a ME utilizando materiais biocompatíveis, pois demonstra inércia biológica através de métodos *in vitro* e *in vivo*^{42,43}. O uso de ME lipídico para aumentar o efeito anticancerígeno dos inúmeros ingredientes farmacêuticos ativos tem sido bem documentado^{44,45}. A eficácia de transfecção da ME como uma composição anticancerígena pode ser atribuída à presença da fase oleosa para a captação celular melhorada da ME carregadora da ZnPcSO₄. Estas propriedades também podem perturbar a integridade da membrana celular e promover a acumulação dos Fs na célula. Assim, a presença da fase oleosa na formulação ajuda ainda mais na captação das ME.

Os resultados deste estudo indicam que a atividade metabólica das células não sofreu interferências com as MEs, não demonstrando toxicidade significativa. A viabilidade das células tratadas com a ME na ausência e presença do fotossensibilizador foi de 99 e 98%, após 1 hora de incubação e 99 e 93%, após 24 horas de incubação, respectivamente, não demonstrando toxicidade intrínseca da formulação.

CONCLUSÃO

A caracterização da ME desenvolvida mostrou que o sistema nanoestruturado contendo ZnPcSO₄ foi em escala nanométrica e com características físicas favoráveis para entrega do ativo, além de demonstrar uma baixa citotoxicidade nas células MCF-7, na ausência da irradiação. Futuramente será avaliada a citotoxicidade da formulação na presença da irradiação, durante a terapia fotodinâmica.

REFERÊNCIAS

1. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2015. *CA Cancer J Clin.* 2015; 65:5-29.
2. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011; 144:646-74.
3. Gomes LR, Terra LF, Sogayar MC, Labriola L. Epithelial-mesenchymal transition: implications in cancer progression and metastasis. *Curr Pharm Biotechnol.* 2011; 12(11):1881-90.
4. Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature.* 2012; 490(7418):61-70.
5. Panzarini E, Inguscio V, Fimia GM, Dini L. Rose Bengal acetate photodynamic therapy (RBAC-PDT) induces exposure and release of Damage-Associated Molecular Patterns (DAMPs) in human HeLa cells. *PLoS One.* 2014; 9(8):e105778.
6. Paul A, Gunewardena S, Stecklein SR, Saha B, Parelkar N, Danley M, et al. PKC κ /i signaling promotes triple-negative breast cancer growth and metastasis. *Cell Death Differ.* 2014; 21(9):1469-81.
7. Eckhardt BL, Francis PA, Parker BS, Anderson RL. Strategies for the discovery and development of therapies for metastatic breast cancer. *Nat Rev Drug Discov.* 2012;11(6):479-97.
8. Rizvi I, Celli JP, Evans CL, Abu-Yousif AO, Muzikansky A, Pogue BW, et al. Synergistic enhancement of carboplatin efficacy with photodynamic therapy in a three-dimensional model for micrometastatic ovarian cancer. *Cancer Res.* 2010; 70(22):9319-28.
9. Ahn TG, Lee BR, Choi EY, Kim DW, Han SJ. Photodynamic therapy for breast cancer in a BALB/c mouse model. *J Gynecol Oncol.* 2012; 23(2):115-9.
10. Montazerabadi AR, Sazgarnia A, Bahreyni-Toosi MH, Ahmadi A, Shakerizadeh A, Aledavood A. Mitoxantrone as a prospective photosensitizer for photodynamic therapy of breast cancer. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2012; 9(1):46-51.

11. Acedo P, Stockert JC, Cañete M, Villanueva A. Two combined photosensitizers: a goal for more effective photodynamic therapy of cancer. *Cell Death Dis.* 2014; 5:e1122.
12. Agostinis P, Berg K, Cengel KA, Foster TH, Girotti AW, Gollnick SO, et al. Photodynamic therapy of cancer: an update. *CA Cancer J Clin.* 2011; 61(4):250-81.
13. Simone CB, Friedberg JS, Glatstein E, Stevenson JP, Serman DH, Stephen M, et al. Photodynamic therapy for the treatment of non-small cell lung cancer. *J Thorac Dis.* 2012; 4(1):63-75.
14. Maawy AA, Hiroshima Y, Zhang Y, Garcia-Guzman M, Luiken GA, Kobayashi H, et al. Photoimmunotherapy lowers recurrence after pancreatic cancer surgery in orthotopic nude mouse models. *J Surg Res.* 2014; 197(1):5-11.
15. Maawy AA, Hiroshima Y, Zhang Y, Heim R, Makings L, Garcia-Guzman M, et al. Near infra-red photoimmunotherapy with Anti-CEA-IR700 results in extensive tumor lysis and a significant decrease in tumor burden in orthotopic mouse models of pancreatic cancer. *PLoS One.* 2015; 10(3):e0121989.
16. Allison RR, Sibata CH. Oncologic photodynamic therapy photosensitizers: a clinical review. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2010; 7(2):61-75.
17. Celli JP, Spring BQ, Rizvi I, Evans CL, Samkoe KS, Verma S, et al. Imaging and photodynamic therapy: mechanisms, monitoring, and optimization. 2010; 110(5):2795-838.
18. Plaetzer K, Krammer B, Berlanda J, Berr F. Photophysics and photochemistry of photodynamic therapy: fundamental aspects. *Lasers Med Sci.* 2009; 24(2):259-68.
19. Bacellar I, Tsubone T, Pavani C, Baptista M. Photodynamic efficiency: from molecular photochemistry to cell death. *Int J Mol Sci.* 2015; 16(9):20523-59.
20. Itri R, Junqueira HC, Mertins O, Baptista MS. Membrane changes under oxidative stress: the impact of oxidized lipids. *Biophys Rev.* 2014; 6(1):47-61.
21. Tardivo JP, Adami F, Correa JA, Pinhal MAS, Baptista MS. A clinical trial testing the efficacy of PDT in preventing amputation in diabetic patients. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2014; 11(3):342-50.
22. Wagner M, Suarez ER, Theodoro TR, Machado Filho CDAS, Gama MFM, Tardivo JP, et al. Methylene blue photodynamic therapy in malignant melanoma decreases expression of proliferating cell nuclear antigen and heparanases. *Clin Exp Dermatol.* 2012; 37(5):527-33.
23. Song D, Lindoso AL, Oyafuso LK, Cardoso L, Uchoa AF. Photodynamic therapy using methylene blue to treat cutaneous leishmaniasis. *Photomed Laser Surg.* 2011; 29(10):711-5.
24. Tardivo JP, Del Giglio A, Paschoal LH, Baptista MS. New photodynamic therapy protocol to treat AIDS-related Kaposi's sarcoma. *Photomed Laser Surg.* 2006; 24(4):528-31.
25. Tardivo JP, Del Giglio A, De Oliveira CS, Gabrielli DS, Junqueira HC, Tada DB, et al. Methylene blue in photodynamic therapy: from basic mechanisms to clinical applications. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2005; 2(3):175-91.
26. Schirmer RH, Adler H, Pickhardt M, Mandelkow E. Lest we forget you-methylene blue. *Neurobiol Aging.* 2011 Dec; 32(12):2325.e7-16.
27. Oz M, Lorke DE, Hasan M, Petroianu GA. Cellular and molecular actions of methylene blue in the nervous system. *Med Res Rev.* 2011; 31(1):93-117.
28. Zhang X, Jiang F, Kalkanis SN, Yang H, Zhang Z, Katakowski M, Hong X, et al. Combination of surgical resection and photodynamic therapy of 9 L gliosarcoma in the nuderat. *Photochem Photobiol.* 2006; 82(6):1704-11.
29. Oleinick NL, Evans HH. The photobiology of photodynamic therapy: cellular targets and mechanisms. *Radiat Res.* 1998; (5 Suppl.):S146-56.
30. Lam M, Oleinick NL, Nieminen AL. Photodynamic therapy-induced apoptosis in epidermoid carcinoma cells. Reactive oxygen species and mitochondria linner membrane permeabilization, *J Biol Chem.* 2001; 276(50):47379-86.
31. Madsen SJ, Angell-Petersen E, Spetalen S, Carper SW, Ziegler SA, Hirschberg H. Photodynamic therapy of new lyimplanted glioma cells in the rat brain. *Lasers Surg Med.* 2006; 38:540-8.
32. Huang G, Xu Y, Peng H, Lin X, Zheng M, Xie. Zinc phthalocyanine tetrasulfonate (ZnPcS₄): a new photosensitizer for photodynamic therapy in choroidal neovascularization. *J Ocul Pharmacol Ther.* 2007; 23(4):377-86.
33. Schmidt MH, Meyer GA, Reichert KW, Cheng J, Krouwer HG, Ozker K, et al. Evaluation of photodynamic therapy near function albrant issue in patients with recurrent brain tumors. *J Neurooncol.* 2004; 67(1-2):201-7.
34. Sibata CH, Colussi VC, Oleinick NL, Kinsella TJ. Photodynamic therapy: a new concept in medical treatment. *Braz J Med Biol Res.* 2000; 33(8):869-80.
35. Liu W, Chen N, Jin H, Huang J, Wei J, Bao J, et al. Intravenous repeated-dose toxicity study of ZnPcS₂ P₂-based-photodynamic therapy in beagle dogs. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2007; 47(2007): 221-31.
36. Kolárová H, Mosinger J, Lenobel R, Kejlová K, Jírová D, Strnad M. In vitro toxicity testing of supramolecular sensitizers for photodynamic therapy. *Toxicol In Vitro.* 2003 Oct-Dec; 17(5-6):775-8.
37. Rossetti FC, Lopes LB, Carollo ARH, Thomazini JA, Tedesco AC, Bentley MVLB. A delivery system to avoid self-aggregation and to improve in vitro and in vivo skin delivery of a phthalocyanine derivative used in the photodynamic therapy. *J Control Release.* 2011; 155(3):400-8.
38. Maysinger D, Lovric J, Eisenberg A, Savic R. Fate of micelles and quantum dots in cells. *Eur J Pharm Biopharm.* 2007; 65(3):270-81.
39. Peixoto C, Praça FSG, Bentley MVLB, Medina WSG. Caracterização de microemulsões, carreadoras de zinco ftalocianina tetrassulfonada (ZnPcSO₄), utilizados na terapia fotodinâmica do câncer de pele, uso tópico. *Ciênc Pesq Consciênc Rev Med.* 2016; 8(1):13-7.
40. Strey R. Microemulsion microstructure. *Euro Cosmet.* 1996; 10:39-46.
41. Kahlweit M, Strey R, Haase D, Kunieda H, Schmeling T, Faulhaber B, et al. How to study microemulsions. *J Colloid Interface Sci.* 1987; 118(2):436-53.
42. Bumajdad A, Eastoe J. Conductivity of water-in-oil microemulsions stabilized by mixed surfactants. *J Colloid Interface Sci.* 2004; 274(1):268-76.
43. How CW, Rasedee A, Manickam S, Rosli R. Tamoxifen-loaded nanostructured lipid carrier as a drug delivery system: characterization, stability assessment and cytotoxicity. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2013; 112:393-9.
44. Rahman HS, Rasedee A, Othman HH, Chartrand MS, Namvar F, Yeap SK, et al Acute toxicity study of zerumbone-loaded nanostructured lipid carrier on BALB/c mice model. *Biomed Res Int.* 2014; 2014:563930.
45. Kuo YC, Cheng SJ. Brain targeted delivery of carmustine using solid lipid nanoparticles modified with tamoxifen and lactoferrin for antitumor proliferation. *Int J Pharm.* 2016; 499(1-2):10-9.

Recebido em: 18/12/2016

Aceito em: 24/03/2017