



UNIVERSIDADE D  
COIMBRA

Ana Carolina Frade Melo

**SISTEMAS DE NANOPARTÍCULAS DE BASE LIPÍDICA  
PARA A ENTREGA DE ÁCIDOS NUCLEICOS**

Dissertação no âmbito do mestrado em Química Medicinal orientada pela  
Doutora Lígia Catarina Gomes da Silva e apresentada ao Departamento de  
Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra

Setembro de 2022



# Agradecimentos

Esta tese de mestrado é o culminar de uma etapa que a tantas sucedeu e tantas antecede, inexoravelmente... contudo esta etapa não seria possível ser realizada sem o apoio de muitos aos quais desde já agradeço a colaboração e partilha de conhecimentos e incentivo ao espírito autodidata, crítico, de investigação e partilha de conhecimentos com pessoas cuja a formação se diferencia da minha, o que me permitiu desenvolver capacidades, consolidar conhecimentos e receber uma diversidade de novos saberes.

Obrigada à Doutora Lúcia Silva, ao Professor Doutor Luis Arnaut, ao Doutor Fábio Schaberle e à equipa de investigação de fotobiologia que integrei e me acolheu desde início fraternamente.

Esta tese não teria sido terminada sem todos estes passos.

Aos meus colegas, camaradas e amigos Alessandra Ferreira, João Pereira, Patrícia Matos, Catarina Urânia, Cláudia Carvalho, Luís Rodrigues e João Silvestre, pela ajuda, apoio e disponibilidade e partilha de conhecimentos que contribuíram para o culminar desta etapa.

Aos meus pais e irmãos Joel, Diogo, Daniela e Inês que sempre tiveram uma palavra de incentivo, presenciando e partilhando inúmeros momentos ao longo desta etapa de vida.

Cumpre-me ainda agradecer por fim, mas não menos importante, às pessoas que me acompanharam e despenderam do seu tempo, tendo sempre uma palavra de incentivo, apoio e com as quais partilhei conhecimentos, deixo o meu sincero e fraterno agradecimento. Sem eles nada seria possível.

Dedico esta tese aos que já não estão mas fazem parte de mim...

# Índice

---

|   |      |
|---|------|
| Agradecimentos .....  | III  |
| Índice de Figuras .....   | VI   |
| Índice de Tabelas .....   | VIII |
| Resumo .....  | X    |
| Abstract .....  | XII  |
| 1 Processo tumorigénico e prevalência de cancro no mundo .....  | 14   |
| 2 Terapia génica para o tratamento do cancro: potencial e desafios .....  | 17   |
| 3 Estratégias de entrega de ácidos nucleicos .....  | 19   |
| 3.1 Nanopartículas à base de lípidos .....  | 19   |
| 3.2 Composição das nanopartículas lipídicas .....   | 21   |
| 3.3 Mecanismo de formação de lipossomas pelo método de injeção de etanol .....  | 24   |
| 4 Libertação controlada e estimulada pela luz .....   | 26   |
| 4.1 Terapia fotodinâmica como estratégia para potenciar a libertação endossomal .....   | 26   |
| 4.2. Mecanismo da terapia fotodinâmica .....  | 28   |
| 4.3 Fotossensibilizadores: Estruturas tetrapirrólicas .....   | 29   |
| 5. Materiais e métodos .....  | 32   |
| 5.1 Materiais .....   | 32   |
| 5.2 Métodos .....   | 32   |
| 5.2.1 Preparação dos stocks de lípidos, Luz51b e calceína .....   | 32   |
| 5.2.2 Preparação das soluções tampão .....  | 33   |
| 5.2.3 Preparação de lipossomas pelo método de hidratação do filme lipídico .....  | 33   |
| 5.2.4 Preparação de lipossomas pelo método de injeção de etanol .....   | 34   |
| 5.2.5 Caracterização dos lipossomas .....   | 35   |
| 5.2.6 Avaliação da libertação de calceína após irradiação a 740 nm .....  | 36   |
| 6 Resultados .....  | 38   |
| 6.1. Otimização e caracterização de nanopartículas lipídicas para a encapsulação de calceína e preparados pelo método de hidratação do filme lipídico ..... | 38   |
| 6.2 Otimização e caracterização de lipossomas preparados pelo método de injeção de etanol .....   | 41   |
| 6.3. Preparação e caracterização de lipossomas para a encapsulação de calceína (meio aquoso) e LUZ51b (membrana lipídica) .....                             | 43   |

|  |    |
|--|----|
| 6.3.1 Lipossomas preparados com uma quantidade inicial de 50 nmol de LUZ51b: Formulação LUZ51b-50.....   | 44 |
| 6.3.2 Lipossomas preparados com uma quantidade inicial de 100 nmol de LUZ51b: Formulação LUZ51b-100..... | 48 |
| 6.3.3 Lipossomas preparados com uma quantidade inicial de 150 nmol de LUZ51b: Formulação LUZ51b-150..... | 51 |
| 6.4.1 Resultados obtidos com Lipossomas com DOPC .....   | 56 |
| Conclusão .....  | 60 |
| Referências .....  | 61 |

# Índice de Figuras

|   |    |
|---|----|
| Figura 1: Representação esquemática de Small Silencing RNAs.....  | 17 |
| Figura 2: Estrutura do 1,2-dioleoil-3-dimetilamônio-propano (DODAP) que foi o lípido catiónico usado no presente trabalho.....  | 21 |
| Figura 3: Ilustração da alteração dos lípidos de uma forma cilíndrica para uma forma hexagonal.....   | 21 |
| Figura 4: Estrutura do lípido diestearoil-rac-glicerol-PEG2000_ (DSG-PEG 2000) usado no contexto deste trabalho .....   | 22 |
| Figura 5: Estrutura do lípido (DSPC) 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfocolina...  | 22 |
| Figura 6: Estrutura da molécula de colesterol. ....   | 23 |
| Figura 7: Rearranjo das moléculas lipídicas da forma livre solúvel em etanol para fragmento fosfolipídico de bicamada.....  | 25 |
| Figura 8: Representação esquemática de um lipossoma contendo um fotossensibilizador no interior da bicamada lipídica. ....  | 27 |
| Figura 9: Diagrama de Jablonski.....  | 29 |
| Figura 10: Estrutura e espectro de absorção dos fotossensibilizadores tetrapirrólicos.....  | 30 |
| Figura 11: Estrutura molecular do fotossensibilizador LUZ51b .....  | 31 |
| Figura 12: Estrutura da molécula de calceína .....  | 26 |
| Figura 13: Otimização do tamanho da coluna de Sepharose adequado a uma boa separação dos lipossomas contendo calceína da calceína livre (não encapsulada).....                              | 39 |
| Figura 14: Separação dos lipossomas encapsulando calceína da calceína livre usando uma coluna de Sepharose.....   | 42 |
| Figura 15: Separação dos lipossomas encapsulando calceína da calceína livre usando uma coluna de Sepharose.....   | 45 |
| Figura 16: Libertação da calceína após irradiação, a 740 nm, dos lipossomas com uma dose de luz de (A-C) 6 J/cm <sup>2</sup> ; (D-F) 8 J/cm <sup>2</sup> e (G-I) 10 J/cm <sup>2</sup> ..... | 48 |
| Figura 17: Libertação da calceína após irradiação, a 740 nm, dos lipossomas com uma dose de luz de (A-C) 6 J/cm <sup>2</sup> ; (D-F) 8 J/cm <sup>2</sup> e (G-I) 10 J/cm <sup>2</sup> ..... | 51 |

|  |    |
|--|----|
| Figura 18: Libertação da calceína após irradiação, a 740 nm, dos lipossomas com uma dose de luz 10 J/cm <sup>2</sup> . .....   | 54 |
| Figura 19: Libertação da calceína após irradiação, a 740 nm, dos lipossomas com uma dose de luz 10 J/cm <sup>2</sup> repartida em 2 doses de 5 J/cm <sup>2</sup> . ..... | 55 |
| Figura 20: Libertação da calceína após irradiação, a 740 nm, dos lipossomas com uma dose de luz 8 J/cm <sup>2</sup> repartida em 4 doses de 2 J /cm <sup>2</sup> . ..... | 56 |
| Figura 21: Libertação da calceína após irradiação, a 740 nm, dos lipossomas com uma dose de 10 J/cm <sup>2</sup> . .....   | 59 |

# Índice de Tabelas

|  |    |
|--|----|
| Tabela 1: Composição lipídica dos lipossomas preparados pelo método de hidratação. ....  | 41 |
| Tabela 2: Composição lipídica dos lipossomas preparados pelo método de injeção de etanol.....  | 43 |
| Tabela 3: Tamanho médio dos lipossomas contendo calceína e preparados por diferentes métodos .....   | 43 |
| Tabela 4: Composição lipídica dos lipossomas preparados pelo método de injeção de etanol para encapsulação de calceína e LUZ51b (LUZ51b-50) e respetiva formulação controlo, ou seja, sem LUZ51b (Ctr) .....   | 45 |
| Tabela 5: Caracterização das formulações LUZ51b-50 e Ctr .....   | 47 |
| Tabela 6:Caracterização das formulações LUZ51b-100 e Ctr.....  | 49 |
| Tabela 7: Caracterização das formulações LUZ51b-150 e Ctr.....   | 53 |
| Tabela 8: Composição lipídica dos lipossomas preparados pelo método de injeção de etanol para encapsulação de calceína e LUZ51b (LUZ51b-DOPC) e respetiva formulação controlo, ou seja, sem LUZ51b (Ctr) ..... | 56 |
| Tabela 9: Caracterização das formulações LUZ51b-DOPC-150 e Ctr.....  | 58 |



# Resumo

O uso de ácidos nucleicos como fármaco tem vindo a ganhar interesse ao longo dos últimos 20 anos, contudo existem diversas barreiras que limitam o uso direto destas entidades. Os ácidos nucleicos são facilmente degradados pelas nucleases existentes nos diversos tecidos, podem agregar e são facilmente excretadas pelos rins. Além disso, podem sofrer mecanismos de excreção pelos tecidos ou não interagir com estes devido à sua carga negativa. Isto despoletou o interesse pelo desenvolvimento de nanopartículas lipídicas como forma de veículo que permita conduzir o fármaco até ao alvo terapêutico. As nanopartículas lipídicas contendo lípidos catiónicos ionizáveis são atualmente uma das formulações mais promissoras para a entrega de diferentes tipos de ácidos nucleicos, atingindo recentemente o seu culminar com o seu uso em vacinas de mRNA, como é o caso da vacina covid. Ainda assim, estas formulações apresentam algumas limitações nomeadamente um escape endossomal que ronda valores muito baixos. A baixa libertação endossomal reduz de forma significativa o potencial terapêutico destas formulações uma vez que o alvo terapêutico da maioria dos ácidos nucleicos encontra-se no citosol das células. No presente trabalho pretendeu-se desenvolver uma estratégia que permitisse melhorar a libertação endossomal. Para o efeito, explorou-se o fotossensibilizador LUZ51b com o objectivo de desenvolver nanopartículas lipídicas activáveis através de uma fonte de luz externa. A LUZ51b é uma bacterioclorina lipofílica com forte absorção na zona do infravermelho. Esta característica é muito importante pois permite uma maior penetração da luz nos tecidos.

Numa fase inicial, procedeu-se à optimização de uma formulação lipossomal encapsulando LUZ51b na bicamada lipídica e calceína no meio interno aquoso. Foram testados dois métodos de preparação dos lipossomas, método de hidratação do filme lipídico e método de injeção de etanol, bem como formulações com diferentes quantidades de LUZ51b.

Os resultados obtidos demonstraram que a irradiação a 740 nm dos lipossomas contendo LUZ51b permitiu induzir a destabilização destes com a subsequente

libertação do seu conteúdo. Este efeito é provavelmente explicado pela oxidação lipídica mediada pelas espécies reactivas de oxigénio provenientes da activação da LUZ51b. A libertação da calceína verificou-se mais eficiente com os lipossomas preparadas com a maior quantidade de LUZ51b mas nunca ultrapassou os 60%.

**Palavras-chave:** Terapia génica, lipossomas, calceína, LUZ51b, libertação endossomal

# Abstract

The use of nucleic acids as a drug has gained interest over the last 20 years, however there are several obstacles that limit the direct use of these entities. Nucleic acids are easily degraded by nucleases existing in different tissues, they can aggregate and are easily excreted through rinses. In addition, they may suffer from tissue excretion or not interact with them due to their negative charge. This sparked interest in the development of lipid nanoparticles as a vehicle that allows the drug to be delivered to the therapeutic target. Lipid nanoparticles containing ionizable cationic lipids are currently one of the most promising formulations for the delivery of different types of nucleic acids, recently reaching its culmination with its use in mRNA vaccines, such as the covid vaccine. Even so, these formulations have some limitations; namely, very low endosomal escape levels. The low endosomal release significantly reduces the therapeutic potential of these formulations since the therapeutic targets of most nucleic acids are found in the cytosol of the cells. In the present work, we aimed to develop a strategy that would improve endosomal release. For this purpose, the photosensitizer LUZ51b was explored with the aim of developing lipid nanoparticles that can be activated through an external light source. LUZ51b is a lipophilic bacteriochlorin with strong absorption in the infrared region. This feature is very important as it allows greater penetration of light into the tissues.

On an initial phase, the optimization of a liposomal formulation was carried out by encapsulating LUZ51b in the lipid bilayer and calcein in the internal aqueous medium. Two methods of liposome preparation were tested (lipid film hydration method and ethanol injection method), as well as formulations with different amounts of LUZ51b.

The results obtained showed that the irradiation at 740 nm of the liposomes containing LUZ51b allowed to induce their destabilization with the subsequent release of their content. This effect could be explained by lipid oxidation mediated by reactive oxygen species arising from LUZ51b activation. Calcein release was found to be more efficient with liposomes prepared with the highest amount of LUZ51b, although never exceeding 60%.



# 1 Processo tumorigénico e prevalência de cancro no mundo

O cancro é uma doença com prevalência mundial sendo uma das causas mais comuns de morbidade e mortalidade nos países desenvolvidos. Atualmente estima-se que ocorram mais de 10 milhões de novos casos e mais de 6 milhões de mortes a cada ano em todo o mundo. <sup>[1]</sup>

O cancro pode ser entendido como uma doença genética, ou seja, o cancro pode ser causado por certas mutações em genes que controlam diversas funções celulares. <sup>[1]</sup> Os oncogenes, são genes que quando ativados são capazes de induzir o processo neoplásico, ou seja, a divisão descontrolada das células. Um oncogene é uma sequência do DNA, que resulta da mutação de um gene normal designado de proto-oncogene. Os proto-oncogene estão envolvidos na regulação da diferenciação e proliferação celular. Assim uma mudança na sequência do proto-oncogene, ou na quantidade de proteína que ele produz, pode interferir no normal funcionamento celular. Mutações neste tipo de genes resultam em crescimento celular descontrolado, ou transformação neoplásica, o que resulta na formação de um tumor. <sup>[2]</sup> Alguns exemplos de oncogenes incluem EGFR, MYC, BCL2, HER2, KRAS e HGF/c-Met. <sup>[3]</sup>

Os genes supressores tumorais têm um papel importante na regulação da divisão celular de modo a manter a homeostase. Quando estes genes são inativados por uma mutação na sua sequência, a proteína codificada ou não é produzida ou o seu funcionamento fica comprometido, o que pode resultar num descontrolo da divisão celular. Assim a perda da função inibitória destes genes contribui para desenvolvimento de tumores. De entre os genes que entram nesta classe, o mais conhecido é o TP3. <sup>[3]</sup>

As mutações adquiridas durante o processo tumorigénico permitem a aquisição de um conjunto de propriedades funcionais que facilitam o desenvolvimento gradual dos tumores. Estas propriedades são conhecidas como “hallmarks” do cancro e consistem em: i) proliferação desregulada; ii) escape aos mecanismos de inibição de proliferação; iii) resistência aos mecanismos de morte celular; iv)

imortalidade replicativa; v) indução de angiogénese, vi) invasão e metastização, vii) escape ao sistema imunitário e viii) metabolismo celular desregulado. O desenvolvimento destas propriedades funcionais depende de um conjunto de mecanismos celulares e moleculares conhecidos genericamente como instabilidade genómica e inflamação. [3]

O tratamento do cancro assenta em três pilares fundamentais: cirurgia, quimioterapia e radioterapia. A cirurgia é um método que permite a remoção dos tumores sólidos e por vezes de gânglios circundantes à região afetada, contudo, apresenta algumas limitações nomeadamente o tempo de recuperação que pode ser lento, além de poder gerar dores intensas, cansaço e cicatrizes que afetam a autoestima dos doentes. [4]

A radioterapia, por sua vez, usa radiação de elevada energia de forma a eliminar as células cancerígenas. Este tipo de tratamento pode ser realizado através de radiação externa a qual advém de uma fonte emissora externa que incide no tecido afetado. Por outro lado, pode ocorrer irradiação interna em que a irradiação do tecido é feita através da administração de uma solução contendo material radiativo que normalmente pode ser administrado por via oral ou intravenosa. Os efeitos secundários deste tipo de tratamento dependem da dose e do tipo de radiação, assim como, do local de administração. A radioterapia pode provocar irritações cutâneas, distúrbios gastrointestinais ou perda dos folículos pilosos e cansaço. Estes efeitos podem ser limitativos da atividade diária dos pacientes bem como da sua autoestima.

A quimioterapia consiste na utilização de fármacos com toxicidade celular de forma a eliminar as células cancerígenas. Estes fármacos podem ser utilizados individualmente ou em terapia combinada. A administração quer seja oral ou intravenosa tem ação sistémica. Os principais efeitos secundários deste tipo de fármacos resultam da sua ação inespecífica sobre diversos tipos de células especialmente naquelas cuja divisão é rápida, como as células sanguíneas. A destruição de diversos tipos de células do sangue leva a que o paciente tenha maior probabilidade de sofrer hemorragias e hematomas e de contrair infeções. A quimioterapia também pode afetar folículos pilosos e o sistema gastrointestinal estando por isso associado a perdas de cabelo, vómitos e náuseas. Em última instância, os tratamentos de quimioterapia podem afetar a fertilidade dos

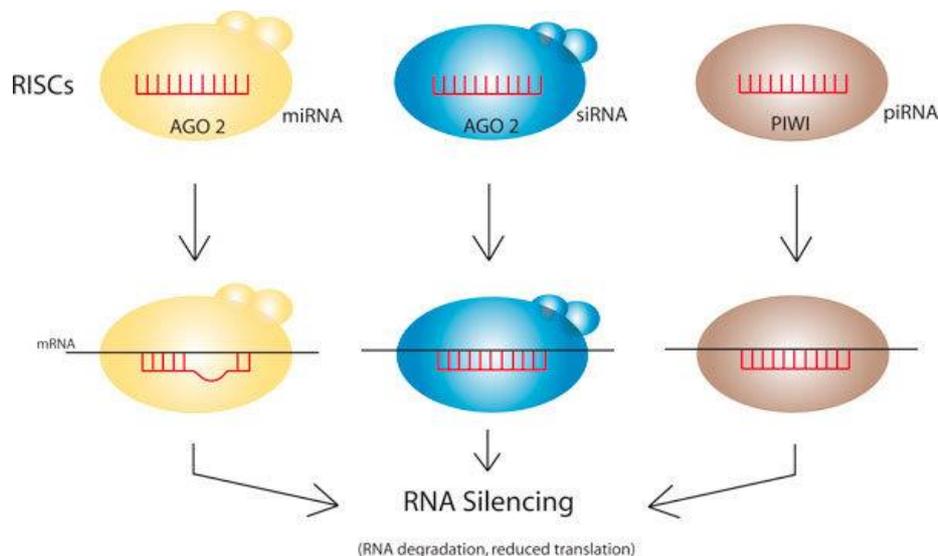
pacientes. Todos estes efeitos adversos podem contribuir para a diminuição da qualidade de vida e da autoestima dos doentes.<sup>[5]</sup> Para além dos diversos efeitos secundários mencionados, a quimioterapia induz diferentes mecanismos de resistência, os quais comprometem a sua eficácia a longo prazo.<sup>[5]</sup>

O conhecimento adquirido nas últimas décadas sobre os mecanismos celulares e moleculares do processo tumorigénico permitiu o desenvolvimento de novas terapias mais específicas e mais eficazes. Dentro deste contexto, o silenciamento de genes que se encontram envolvidos no desenvolvimento de tumores, bem como a expressão de genes que podem restituir a homeostase celular, constituem duas estratégias de enorme potencial para o tratamento do cancro.

## 2 Terapia génica para o tratamento do cancro: potencial e desafios

Um dos avanços mais importantes da biologia molecular do ácido ribonucleico (RNA, do inglês *acid ribonucleic*) foi a descoberta da existência de sequências de RNA não codificantes. Este mecanismo de regulação da expressão génica através de pequenas sequências duplas de RNA é habitualmente designado como mecanismo de RNA de interferência (RNAi, do inglês *RNA interference*) e permite a inibição/silenciamento de genes a nível pós-transcricional após interação com o mRNA alvo. Por esta razão estes tipos de RNA têm função de regulação do genoma e da expressão de genes e estão envolvidos em alguns dos processos mais importantes da célula a nível pós-transcricional. [6,7]

Atualmente conhecem-se várias classes de RNAs de cadeia pequena, as quais apresentam uma ação biológica e que são auxiliadas por proteínas efetoras diferentes: i) small-interfering RNA (siRNA); ii) microRNAs (miRNAs), iii) piwi RNAs (piRNAs) (Figura 1). [8-11]



**Figura 1:** Representação esquemática das várias classes de RNA de cadeia pequena. Adaptado de [12].

O mecanismo de regulação do RNA permite o silenciamento de genes de forma relativamente específica através da degradação do mRNA complementar. A descoberta deste mecanismo constituiu uma grande inovação uma vez que representa uma ferramenta muito útil para o tratamento de diversas doenças como uma componente de desregulação genética, como é o caso do cancro. [13,14] Por outro lado, o uso de plasmídeos, ou mais recentemente de pequenas sequências de mRNA, têm sido explorados para induzir a expressão de genes que possam trazer benefícios terapêuticos. [15]

O uso de ácidos nucleicos, quer para o silenciamento de genes envolvidos em processos patológicos, quer para a expressão de genes em falta ou defeituosos, têm um enorme potencial para o tratamento de diversas patologias humanas. [16,17,18] Contudo, o desenvolvimento de ácidos nucleicos como uma nova classe de fármacos apresenta como principal desafio a entrega (*delivery*) deste material ao alvo terapêutico. No caso de tumores sólidos com metástase espalhadas por diversas partes do corpo, ou no caso de tumores líquidos, a administração intravenosa constitui a via de administração mais adequada. Contudo, a administração intravenosa de ácidos nucleicos na sua forma livre apresenta uma farmacocinética e biodistribuição inadequadas. Os ácidos nucleicos são moléculas pequenas e hidrofílicas sendo eliminados em poucos minutos por via renal. Além disso, o compartimento vascular é rico em nucleases as quais rapidamente degradam os ácidos nucleicos. Mesmo que esta moléculas terapêuticas consigam chegar ao tumor alvo, os níveis de internalização celular são normalmente muito baixos. A baixa internalização celular dos ácidos nucleicos é explicada pela sua carga negativa e natureza hidrofílica. [19]

# 3 Estratégias de entrega de ácidos nucleicos

Idealmente um sistema de entrega celular deve ser caracterizado por: a) biocompatibilidade de forma a não excretado imediatamente pelo organismo, b) reter o seu conteúdo até à chegada ao tecido alvo, c) possuir elevada capacidade de carga do fármaco pretendido, d) apresentar especificidade para o tecido alvo e, e) a libertação do fármaco deve ser controlada por estímulos internos ou externos. [20]

## 3.1 Nanopartículas à base de lípidos

Entre os diversos tipos de nanopartículas biodegradáveis, as nanopartículas lipídicas (tipicamente conhecidas como lipossomas) têm sido das mais estudadas. Os lipossomas são vesículas de forma esférica compostas por um ou mais lípidos, como por exemplo fosfolípidos, os quais formam uma bicamada que se assemelham à estrutura das membranas celulares. [21,22]

Os lipossomas são dos veículos de entrega de fármacos mais usados devido a várias propriedades favoráveis, tais como: elevada biocompatibilidade e baixa toxicidade, baixa imunogenicidade, produção relativamente fácil e, versatilidade em relação à composição lipídica e tamanho. Uma das vantagens mais interessantes dos lipossomas é a sua capacidade para encapsular/transportar quer moléculas hidrofílicas, quer moléculas hidrofóbicas. As moléculas hidrofílicas podem ser encapsuladas no interior aquoso das nanopartículas lipídicas enquanto as moléculas hidrofóbicas podem ser acomodadas na bicamada lipídica.

Os lipossomas podem ser concebidos de forma a melhorar a solubilidade do fármaco a transportar, bem como a modular a biodistribuição e a farmacocinética. Isto pode conduzir a um aumento do tempo de ação do fármaco devido a um aumento do seu tempo de semi-vida. [23]

As nanopartículas lipídicas podem sofrer modificações químicas para evitar reações adversas por parte do sistema imunológico. Por exemplo, o uso de lípidos acoplados ao polietilenoglicol (PEG) permite melhorar a estabilidade dos

lipossomas em ambientes biológicos, uma vez que a presença do PEG leva à formação de uma camada de hidratação sobre as nanopartículas. A presença das moléculas de água à volta da nanopartícula lipídica permite reduzir de forma significativa a adsorção de proteínas plasmáticas e conseqüentemente, há um menor reconhecimento destas nanopartículas pelo sistema imunitário. [24]

Nos últimos anos, diversos avanços permitiram o desenvolvimento de formulações passíveis de libertação controlada. Este efeito pode ser conseguido explorando características inerentes ao tecido alvo como por exemplo, o meio ácido do microambiente tumoral. Vários trabalhos científicos têm descrito o desenvolvimento de formulações lipossomais com lípidos sensíveis à mudança de pH, como por exemplo, o 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DOPE). Ao pH fisiológico, este lípido forma uma bicamada lipídica, contudo, a sua protonação a pH mais baixos leva a que adote uma conformação hexagonal invertida que destabiliza a membrana lipossomal. Conseqüentemente, ocorre a libertação do fármaco encapsulado em meio ácido como o observado nos endossomas. Finalmente, a utilização de lipossomas ainda oferece a possibilidade de associar ligandos à sua superfície. Estes ligandos são reconhecidos por recetores que são sobre-expressos de forma relativamente específica nas células tumorais, permitindo assim, o aumento da internalização celular e/ou da especificidade da formulação.

Várias formulações lipídicas têm vindo a ser desenvolvidas para a entrega de diferentes tipos de ácidos nucleicos. As formulações com lípidos catiónicos são provavelmente das mais usadas uma vez que os lípidos catiónicos facilitam a formação de complexos estáveis com os ácidos nucleicos que são negativamente carregados. Os lipoplexos catiónicos funcionam muito bem *in vitro* permitindo elevados níveis de internalização celular, mas a sua administração *in vivo* revela-se pouco eficaz.

Avanços significativos nesta área foram conseguidos devido ao desenvolvimento de lípidos catiónicos ionizáveis e lípidos acoplados ao polímero PEG. As primeiras formulações contendo estes lípidos na sua composição foram inicialmente designadas por SNALP (do inglês, *stabilized nucleic acid lipid nanoparticles*) sendo atualmente genericamente conhecidas por LNP (do inglês, *lipid nanoparticles*). [27] Estas formulações constituem uma das tecnologias

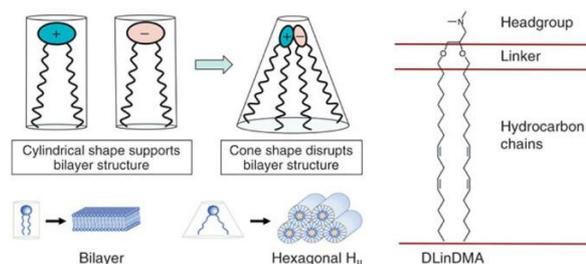
mais avançada no que diz respeito aos sistemas de entrega de ácidos nucleicos. Um exemplo de sucesso é a formulação Onpattro que se encontra em uso clínico para a entrega de um siRNA para o tratamento de amiloidose hereditária relacionada com a transtirretina. [28].

### 3.2 Composição das nanopartículas lipídicas

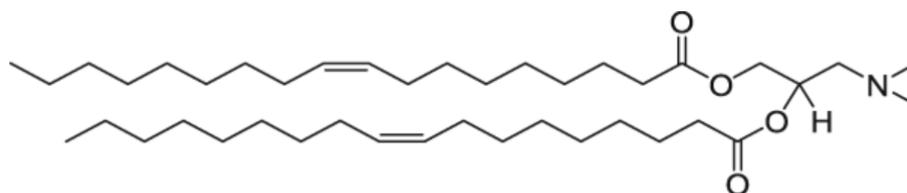
Tipicamente, as nanopartículas lipídicas são compostas por quatro lípidos: i) lípidos catiónicos ionizáveis, ii) lípidos acoplados ao PEG, iii) fosfolípidos zwitteriônicos que funcionam como lípidos auxiliares ou estruturais que mimetizam a membrana celular e, iv) colesterol. [29]

Os lípidos catiónicos ionizáveis são protonados a pH baixo (e.g. pH=4), adquirindo carga positiva, o que permite a encapsulação dos ácidos nucleicos com elevadas taxas de eficiência. Contudo, após o processo de encapsulação, o ajuste do pH para um valor mais próximo de pH fisiológico permite a obtenção de LNPs com carga aproximadamente neutra. A obtenção de nanopartículas neutras é de enorme importância pois diminui de forma significativa a opsonização dos lipossomas e conseqüentemente, aumenta o seu tempo de semi-vida na circulação sanguínea.

A utilização destes lípidos também assume grande relevância ao nível intracelular pois permite aumentar a biodisponibilidade do ácido nucleico encapsulado. Os lípidos catiónicos ionizáveis adquirem carga positiva em ambiente ácido, como é o caso dos endossomas (pH~6,5), o que leva à alteração destes lípidos de uma fase cilíndrica para uma fase hexagonal facilitando assim, a destabilização da membrana lisossomal (Figura 2). A protonação dos lípidos catiónicos ionizáveis ao nível dos endossomas também facilita a interação das LNPs com os lípidos aniônicos da membrana endossomal, facilitando a fusão de membranas, e subsequente saída dos ácidos nucleicos dos endossomas para o citoplasma das células. [30]



**Figura 2:** Ilustração da alteração dos lípidos catiónicos ionizáveis de uma forma cilíndrica para uma forma hexagonal. Adaptado de [31].

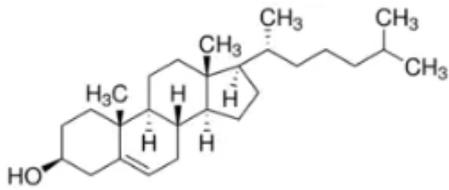


**Figura 3:** Estrutura do 1,2-dioleoil-3-dimetilamônio-propano (DODAP) que consistiu no lípido catiónico usado no presente trabalho. Adaptado de [32].

Os lípidos “peguihados” podem ter múltiplos efeitos nas propriedades das nanopartículas lipídicas.

A quantidade de lípidos peguihados afeta o tamanho das partículas e o potencial zeta. A presença do PEG contribui para que as nanopartículas fiquem rodeadas por moléculas de água evitando a sua agregação e conseqüentemente, aumentando a estabilidade da formulação. Por outro lado, este fenômeno também evita a opsonização dos lipossomas. As opsoninas servem como marcadores de identificação para os macrófagos. [72,73] A presença de opsoninas na superfície lipossomal aumenta a suscetibilidade ao ataque de macrófagos e, conseqüentemente, promove a sua remoção através do sistema reticuloendotelial (RES): conjunto de células do sistema imunitário existentes no fígado que reconhecem corpos estranhos. [33-35] Assim, a presença de PEG diminui a opsonização lipossomal o que permite prolongar o tempo de circulação dos lipossomas e conseqüentemente, permite que os lipossomas cheguem aos alvos terapêuticos mais distantes da zona de administração. [36-41] Os lípidos peguihados podem ainda ser usados para conjugar ligandos à





**Figura 6:** Estrutura da molécula de colesterol. Adaptado de <sup>[46]</sup>.

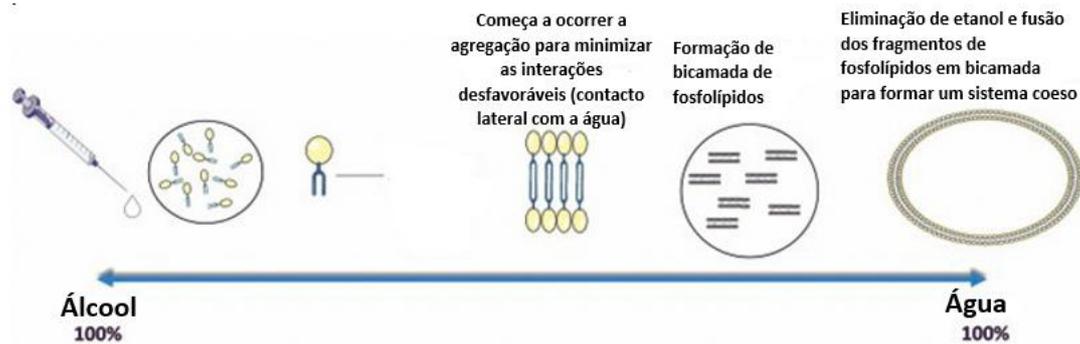
### 3.3 Mecanismo de formação de lipossomas pelo método de injeção de etanol

Nanopartículas lipídicas (LNPs) para a entrega de ácidos nucleicos são preparados pelo método de injeção de etanol. Este método consiste na adição de um volume de solução de etanol contendo os lípidos a um volume elevado de ácidos nucleicos em solução aquosa e a pH ácido. A diluição do etanol abaixo da solubilidade dos lípidos culmina na formação espontânea de pequenas vesículas. Após a junção das duas fases ocorre o rearranjo dos lípidos formando-se uma bicamada lipídica. A parte interior da membrana lipídica é constituída pelas caudas hidrofóbicas dos lípidos enquanto que as cabeças hidrofóbicas destes estão voltadas para a fase exterior e para a fase interior dos lipossomas, as quais são constituídas por meio aquoso (Figura 7). <sup>[47,48]</sup>

O método de injeção de etanol resulta em níveis elevados de encapsulação, nomeadamente perto de 100% para siRNAs e mRNAs. <sup>[49,50]</sup> Embora o processo de extrusão não seja completamente necessário, este facilita a obtenção de LNPs com uma distribuição de tamanho mais homogéneo. Por esta razão, o passo da extrusão é incorporado em diversos protocolos para a obtenção de LNPs.

Finalmente, é necessário proceder à remoção do etanol da formulação, bem como à elevação do pH para 7.4, o que tipicamente é conseguido por diálise ou por cromatografia de exclusão molecular usando um tampão salino a pH=7.4.

<sup>[49,50]</sup>



**Figura 7:** Rearranjo das moléculas lipídicas da forma livre solúvel em etanol para fragmento fosfolipídico de bicamada (BPF, do inglês *bilayer phospholipid fragment*) à medida que o etanol se dispersa na fase aquosa. O BPF precipita na fronteira entre o etanol e a fase aquosa, seguindo-se a formação de lipossomas por fusão de fragmentos dos fosfolípidios em bicamada. Adaptado de [47, 48].

### 3.4 Desafios da utilização de nanopartículas lipídicas para a entrega de ácidos nucleicos

Apesar dos avanços obtidos com LNPs que incluem lípidos catiónicos ionizáveis na sua formulação, ainda existem vários obstáculos a ultrapassar para que os ácidos nucleicos possam ser usados de forma mais abrangente na clínica.

A utilização de LNPs confere proteção ao material encapsulado da ação das nucleases existentes nos tecidos e têm-se revelado uma estratégia muito promissora quando o alvo terapêutico é o fígado. A captação de LNPs ionizáveis e o silenciamento de genes no fígado são dependentes da opsonização destes pela apolipoproteína E (ApoE), a qual funciona como um ligando que é reconhecido e internalizado pelos recetores de lipoproteína de baixa densidade presente nos hepatócitos. A elevada internalização pelos hepatócitos ocorre principalmente por endocitose. Apesar do sucesso obtido ao nível da transfeção dos hepatócitos, há alguns estudos que sugerem que apenas uma fração muito pequena dos siRNAs (1-2%) é que é efetivamente libertada dos endossomas. Assim, grande parte dos ácidos nucleicos que chegam às células alvo acabam por serem degradados nos lisossomas. [51,52] Por esta razão, são desejáveis novas estratégias que possam potenciar a libertação endossomal das LNPs.

# 4 Liberação controlada e estimulada pela luz

Vários trabalhos têm demonstrado que a incorporação de moléculas fotoativas em nanopartículas pode permitir o controle temporal e espacial da liberação do seu conteúdo por meio de uma fonte de luz externa. Lipossomas ativáveis pela ação da luz poderão aumentar a entrega de fármacos no alvo terapêutico, permitindo assim diminuir a toxicidade a nível sistêmico. [53,54]

Várias moléculas fotoativas são capazes de induzir a desestabilização e permeabilização da membrana lipídica. A sua localização no lipossoma depende da sua polaridade intrínseca. Moléculas fotoativas hidrofóbicas ficam encapsuladas junto às caudas hidrofóbicas dos fosfolípidos enquanto que as moléculas hidrofílicas ficam alojadas no meio aquoso dos lipossomas. Vários mecanismos têm sido explorados para potenciar a destabilização da membrana promovendo assim, a liberação do conteúdo lipossomal. Exemplos destes mecanismos incluem a oxidação induzida por luz (terapia fotodinâmica), fotorreticulação, fotoisomerização, fotoclivagem e liberação fototérmica [55].

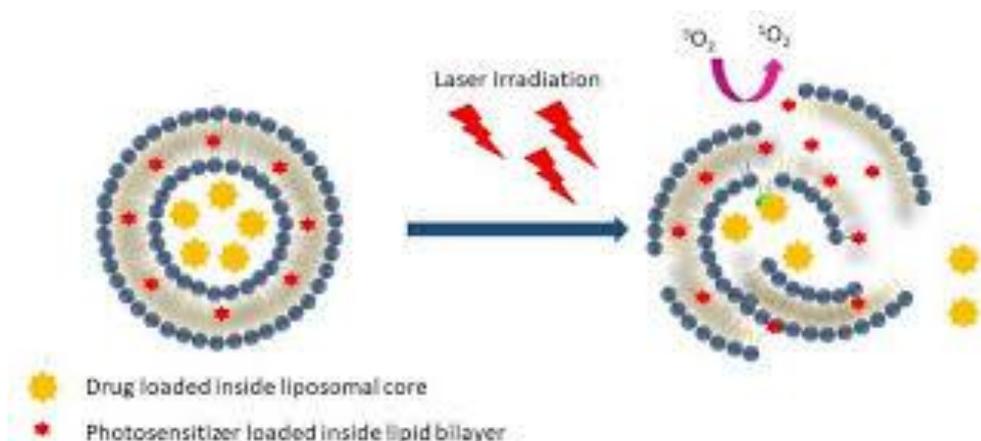
## 4.1 Terapia fotodinâmica como estratégia para potenciar a liberação endossomal

Um dos mecanismos mais comuns para aumentar a liberação do conteúdo de nanopartículas é o recurso à oxidação induzida pela terapia fotodinâmica (PDT, do inglês *photodynamic therapy*). Este mecanismo assenta na produção de espécies reativas de oxigénio (ROS, do inglês *reactive oxygen species*), as quais possuem eletrões desemparelhados ou ligações instáveis, após a excitação de uma molécula, designada por fotossensibilizador (PS, do inglês *photosensitizer*), pela irradiação com luz em comprimentos de onda específicos. Os ROS resultantes podem ser o oxigénio singleto ( $O_2^{\cdot}$ ), radicais hidroxilo ( $HO^{\cdot}$ ), superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) e peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ). A elevada concentração destas espécies nos tecidos induz stress oxidativo celular causando apoptose e

outros mecanismos de morte celular. Por esta razão, a PDT tem sido usada nomeadamente para aplicações oncológicas e antibacterianas [56].

A PDT tem vindo a ser explorada como uma estratégia que poderá aumentar a libertação do conteúdo de nanopartículas lipídicas uma vez que esta pode mediar a oxidação de diferentes lípidos da membrana lipossomal. O mecanismo reside na encapsulação de fotossensibilizadores na bicamada lipídica os quais após ativação pela luz levam à oxidação de lípidos insaturados, e conseqüentemente, à formação de poros na bicamada lipídica. Desta forma, é expectável que ocorra uma maior libertação do conteúdo lipossomal (Figura 8). [57]

Por outro lado, os fotossensibilizadores que ficam retidos na via endocítica também têm sido explorados para promoverem a libertação do conteúdo endossomal. Neste caso os ROS reagem com os lípidos da membrana dos endossomas e conseqüentemente provocam a permeabilização desta. Assim pode-se concluir que a PDT com fotossensibilizadores com tropismo para os endossomas pode ser uma estratégia importante na lise endossomal e posterior libertação do seu conteúdo para o citosol. Esta estratégia teve lugar na história da ciência em 1999 quando Kristian Berg e a sua equipa introduziram este conceito de internalização fotoquímica [58]. Este método tem vindo a ser aplicado com sucesso para a entrega de imunotoxinas, oligonucleótidos, entre outras entidades com carácter terapêutico, quer *in vitro* quer *in vivo* [59,60].

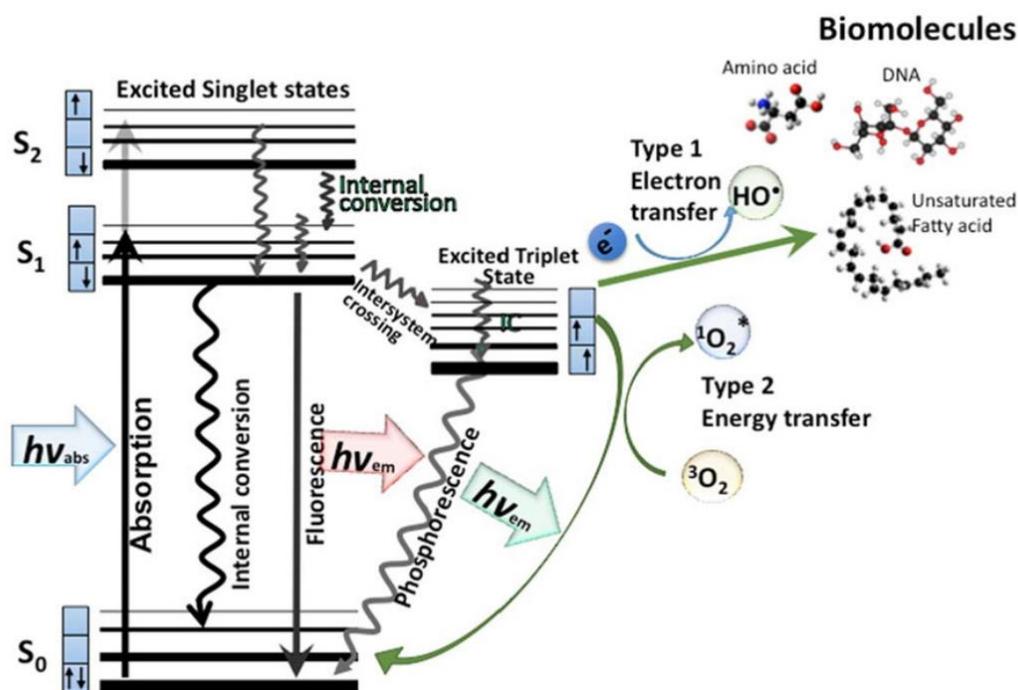


**Figura 8:** Representação esquemática de um lipossoma contendo um fotossensibilizador no interior da bicamada lipídica. Após irradiação, ocorre a

produção de oxigénio singuleto, o que leva à oxidação dos lípidos e consequente destabilização da membrana lipossomal. Adaptado de [58].

#### 4.2. Mecanismo da terapia fotodinâmica

A incorporação de fotossensibilizadores nas membranas lipossomais permite induzir a lise dos lipossomas após activação do fotossensibilizador usando uma fonte de luz no comprimento de onda de excitação correspondente. Assim esta técnica permite a lise total ou parcial da membrana e a consequente libertação do seu conteúdo no alvo terapêutico. Os fotossensibilizadores usualmente são molécula no estado singuleto, uma vez que os eletrões cujo os spins se opõem ocupam a orbital de valência. Após a absorção de um fotão com a energia quântica suficiente para excitar o eletrão, este transita para uma orbital de maior energia. No entanto este estado é muito instável e liberta a energia sob a forma de emissão de luz ou calor. Pode ainda ocorrer o cruzamento intersistema que resulta num estado tripleto mais estável em que os spins são paralelos entre si. O sistema neste estado pode perder energia e voltar ao estado fundamental emitindo um fotão que resulta em fosforescência, contudo este processo é proibido pelas regras de seleção quântica, dado que o estado tripleto é muito mais estável que o inicial. Desta forma, o tempo que permanece neste estado permite a transferência de energia para o oxigénio molecular gerando assim o oxigénio singuleto ( $O_2^{\cdot}$ ). Também pode ocorrer outra via pela qual o sistema sofre transferência de eletrões levando à formação de ROS tais como, o anião radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), o peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ) e o radical hidroxilo ( $HO^{\cdot}$ ). (Figura 9) [61].



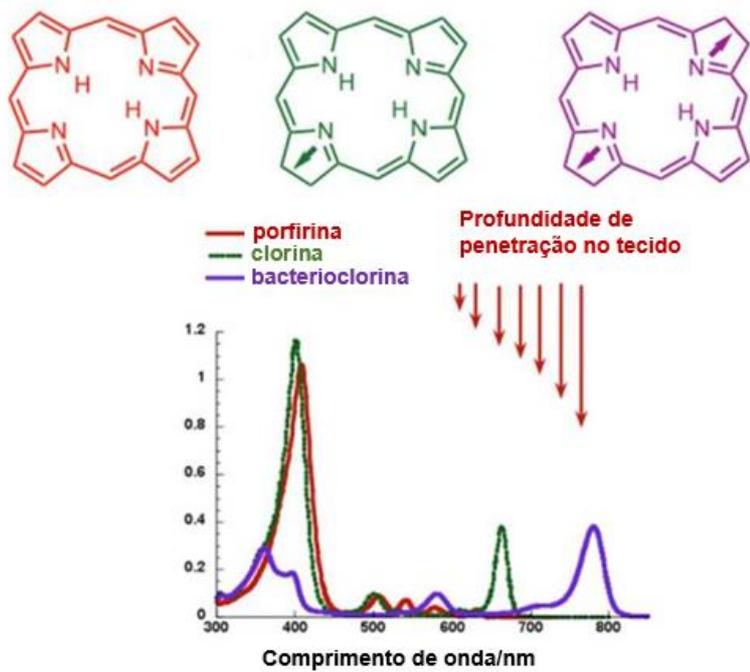
**Figura 9:** Figure 1 Diagrama de Jablonski. Adaptado de [61].

### 4.3 Fotossensibilizadores: Estruturas tetrapirrólicas

Idealmente, um fotossensibilizador deve ser um composto puro. Deve ter um forte pico de absorção na zona do infravermelho ao visível, nomeadamente entre 650 a 850 nm, o que corresponde aos comprimentos de onda com maior penetração nos tecidos. Comprimentos de onda maiores não são adequados uma vez que a absorção de fótons com energia quântica maior que 850 nm não fornecem energia suficiente para excitar o oxigénio ao seu estado singleto. Os fotossensibilizadores devem possuir um rendimento quântico triplo elevado, induzindo por sua vez uma produção suficiente de ROS após a irradiação. Finalmente, um bom fotossensibilizador não deve induzir toxicidade no escuro e deve ainda possuir uma depuração relativamente rápida dos tecidos saudáveis, minimizando assim os efeitos colaterais de fototoxicidade [61].

A maioria dos PSs que têm sido usados para aplicações anticancerígenas são compostos tetrapirrólicos. Estas estruturas ocorrem naturalmente na natureza, como por exemplo no grupo heme, na clorofila e na bacterioclorofila. À medida que as ligações duplas são sucessivamente reduzidas, deslocaliza de porfirinas para clorinas e destas, para bacterioclorinas, a banda Q é substancialmente desviada para o vermelho e adquire uma altura maior (Figura 9). As ftalocianinas também possuem uma banda larga na região de 670 nm. De um modo geral, os PSs tetrapirrólicos (com exceção das

bacterioclorinas) tendem a produzir predominantemente oxigénio singlete (reações Tipo II), em contraste com os ROS (reações Tipo I) que são frequentemente produzidos por PSs com outras estruturas. O número de compostos tetrapirrólicos usados como PSs em PDT é muito alto e encontram-se dicutidos em alguns artigos de revisão da literatura.<sup>[62,63]</sup>



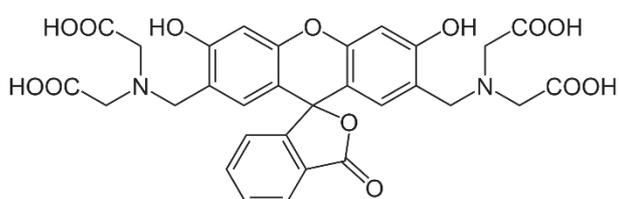
**Figura 10:** estrutura e espetro de absorção dos fotossensibilizadores tetrapirrólicos. Adaptado de <sup>[62]</sup>.

Neste trabalho, e com o objectivo de desenvolver LNPs activáveis pela luz, foi utilizado o fotossensibilizador LUZ51b (5-metilcarboxamida-10,20-bis-(2,6-difluorofenil) bacterioclorinas). Este composto é uma bacterioclorina com substituintes de cadeia carbonada e grupos flúor (Figura 11). O uso da LUZ51b tem como vantagens o facto de ser uma molécula estável e lipofílica permitindo por isso uma boa incorporação na bicamada lipídica dos lipossomas em estudo. A sua elevada absorção a 740 nm é uma das suas principais vantagens pois a luz no IR penetra mais profundamente nos tecidos



**Figura 11:** Estrutura molecular do fotossensibilizador LUZ51b. Adaptado de [64].

Neste estudo, e como prova de conceito da libertação do conteúdo interno dos lipossomas após a acção de uma fonte externa de luz, optou-se por encapsular calceína e não ácidos nucleicos. Para além da calceína ser muito mais económica de que moléculas da família dos ácidos nucleicos, esta molécula apresenta ainda a vantagem de ser fluorescente. A molécula apresenta excitação e emissão a comprimentos de onda de 495 e 515 nm, respectivamente. Quando encapsulada dentro dos lipossomas em concentrações relativamente altas, o sinal de fluorescência da calceína encontra-se suprimindo. Contudo, à medida que ocorre a sua libertação para o meio exterior, deverá observar-se um aumento gradual da fluorescência. O aumento do sinal da fluorescência permite a quantificação da percentagem de libertação lipossomal de uma forma fácil e directa [65].



**Figura 12:** Estrutura da molécula de calceína. Adaptado de [65].

## 5. Materiais e métodos

### 5.1 Materiais

Os lípidos, 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfocolina em clorofórmio 18:0 (DSPC), 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfocolina em pó (DOPC), (1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfocolina em pó (DOPC), 1,2-dioleoil-3-dimetilamônio-propano (DODAP), diestearoil-rac-glicerol-PEG (2000-DSG-PEG 2000), L- $\alpha$ -Fosfatidiletanolamina-N-(lissamina rodamina B sulfonil) (Sal de Amônio) (Ovo Transfosfatidilado)- Egg Liss Rhod PE, 1-estearoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina 18:0-18:1 (SOPC) e o colesterol foram adquiridos à empresa Avanti Polar Lipids. O fotossensibilizador, LUZ51b, foi sintetizado e fornecido pela Luzitin SA. O Ácido N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-(2-etanossulfônico) (HEPES), o cloreto de sódio, o hidróxido de sódio, o citrato de sódio, o ácido cítrico, a calceína, a Sepharose CL-2B 100ml, bem como o kit de quantificação do colesterol, foram adquiridos à empresa Sigma-Aldrich. O mini-extrusor com Suporte/Bloco de Aquecimento (modelo 61000) e as membranas de policarbonato 0,2  $\mu$ m de 19 mm foram adquiridas à empresa Avanti Polar Lipids. A coluna cromatografia líquida 1 x 20 cm de 16 ml e os tubos de vidro Pyrex L 16 mm x 100 mm também foram adquiridos à empresa Sigma-Aldrich.

### 5.2 Métodos

#### *5.2.1 Preparação dos stocks de lípidos, Luz51b e calceína*

Os *stocks* de lípidos foram preparados após diluição da massa indicada nos rótulos, usando etanol puro. O volume de etanol usado foi o necessário para obter uma concentração de 50 mM.

Para preparação da solução *stock* de calceína, a calceína pesada (~ 31 mg) foi inicialmente dissolvida em NaOH 2 M (~ 135  $\mu$ L) seguindo-se a adição de água (865  $\mu$ L) de modo a obter uma concentração de 50 mM.

A solução *stock* de Luz51b foi preparada adicionando etanol a este composto após a medição da massa. O primeiro *stock* preparado tinha uma concentração de aproximadamente 2 mM mas revelou-se instável ocorrendo precipitação do composto. Por esta razão, foi necessário recorrer à preparação de *stocks* de

concentração mais baixas, nomeadamente de 0.5 a 0.6 mM. De forma a confirmar a concentração dos *stocks* preparados, mediu-se a absorvância recorrendo a um espectrofotómetro PerkinElmer modelo Lambda 25. A partir do coeficiente de absorvância molar a 733 nm para a LUZ51b em etanol ( $69\,000\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ ), e aplicando a equação de Lambert-Beer (equação 1), foi possível determinar a concentração real de cada *stock* de LUZ51b.

$$A = \xi \times L \times C \text{ (equação 1)}$$

onde A é o valor da absorvância para a LUZ51B a 733 nm,  $\xi$  é o coeficiente de absorvância molar, L a largura da cuvete que se convencionou para 1cm e C corresponde C concentração do composto na solução.

### 5.2.2 Preparação das soluções tampão

A preparação da solução tampão HBS (do inglês, *HEPES-buffered saline*) foi realizada após a pesagem das quantidades necessárias de cada sal de modo a obter 20 mM de ácido N-2-hidroxyetilpiperazine-N'-2-etanesulfónico (HEPES) e 145 mM de cloreto de sódio (NaCl). Os sais foram dissolvidos em água miliQ sob agitação mecânica seguindo-se o ajuste do pH para 7.4 usando um elétrodo de pH.

O tampão citrato a 20 mM foi preparado com ácido cítrico e citrato de sódio. Após agitação mecânica, ajustou-se o pH para o valor de 4.

### 5.2.3 Preparação de lipossomas pelo método de hidratação do filme lipídico

Para o método da hidratação do filme lipídico, os lípidos foram aquecidos a 65°C. Este valor corresponde a uma temperatura de cerca de 10°C mais elevada que a temperatura de transição de fase ( $T_m$ ) do DSPC, o qual corresponde ao lípido usado com valor mais alto de  $T_m$ . De seguida, pipetaram-se os volumes das soluções *stock* dos lípidos correspondentes ao estabelecido na formulação para um tubo de vidro e a mistura foi homogeneizada com agitação mecânica (*vortex*). O volume de LUZ51b pretendido foi adicionado à mistura de lípidos seguindo-se um novo ciclo de agitação mecânica e aquecimento. Seguidamente procedeu-se à formação do filme lipídico por evaporação do etanol com recurso ao gás azoto. Após este passo, hidratou-se o filme lípido previamente formado com 300  $\mu\text{L}$  de uma solução de calceína a 50 mM seguindo-se 3 ciclos de *vortex* e

aquecimento a 65°C. De forma a uniformizar o tamanho dos lipossomas fez-se passar a emulsão formada por um extrusor que continha uma membrana de policarbonato com poros de 100 nm. O extrusor foi previamente aquecido a 65°C. Por último, os lipossomas extrudidos foram aplicados sob uma coluna de vidro empacotada com gel de *Sepharose* CL-2B e eluídos com HBS, pH 7.4. A altura do gel na coluna foi de 17,5 cm. A cromatografia de exclusão molecular age por gravidade, o que permitiu a separação dos lipossomas da calceína e da LUZ51b livres. Os lipossomas como possuem maior massa, corresponderam à primeira fração a ser eluída da coluna. A calceína, bem como a LUZ51b, apresentaram tempos de eluição superiores sendo as últimas frações a serem recolhidas.

#### *5.2.4 Preparação de lipossomas pelo método de injeção de etanol*

O método de injeção de etanol desenvolvido por Semple et al <sup>[31]</sup> também foi utilizado durante a realização deste projeto. Para o efeito, e como mencionado na secção anterior, começou-se por aquecer os *stocks* de cada lípido a 65°C. De seguida, pipetaram-se os volumes das soluções *stock* dos lípidos correspondentes ao estabelecido na formulação para um tubo de vidro e a mistura foi homogeneizada com agitação mecânica (*vortex*). O volume de LUZ51b pretendido foi posteriormente adicionado à mistura de lípidos seguindo-se um novo ciclo de agitação mecânica e aquecimento a 65°C.

A mistura de lípidos foi adicionada, gota a gota e sob *vortex constante*, a uma solução de 300 µL de calceína em tampão citrato. De forma a uniformizar o tamanho dos lipossomas fez-se passar a emulsão formada por um extrusor que continha uma membrana de policarbonato com poros de 100 nm. O extrusor foi previamente aquecido a 65°C e cada formulação lipossomal foi extrudida entre 11 a 21 vezes. Por último, de forma a remover o etanol, bem como a calceína e a LUZ51b não encapsuladas, os lipossomas foram submetidos a uma cromatografia de exclusão molecular usando uma coluna de *sepharose* CL-2B equilibrada com HBS, pH=7.4.

### 5.2.5 Caracterização dos lipossomas

A caracterização dos lipossomas foi realizada recorrendo aos seguintes parâmetros: determinação da quantidade de lípido total a partir da quantificação do colesterol, quantificação da calceína e da LUZ51b, medição do tamanho médio e do índice de polidispersão, bem como a determinação do potencial zeta dos lipossomas.

Para a determinação das eficiências de encapsulação da calceína e da LUZ51b, foi necessário recorrer à quantificação destas duas moléculas nos lipossomas, bem como à determinação da quantidade de lípido total. A quantidade total de lípido foi aferida a partir da quantificação do colesterol nos lipossomas. Para a quantificação do colesterol recorreu-se a kit de quantificação de colesterol, MAK043, fornecido pela Sigma-Aldrich. Este kit permite a quantificação do colesterol com base numa reação enzimática que resulta num produto colorimétrico (570 nm) e fluorométrico (587 nm) proporcional à quantidade de colesterol presente. A reta de calibração foi realizada com a solução padrão de colesterol fornecido pelo kit e incluiu um intervalo de concentrações de 0  $\mu$  a 5  $\mu$ g. O volume de amostra utilizado foi de 10  $\mu$ L e todas as amostras foram analisadas em triplicado. Adicionou-se 50  $\mu$ L da mistura de enzima e sonda do kit à recta de calibração e amostras seguindo-se um período de incubação de 30 min a 37°C. Determinou-se a absorvância a 570 nm usando um espectrofotómetro PerkinElmer modelo Lambda 25. A partir da equação da recta de calibração, e por tratamento dos dados em folha de cálculo, obteve-se a quantidade de lípido total nos lipossomas.

A quantificação da calceína encapsulada foi determinada a partir de uma reta de calibração elaborada com uma solução de calceína de concentração conhecida. Para o efeito, adicionaram-se 5  $\mu$ L de calceína de concentração 4 mM a 195  $\mu$ L de tampão HBS com triton X-100 a 5% e homogeneizou-se. Desta diluição inicial retirou-se metade do volume (100  $\mu$ L), o qual foi adicionado ao poço seguinte contendo apenas 100  $\mu$ L de HBS com triton X-100 a 5%, e assim sucessivamente. Desta forma, obteve-se uma recta de calibração com um intervalo de quantidade de calceína de 0 a 10 nmol. O branco apenas incluiu 100

$\mu\text{L}$  de tampão HBS com triton a 5%. As amostras (10  $\mu\text{L}$ ) foram diluídas em 90  $\mu\text{L}$  de tampão HBS com 5% triton e analisadas em triplicados. Por último, determinou-se a fluorescência recorrendo ao espectrofotómetro Biotek Synergy Hit. A partir da equação da recta de calibração, e por tratamento dos dados em folha de cálculo, obteve-se a quantidade de calceína nos lipossomas. A quantificação da LUZ51b encapsulada nos lipossomas também foi determinada a partir de uma reta de calibração, a qual foi elaborada com uma solução de LUZ51b de concentração conhecida. Para o efeito, foi realizada uma recta de calibração de 0 a 2.6 nmol. Por último, determinou-se a fluorescência recorrendo ao espectrofotómetro Biotek Synergy Hit. A partir da equação da recta de calibração, e por tratamento dos dados em folha de cálculo, obteve-se a quantidade de LUZ51b nos lipossomas.

O tamanho dos lipossomas, bem como a homogeneidade de distribuição do tamanho, foram determinados pela técnica de dispersão dinâmica da luz (DLS, do inglês *dynamic light scattering*), que se baseia na dispersão da luz pelas partículas presentes na suspensão. Para o efeito, 10  $\mu\text{L}$  de amostra de cada formulação lipossomal foram diluídos em 3 mL de HBS sendo que foram realizados 3 ciclos de leitura, cada um com 13 repetições. O potencial zeta foi determinado após a adição da amostra diluída numa cuvete da Malvern, modelo Folded Capillary Zeta Cell, com dois eléctrodos, a qual foi posteriormente sujeita à aplicação de voltagem. Foram realizados 3 ciclos, cada um com 100 leituras. Quer o tamanho, quer o potencial zeta, foram medidos usando um equipamento Malvern, modelo Zetasizer Nano series.

#### *5.2.6 Avaliação da libertação de calceína após irradiação a 740 nm*

Os estudos de libertação da calceína encapsulada nas diferentes formulações lipossomais foram realizados com recurso à irradiação dos lipossomas com um LED a 740 nm. Diluíram-se diferentes volumes de lipossomas (equivalentes a 2, 1, 0.5 e 0.25 nmol de calceína) em HBS ( $V_f = 100 \mu\text{L}$ ) numa placa de 96 poços. Os lipossomas foram irradiados a 740 nm com um LED de fluência 14.93  $\text{mW}/\text{cm}^2$  (Biolambda). Foi avaliado o impacto da dose de luz e do protocolo de irradiação (umas versus múltiplas irradiações) na eficiência de libertação da calceína. A fluorescência da calceína foi medida antes e depois de cada

irradiação bem como, de hora a hora, após cada irradiação. A medição da fluorescência foi realizada num espectrofotômetro Biotek modelo Sinergy Hit com os filtros 533 nm para a excitação e 740 nm para a emissão. Amostras adicionais de lipossomas foram destruídas completamente pela adição de 5% Triton X-100, o que se considerou equivalente a uma libertação total (100%) de calceína. O cálculo da eficiência de encapsulação da calceína foi realizado de acordo com a equação 2:

$$\text{Libertação calceína (\%)} = ((F - F_0) / (F_{\text{tri}} - F_0)) \times 100, (1)$$

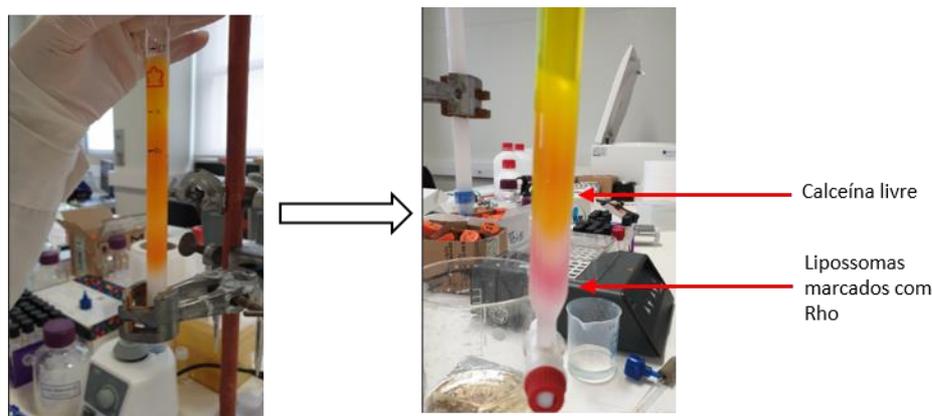
onde F corresponde à fluorescência da calceína após a iluminação,  $F_0$  corresponde à fluorescência inicial da calceína e  $F_{\text{tri}}$  corresponde à fluorescência da calceína após a rutura dos lipossomas com 5% do detergente Triton X-100.

## 6 Resultados

### 6.1. Otimização e caracterização de nanopartículas lipídicas para a encapsulação de calceína e preparados pelo método de hidratação do filme lipídico

Com o objetivo inicial de desenvolver uma nanopartícula lipídica encapsulando calceína, em vez de um ácido nucleico, foram testados dois métodos de preparação de lipossomas. Inicialmente, os lipossomas foram preparados pelo método de hidratação do filme lipídico, uma vez que, na literatura consultada, este era o método mais utilizado para este tipo de lipossomas. [67] Para o efeito, um filme lipídico constituído pela mistura de DODAP, DSPC, DSG-S--PEG e colesterol (6500 nmol), nas proporções indicadas na tabela 1, foi hidratado com 1 mL de uma solução de calceína 50 mM. Seguiu-se a extrusão dos lipossomas através de membranas de poro de 100 nm.

Para remover a calceína não encapsulada, os lipossomas foram extrudidos através de uma coluna, de largura 1 cm, preenchida com *sepharose* com uma altura de cerca de 17 cm. Observou-se que o tamanho era insuficiente para obter uma separação adequada entre os lipossomas e a calceína livre. Mudou-se então para uma coluna de largura de 2 cm, a qual foi preenchida com 12 cm de Sepharose. Para esta fase de otimização da coluna, preparou-se um novo lote de lipossomas contendo o lípido RH-PE de modo a conferir aos lipossomas uma coloração rosada. Estes foram misturados com calceína livre. Aquando da passagem na coluna de Sepharose, verificou-se que a formulação de lipossomas marcados com rodamina (banda rosa) aparecia separada da fração de calceína livre (banda amarela) (Figura 13). A existência de duas bandas de cores diferentes indicou que conseguiu-se separar de forma eficiente a calceína livre dos lipossomas.



**Figura 13:** Otimização do tamanho da coluna de Sepharose adequado a uma boa separação dos lipossomas contendo calceína da calceína livre (não encapsulada).

De seguida procedeu-se à quantificação do lípido total e da calceína de forma a calcular as eficiências de encapsulação (EE). A concentração de lípido total nos lipossomas foi aferida a partir da quantificação do colesterol como mencionado na secção dos Materiais e Métodos. A calceína foi quantificada, na presença do detergente Triton, por medição da fluorescência, como mencionado na secção anterior. Apesar da eficiência de encapsulação da calceína ter sido muito baixa (0.23%), verificou-se que o sinal de fluorescência da calceína encapsulada nos lipossomas encontrava-se relativamente suprimido (Tabela 1). De facto, na ausência do detergente Triton, a fluorescência basal de 20  $\mu$ L dos lipossomas num volume final de 200  $\mu$ L, foi de  $1011 \pm 75$  RFU enquanto na presença de 5% de Triton este valor subiu para  $5263 \pm 121$  RFU. Na tentativa de aumentar a eficiência de encapsulação da calceína, preparou-se um novo lote de lipossomas, mas com um passo adicional de três ciclos de congelação e descongelação. Contudo, este novo lote não revelou melhorias em relação à EE da calceína (0.13 %).

Procedeu-se igualmente à medição do tamanho dos lipossomas e respetivo índice de polidispersão. O tamanho é um parâmetro de elevada importância tendo em conta o impacto que tem na farmacocinética e biodistribuição dos lipossomas. Lipossomas com tamanho médio inferior a 200 nm, e incorporando na sua constituição lípidos acoplados a polímeros hidrofílicos, como por exemplo PEG, apresentam tempos de circulação mais longos. Tamanhos mais pequenos

também favorecem uma maior acumulação tumoral uma vez que beneficiam do efeito EPR (do inglês, *enhanced and permeability retention*). Este efeito é explicado pela elevada permeabilidade da vasculatura tumoral e por uma drenagem linfática deficiente do tecido tumoral. Por outro lado, lipossomas com tamanhos muito grandes tendem a acumular-se no tecido pulmonar. Ambas as formulações obtidas pelo método da hidratação apresentaram um tamanho médio de 60 nm (Tabela 3). Este tamanho é mais pequeno que os tamanhos médios descritos para LNPs, contendo ácidos nucleicos, e preparados pelo método de injeção de etanol. Tipicamente, estes tipos de lipossomas têm tamanhos situados no intervalo de 100 a 140 nm <sup>[68]</sup>. O tamanho mais pequeno da formulação preparada pelo método da hidratação é provavelmente uma consequência do método utilizado. Por outro lado, também pode ser explicado pelo facto da calceína ser substancialmente mais pequena que os diferentes tipos de ácidos nucleicos.

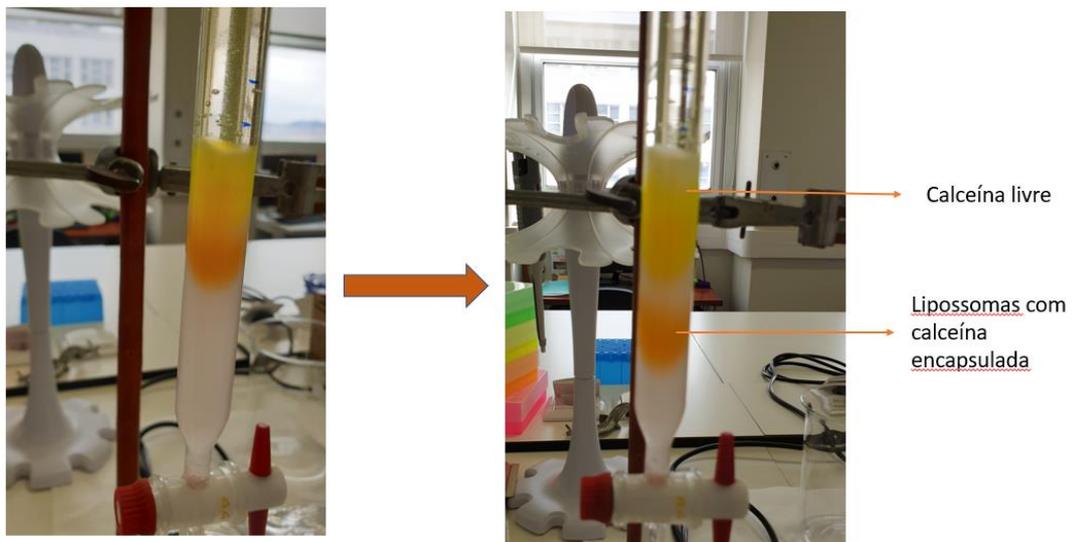
O índice de polidispersão fornece informação relativa à distribuição e homogeneidade da população lipossomal. O valor ideal deve ser o mais pequeno possível, preferencialmente inferior a 0.2. Valores elevados indicam a existência de lipossomas com diferentes tamanhos. O valor medido para a formulação preparada pelo método da hidratação do filme lipídico foi 0.17, o que indica que o tamanho dos lipossomas existentes na amostra era homogéneo (Tabela 3).

**Tabela 1: Composição lipídica dos lipossomas preparados pelo método de hidratação.**

| Composição e rácio lipídico (%)                          | Calceína                                      | [Lípidos] | Capacidade e de carga real               | E.E. (%)<br>calceína |
|--|---|-----------|--|----------------------|
| DODAP: DSPC: CHOL: DSG-S-PEG2000<br>30:20:42:8           | 1 mL de calceína<br>50 mM em HBS (50000 nmol) | 6.5 mM    | 0.18 nmol calceína/<br>nmol lípido total | 0.23 %               |
| DODAP: DSPC: CHOL: DSG-S-PEG2000: Rho-PE<br>29:20:43:8:1 | 1 ml HBS                                      | 6.5 mM    | NA                                       | NA                   |

## 6.2 Otimização e caracterização de lipossomas preparados pelo método de injeção de etanol

Segundo a literatura, o método de injeção de etanol é o método mais usado para encapsular ácidos nucleicos em LNPs. Assim, este método também foi testado para a encapsulação da calceína. Para o efeito misturou-se os lípidos DODAP, DSPC, DSG-S--PEG e colesterol em 200 µL de etanol (Tabela 2). Esta mistura foi posteriormente adicionada, gota a gota e sob agitação constante, a uma solução de 300 µL de calceína em tampão citrato (2500 nmol). Após a extrusão, os lipossomas obtidos foram corridos numa coluna de largura de 1 cm e empacotada com *Sepharose* (aproximadamente 12 cm de altura). Como é possível observar na Figura 14, verificou-se uma separação eficaz entre os lipossomas contendo calceína e a calceína não encapsulada.



**Figura 14:** Separação dos lipossomas encapsulando calceína da calceína livre usando uma coluna de Sepharose.

Apesar da capacidade de carga desta formulação (0.06 nmol calceína/ nmol lípido total) ser consideravelmente menor do que a formulação obtida pelo método da hidratação do filme lipídico, verificou-se que a eficiência de encapsulação foi consideravelmente maior (Tabela 2). Este resultado não é, contudo, inesperado considerando que a quantidade de calceína usada foi significativamente menor do que a usada na formulação anterior. É de salientar que apesar da capacidade de carga e a eficiência de encapsulação serem bastante baixas, a calceína encapsulada nos lipossomas apresentava o seu sinal de fluorescência suprimido. Por exemplo, a fluorescência registrada para a calceína em 20  $\mu$ L de lipossomas foi de  $709 \pm 92$  RFU na ausência de Triton e aumentou, na presença de 5% de Triton, para  $7903 \pm 1194$  RFU.

De seguida, mediu-se o diâmetro médio dos lipossomas. Os lipossomas obtidos pelo método de injeção de etanol e contendo calceína apresentavam um tamanho médio de aproximadamente 80 nm logo, cerca de 20 nm maiores que os obtidos pelo método da hidratação (Tabela 3).

**Tabela 2: Composição lipídica dos lipossomas preparados pelo método de injeção de etanol.**

| Composição e rácio lipídico (%)                | Calceína   | [Lípidos] | Capacidade de carga real             | E.E. (%) |
|--|--|-----------|--------------------------------------|----------|
| DODAP: DSPC: CHOL: DSG-S-PEG2000<br>30:20:42:8 | 300 µL de calceína em tampão citrato (2500 nmol) | 19.5 mM   | 0.06 nmol calceína/nmol lípido total | 24.45 %  |

Considerando que o método de injeção do etanol é mais interessante para a encapsulação de ácidos nucleicos e uma vez que os nossos resultados mostraram que este método também permite encapsular a calceína decidiu-se então que todas as formulações a usar no contexto deste trabalho seriam preparadas pelo método de injeção de etanol.

**Tabela 3: Tamanho médio dos lipossomas contendo calceína e preparados por diferentes métodos**

| Método de preparação   | Tamanho médio (nm) | Índice polidispersão |
|--|--------------------|----------------------|
| Método de hidratação do filme lipídico   | 60,4 ± 0,34 nm     | 0,122                |
| Método de hidratação do filme lipídico com 3 ciclos de congelação/ descongelação | 66,7 ± 0,35 nm     | 0,193                |
| Método de injeção de etanol  | 66,7 ± 0,51nm      | 0,062                |

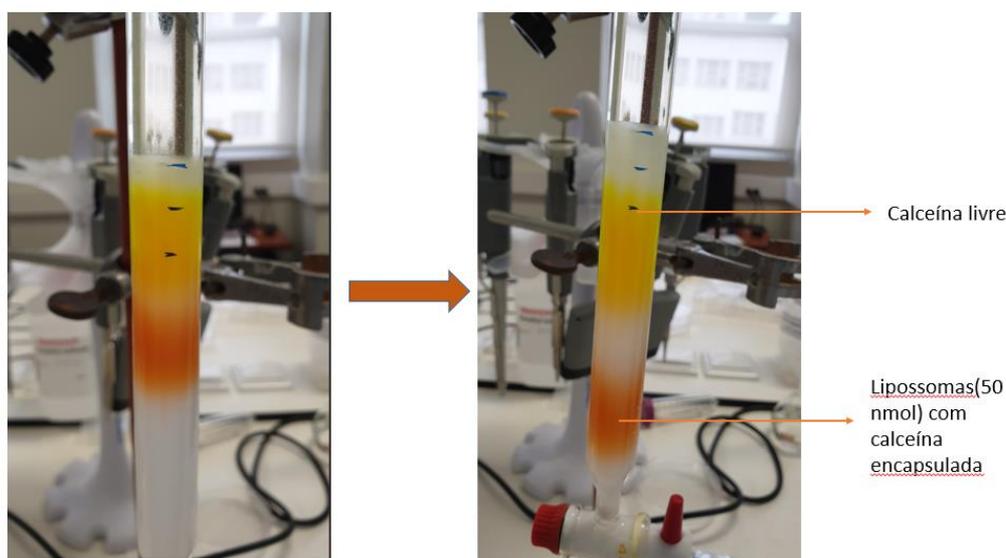
### 6.3. Preparação e caracterização de lipossomas para a encapsulação de calceína (meio aquoso) e LUZ51b (membrana lipídica)

Com o objetivo de obtermos formulações lipossomais passíveis de serem ativáveis pela luz, nomeadamente na zona do infravermelho, trabalhou-se com o fotossensibilizador LUZ51b, desenvolvido pela Luzitin.<sup>[69]</sup> A LUZ51b é uma

bacterioclorina de dimensões relativamente pequenas (600 g/mol) e de carácter lipofílico. Estas características fazem deste composto um bom candidato para encapsulação na bicamada lipídica dos lipossomas com o objectivo final de tornar estas formulações lipossomais ativáveis pela luz. Trabalhos de outros autores demonstraram que é possível incorporar fotossensibilizadores lipofílicos, (e.g. verteporfin) nas membranas de lipossomas de diferentes constituições lipídicas, nomeadamente pelo método da hidratação do filme lipídico. [70,71] Contudo, desconhecemos que o método de injeção de etanol tenha sido utilizado para a encapsulação de fotossensibilizadores na membrana lipídica. O primeiro desafio encontrado prendeu-se com a fraca solubilidade da LUZ51b em etanol. Verificamos que stocks de LUZ51b em etanol com concentrações superiores a 1 mM rapidamente precipitavam pelo que fomos obrigados a utilizar stocks com concentrações entre 0.4 a 0.6 mM.

#### *6.3.1 Lipossomas preparados com uma quantidade inicial de 50 nmol de LUZ51b: Formulação LUZ51b-50*

Para a preparação dos lipossomas, a LUZ51b dissolvida em etanol foi adicionada à mistura de lípidos, DODAP, DSPC, DSG-S—PEG e colesterol, também em etanol. Numa fase inicial, a quantidade de LUZ51b usada para a preparação dos lipossomas foi de 50 nmol para uma quantidade de lípido total de 6500 nmol (Tabela 4). A mistura de lípidos e LUZ51b foi ajustada para um volume final de 200 µL etanol. Esta mistura foi posteriormente adicionada, gota a gota e sob forte agitação mecânica, a 300 µL de calceína em citrato. Este passo de diluição do etanol leva à formação espontânea de vesículas lipossomais, as quais foram posteriormente submetidas a extrusão e passagem numa coluna empacotada com *Sepharose*. (Figura 15) Em paralelo, também se preparou uma formulação equivalente, mas sem a LUZ51b, que serviria de controlo (Ctr) para as experiências de libertação da calceína após irradiação.



**Figura 15:** Separação dos lipossomas encapsulando calceína e LUZ51b da calceína e da LUZ51b livres usando uma coluna de Sepharose.

**Tabela 4:** Composição lipídica dos lipossomas preparados pelo método de injeção de etanol para encapsulação de calceína e LUZ51b (LUZ51b-50) e respectiva formulação controlo, ou seja, sem LUZ51b (Ctr)

| Nome             | Composição e rácio lipídico (%)                             | Calceína                    | Lípidos             | LUZ51b            | Carga calceína                              | Carga Luz51b                               |
|------------------|---|-----------------------------|---------------------|-------------------|---|--|
| <b>LUZ51b-50</b> | DODAP:<br>DSPC:<br>CHOL:<br>DSG-S-<br>PEG2000<br>30:20:42:8 | 3500 nmol em tampão citrato | 6500 nmol em etanol | 50 nmol em etanol | 0.54 nmol de calceína/<br>nmol lípido total | 0.008 nmol de Luz51b/<br>nmol lípido total |
| <b>Ctr</b>       | DODAP:<br>DSPC:<br>CHOL:<br>DSG-S-<br>PEG2000<br>30:20:42:8 | 3500 nmol em tampão citrato | 6500 nmol em etanol | -                 | 0.54 nmol de calceína/<br>nmol lípido total | -  |

A capacidade de carga de ambas as formulações para a calceína era igual (0,54 nmol calceína/ nmol lípido total), contudo verificou-se que a eficiência de

encapsulação da formulação controlo (ctr) relativamente à que contém o fotossensibilizador LUZ51b é maior (Tabela 5). Este resultado não é inesperado uma vez que como o fotossensibilizador é lipofílico e fica retido na membrana, a presença deste deve aumentar o tamanho da bicamada e dificultar a migração das moléculas de calceína para o interior do lipossoma.

O resultado relativo à encapsulação de LUZ51b não é inesperado uma vez que 50 nmol deste composto pode não ser a quantidade suficiente para o volume total de solução (500 $\mu$ L).

De seguida, mediu-se o tamanho dos lipossomas contendo, ou não, o fotossensibilizador. O tamanho médio era respetivamente de 102.8 e de 68.2 nm. Este resultado indica que ambas as formulações têm o tamanho adequado para uma eventual administração sistémica permitindo atingir o alvo terapêutico, sem que fiquem retidos nos órgãos respiratórios. Já o índice de polidispersão no caso dos lipossomas que contém LUZ51b (0.258) indica que há pouca homogeneidade da amostra lipossomal.

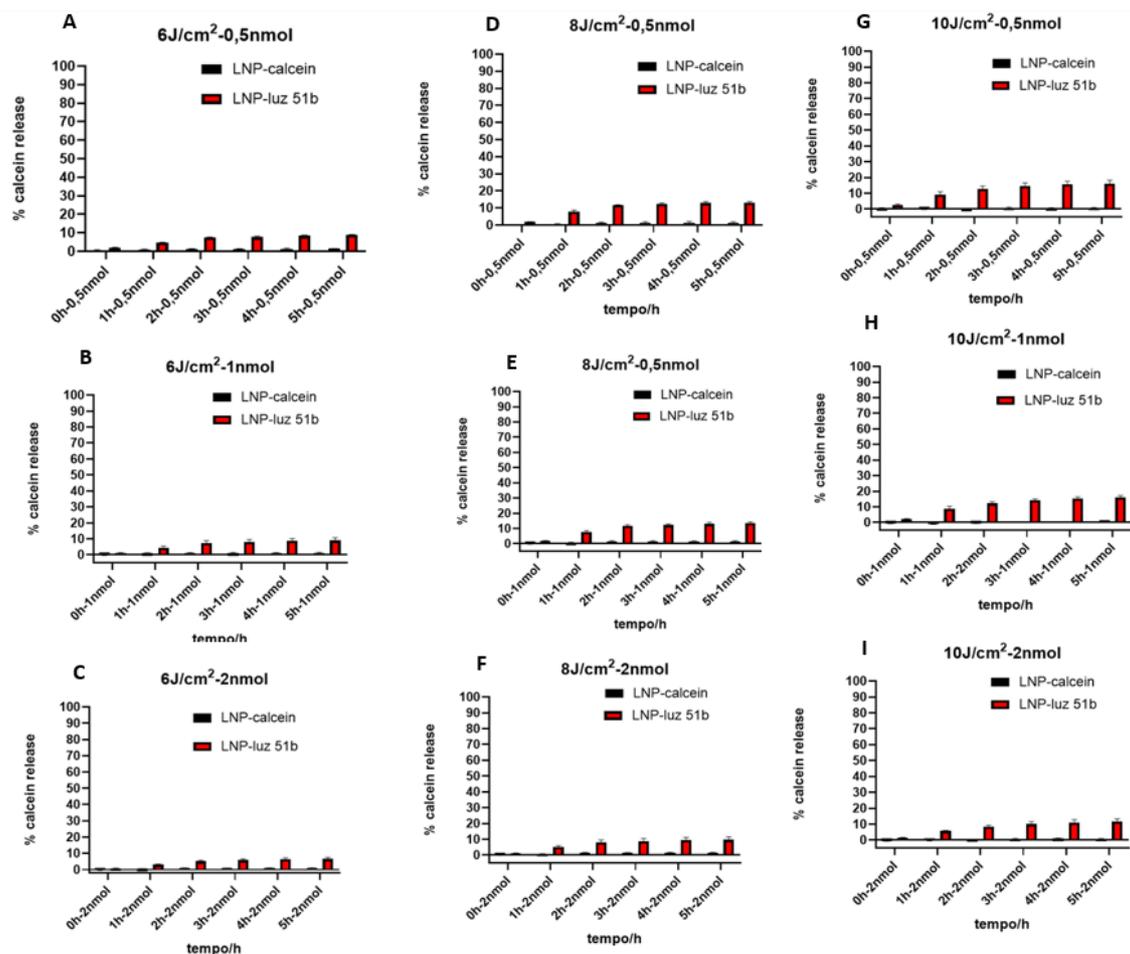
O Potencial Zeta, ou potencial  $\zeta$ , é uma abreviação de potencial eletrocinético em sistemas coloidais. Do ponto de vista teórico, é o potencial elétrico na dupla camada interfacial de uma partícula ou gota dispersa *versus* um ponto na fase contínua longe da interface, ou seja, é a diferença de potencial entre o meio de dispersão móvel e o meio estacionário de dispersão ligado à partícula. Emulsões com valor elevado de potencial zeta (negativo ou positivo) são eletricamente mais estáveis, enquanto valores mais baixos desta propriedade tendem a resultar em agregação de diferentes nanopartículas. Em geral, quando o potencial zeta de uma emulsão é alto, as forças repulsivas excedem as forças atrativas, resultando em um sistema relativamente estável. No caso de os valores se encontrarem entre -10 mV e 10 mV, são considerados neutros.

Como indicado na tabela 5, quer a formulação que contém o fotossensibilizador quer a controlo, são neutras indicando que provavelmente não terão grande capacidade de interação com a membrana celular.

**Tabela 5: Caracterização das formulações LUZ51b-50 e Ctr**

| Nome             | Carga calceína real                         | Carga LUZ51b real                          | % EE (calceína) | % EE (Luz51b) | Tamanho (nm) | IP    | Potencial zeta |
|------------------|---|--|-----------------|---------------|--------------|-------|----------------|
| <b>LUZ51b-50</b> | 0,54 nmol de calceína/<br>nmol lípido total | 0,008 nmol de Luz51b/<br>nmol lípido total | 16,9            | 31,4          | 102,8        | 0,258 | -1,03          |
| <b>Ctr</b>       | 0,54 nmol de calceína/<br>nmol lípido total | 0 nmol de Luz51b/<br>nmol lípido total     | 24,0            | N/A           | 68,2         | 0,065 | 1,49           |

Para verificar se os lipossomas **LUZ51b-50** eram ativáveis pela ação de uma fonte de luz externa, diferentes quantidades de lipossomas, equivalentes a 0.5, 1 e 2 nmol de calceína encapsulada, foram irradiados a 740 nm com uma dose de luz de 6 J/cm<sup>2</sup> e 8 J/cm<sup>2</sup>. O sinal de fluorescência da calceína foi medido a diferentes intervalos de tempo após a irradiação e normalizado em função do sinal de fluorescência obtido na presença do detergente Triton. Os resultados obtidos demonstram que houve uma maior liberação de calceína da formulação **LUZ51b-50**, do que com a formulação **Ctr**. Esta liberação foi ligeiramente superior com a dose de luz de 8 J/cm<sup>2</sup> do que com 6 J/cm<sup>2</sup> e aumentou ligeiramente com o tempo. Contudo, a % de liberação de calceína foi, de forma geral, muito baixa (< 10%) para todas as condições testadas (Figura 16). Por esta razão, resolveu-se aumentar a dose de luz para 10 J/cm<sup>2</sup>. Embora se tenha observado um aumento na % de liberação da calceína, esta não ultrapassou os 15 %. É ainda de salientar que no caso da formulação **Ctr** não se observou praticamente nenhuma liberação da calceína (Figura 16).



**Figura 16:** Libertação da calceína após irradiação, a 740 nm, dos lipossomas com uma dose de luz de (A-C) 6 J/cm<sup>2</sup>; (D-F) 8 J/cm<sup>2</sup> e (G-I) 10 J/cm<sup>2</sup>.

### 6.3.2 Lipossomas preparados com uma quantidade inicial de 100 nmol de LUZ51b: Formulação LUZ51b-100

Apesar dos resultados obtidos com a formulação **LUZ51b-50** não terem sido muito expressivos, pode-se concluir que a presença da LUZ51b teve um impacto positivo na libertação da calceína. De forma a potenciar estes resultados, resolveu-se preparar lipossomas com maiores quantidades de LUZ51b. De forma a preparar os lipossomas seguiu-se o mesmo procedimento descrito anteriormente, sendo que neste caso se adicionaram 100 nmol de LUZ51b.

A capacidade de carga de calceína de ambas as formulações, com e sem LUZ51b, era de 0,54 nmol calceína/nmol lípido total. Contudo, verificou-se que a eficiência de encapsulação da formulação controlo é maior relativamente à que continha o fotossensibilizador LUZ51b. Este resultado pode ser explicado pelo facto do fotossensibilizador ser lipofílico e se localizar especialmente na

membrana do lipossoma. Assim, a sua localização junto aos lípidos compromete a migração da calceína para o interior lipofílico e por sua vez a encapsulação.

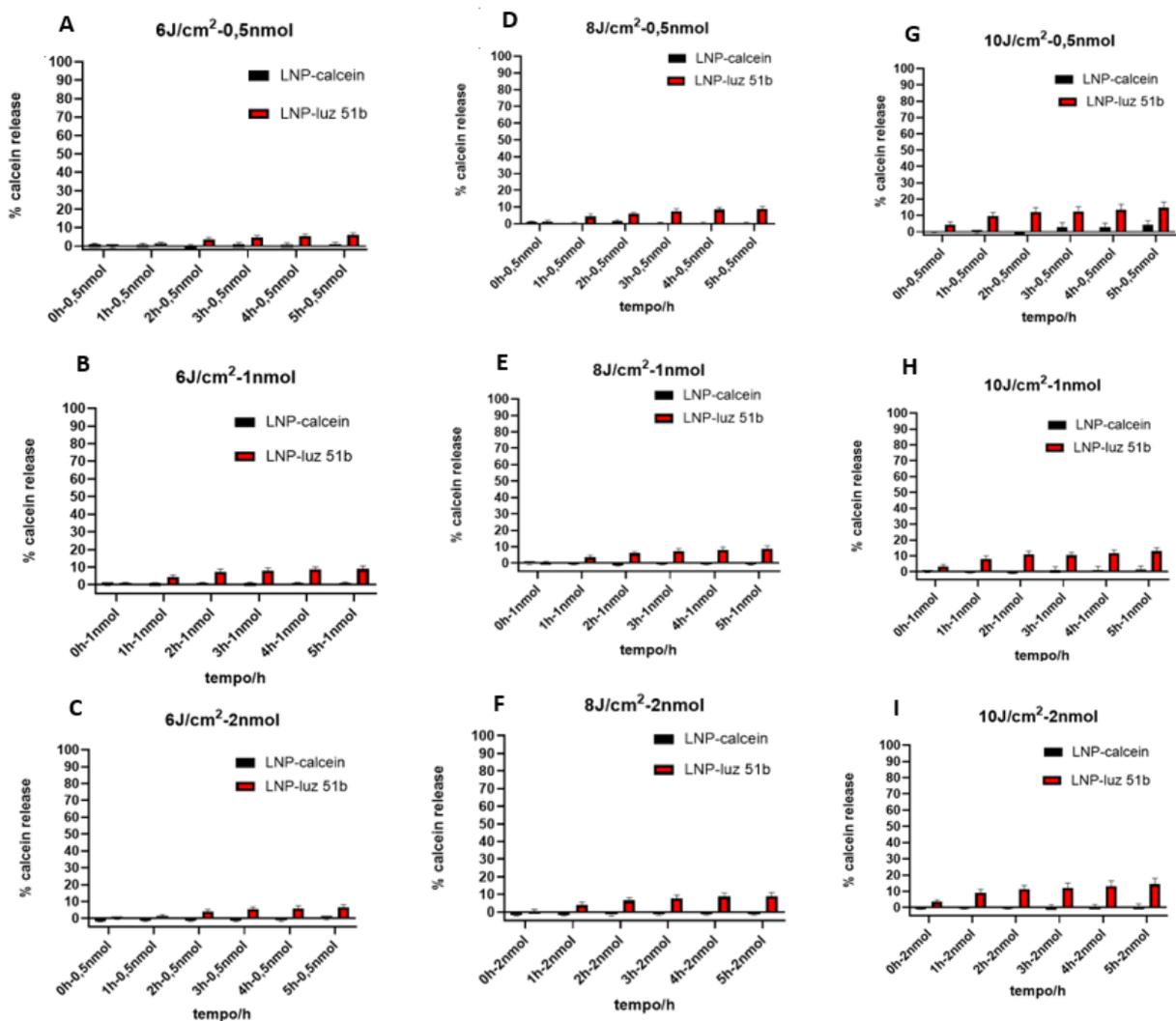
O resultado relativo à encapsulação de LUZ51b (63.8 %) não é inesperado quando comparado ao obtido com 50 nmol. A quantidade mais elevada de LUZ51b aumenta a probabilidade de encapsulação uma vez que o volume do fluoróforo por volume total de solução (500µL) é maior.

De seguida mediu-se o tamanho dos lipossomas contendo o fotossensibilizador, e dos lipossomas controlo. O tamanho médio foi respetivamente de 56,8 e 65,6 nm, o que indica que ambos têm tamanho adequado para administração sistémica sem que fiquem retidos nos órgãos respiratórios. Já o índice de polidispersão em ambos o caso é inferior a 0,2 o que indica que há homogeneidade na amostra. A percentagem de encapsulação de calceína em relação à obtida na formulação de **LUZ51b-50** é inferior, o que poderá explicar o facto do diâmetro dos lipossomas **LUZ51b-100** ser menor. O potencial zeta para as amostras encontrou-se entre -10 mV e 10 mV pelo que são considerados neutros (Tabela 6).

**Tabela 6: Caracterização das formulações LUZ51b-100 e Ctr.**

| Nome              | Carga calceína real                      | Carga LUZ51b real                       | % EE (calceína) | % EE (Luz51b) | Tamanho (nm) | IP    | Potencial zeta |
|-------------------|--|---|-----------------|---------------|--------------|-------|----------------|
| <b>LUZ51b-100</b> | 0,54nmol de calceína/ nmol lípido total  | 0,015 nmol de Luz51b/ nmol lípido total | 13,1            | 63,8          | 56,8         | 0,197 | -3,93          |
| <b>Ctr</b>        | 0,54 nmol de calceína/ nmol lípido total | 0 nmol de Luz51b/ nmol lípido total     | 19,5            | N/A           | 65,6         | 0,123 | -2,530         |

Para verificar se os lipossomas **LUZ51b-100** eram ativáveis pela ação de uma fonte de luz externa, diferentes quantidades de lipossomas, equivalentes a 0.5, 1 e 2 nmol de calceína encapsulada, foram irradiados a 740 nm com uma dose de luz de 6 J/cm<sup>2</sup> e 8 J/cm<sup>2</sup>. O sinal de fluorescência da calceína foi medido a diferentes intervalos de tempo após a irradiação e normalizado em função do sinal de fluorescência obtido na presença do detergente Triton. Os resultados obtidos demonstram que houve uma maior liberação de calceína da formulação **LUZ51b-100** do que com a formulação **LUZ51b-50** o que pode ser explicado por uma maior encapsulação de LUZ51b. Esta liberação foi ligeiramente depende da dose de luz sendo que os valores mais altos de liberação de calceína foram verificados com 10 J/cm<sup>2</sup>. Contudo, a % de liberação de calceína continuou relativamente baixa (< 30%) para todas as condições testadas. É ainda de salientar que no caso da formulação **Ctrl** não se observou praticamente nenhuma liberação da calceína, o que confirma o benefício da presença de LUZ51b (Figura 17).



**Figura 17:** Libertação da calceína após irradiação, a 740 nm, dos lipossomas com uma dose de luz de (A-C) 6 J/cm<sup>2</sup>; (D-F) 8 J/cm<sup>2</sup> e (G-I) 10 J/cm<sup>2</sup>.

### 6.3.3 Lipossomas preparados com uma quantidade inicial de 150 nmol de LUZ51b: Formulação LUZ51b-150

De seguida, e de forma a potenciar ainda mais a libertação de calceína, preparou-se um novo lote de lipossomas, mas agora com 150 nmol de LUZ51b, e uma formulação controlo sem LUZ51b (Tabela 7). Considerando que os resultados obtidos, em relação à libertação de calceína, com o primeiro lote desta formulação foram relativamente promissores, foram preparados mais dois lotes adicionais. Assim, os resultados apresentados em baixo, em relação à libertação de calceína, representam a média de três experiências independentes.

O resultado relativo à encapsulação de LUZ51b revela uma variabilidade significativa entre lotes o que indica que o processo de encapsulação da LUZ51b provavelmente ainda precisa de ser otimizado.

O tamanho dos lipossomas contendo o fotossensibilizador foi de 66.1, 122.3 e 65.3 nm. O lote com lipossomas com maior tamanho (122.3 nm) foi também o lote onde o índice de polidispersão foi maior, o que poderá estar relacionado com o facto deste lote ter sido o de maior eficiência de encapsulação da LUZ51b (88.9 %). A percentagem de encapsulação de calceína desta formulação preparada com 150 nmol de LUZ51b foi significativamente inferior à obtida com as formulações **LUZ51b-50** e **LUZ51b-100**.

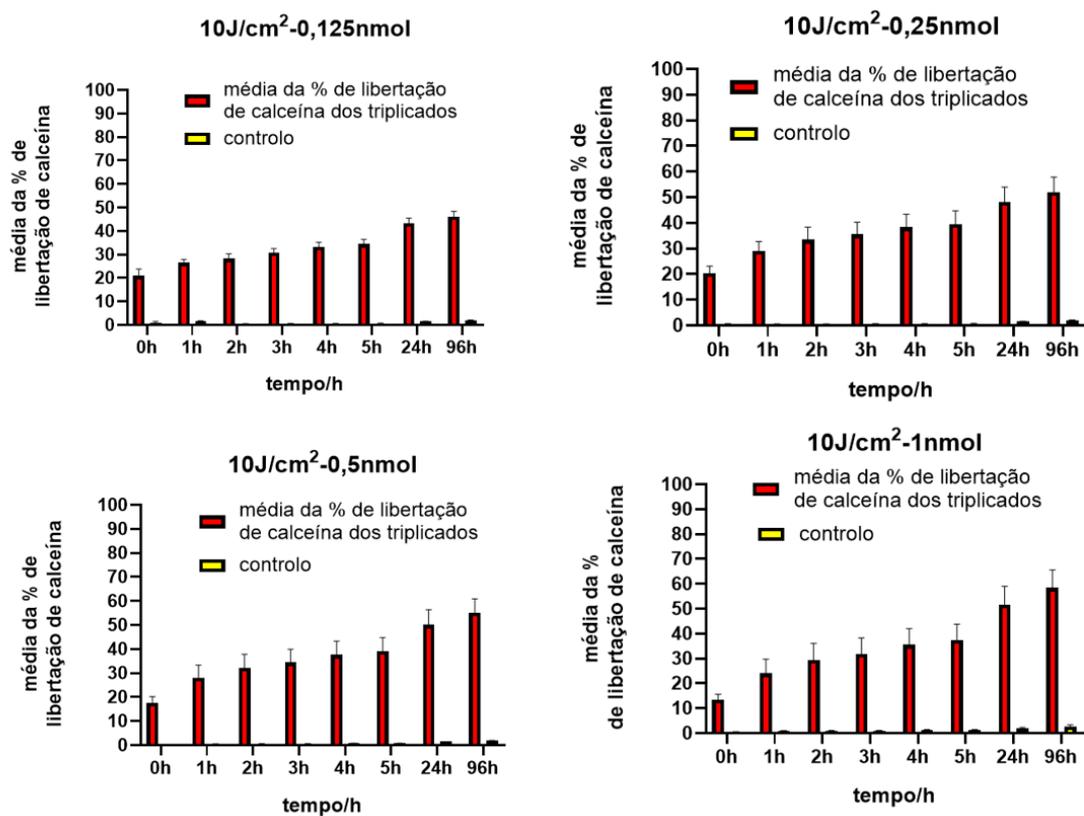
O potencial zeta para todas as formulações **LUZ51b-150** encontrou-se entre -1 mV e 10 mV pelo que são considerados neutros (Tabela 7).

Para verificar se os lipossomas **LUZ51b-150** permitiam melhorar a eficiência de libertação da calceína em relação às formulações anteriores, LUZ51b-50 e LUZ51b-100, diferentes quantidades de lipossomas, equivalentes a 0.125, 0.25, 0.5 e 1nmol de calceína encapsulada, foram irradiados a 740 nm com diferentes protocolos de irradiação: a) dose de luz de 10 J/cm<sup>2</sup> aplicada numa única irradiação, b) dose de luz de 8 J/cm<sup>2</sup> repartido em 4 irradiações, cada uma de 2 J/cm<sup>2</sup> separadas entre si por um intervalo de 1h e, c) dose de luz de 10 J/cm<sup>2</sup> que resultaram de duas irradiações de 5 J/cm<sup>2</sup> separadas por um intervalo de 1h. O sinal de fluorescência da calceína foi medido imediatamente antes e após cada irradiação. Após a última irradiação, o sinal da calceína foi medido a diferentes intervalos de tempo, tal como indicado nos gráficos das Figuras 19 e 20.

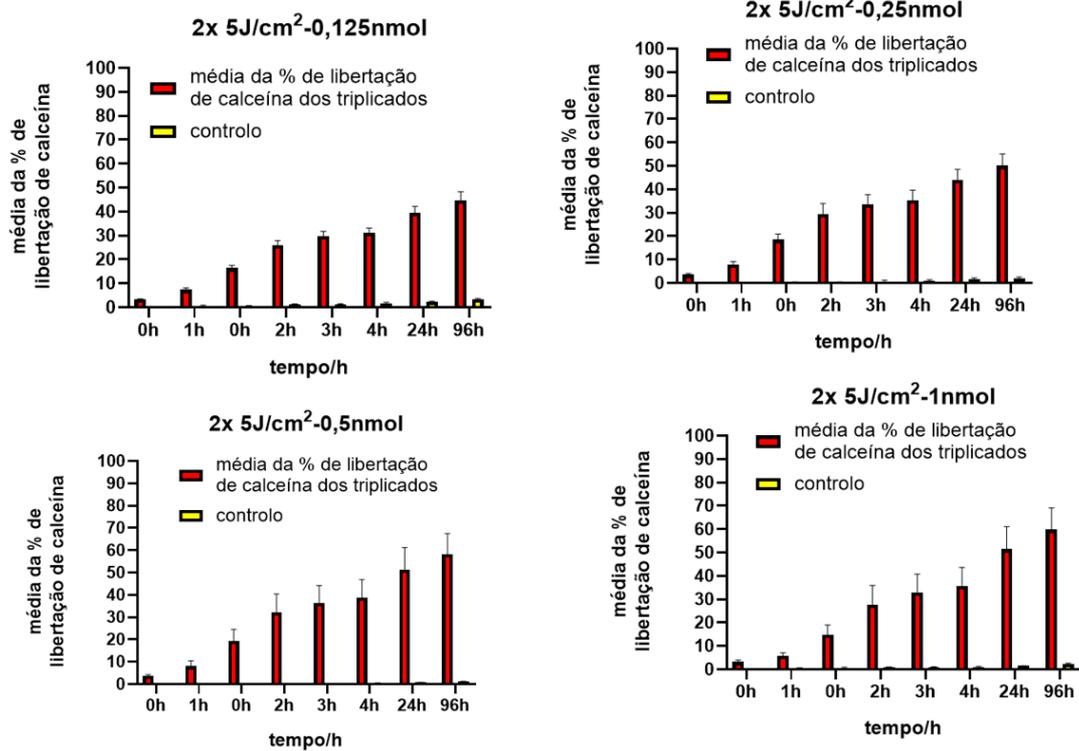
De uma forma geral, os resultados obtidos demonstram que para todos os protocolos testados houve uma libertação significativa da calceína. Os níveis de libertação observados foram muito superiores aos observados com as formulações anteriores atingindo valores máximos próximos de 60 %. É ainda de salientar que, mais uma vez, no caso da formulação **ctr** não se observou libertação significativa da calceína (Figura 18,19 e 20).

**Tabela 7: Caracterização das formulações LUZ51b-150 e Ctr.**

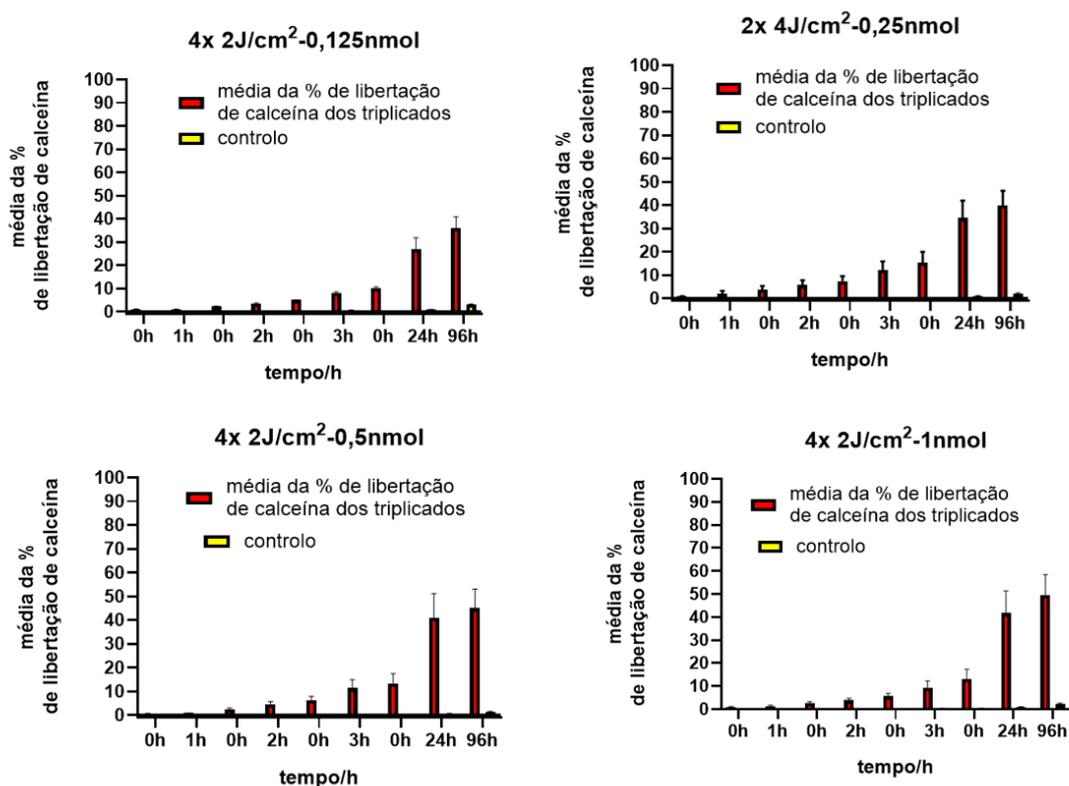
|                       | Carga calceína real                      | Carga LUZ51b real                       | % EE (calceína) | % EE (Luz51b) | Tamanho (nm) | IP    | Potencial zeta |
|-----------------------|--|---|-----------------|---------------|--------------|-------|----------------|
| <b>LUZ51 b-150-2</b>  | 0,54nmol de calceína/ nmol lípido total  | 0,023 nmol de Luz51b/ nmol lípido total | 3,12            | 38,1          | 66,1         | 0,09  | -1,85          |
| <b>Ctr-4</b>          | 0,54 nmol de calceína/ nmol lípido total | 0 nmol de Luz51b/ nmol lípido total     | 2,9             | N/A           | 93,8         | 0,342 | -1,17          |
| <b>LUZ51 b-150-28</b> | 0,54nmol de calceína/ nmol lípido total  | 0,023 nmol de Luz51b/ nmol lípido total | 5,42            | 88,9          | 122,3        | 0,23  | -1,68          |
| <b>LUZ51 b-150-29</b> | 0,54 nmol de calceína/ nmol lípido total | 0,023 nmol de Luz51b/ nmol lípido total | 3,14            | 55,0          | 65,3         | 0,148 | -0,26          |



**Figura 18:** Libertação da calceína após irradiação, a 740 nm, dos lipossomas com uma dose de luz de 10J/cm<sup>2</sup>. Cada barra representa a média ± o desvio padrão de 3 experiências independentes.



**Figura 19:** Libertação da calceína após irradiação, a 740 nm, dos lipossomas com uma dose de luz 10 J/cm<sup>2</sup> repartida em 2 irradiações de 5 J/cm<sup>2</sup>. Cada barra representa a média ± o desvio padrão de 3 experiências independentes.



**Figura 20:** Libertação da calceína após irradiação, a 740 nm, dos lipossomas com uma dose de luz 8 J/cm<sup>2</sup> repartida em 4 irradiações de 2 J/cm<sup>2</sup>. Cada barra representa a média ± o desvio padrão de 3 experiências independentes.

#### 6.4.1 Resultados obtidos com Lipossomas com DOPC

Os resultados obtidos com as formulações **LUZ51b-150** permitiram níveis de libertação da calceína bastante promissores (> 50%) mas sem nunca chegar a uma eficiência de 100%. Assim, com o objectivo de melhorar a resposta, da nanopartícula lipídica encapsulando calceína, à luz, resolveu-se estudar o impacto da presença de lípidos insaturados na membrana dos lipossomas. O lípido selecionado foi o DOPC, o qual contém 1 insaturação em cada cadeia hidrocarbonada. A fluidez da membrana é afetada pelo número de insaturações nos grupos hidrocarbonetos alojados na membrana. As duplas ligações perturbam o arranjo e fluidez da membrana, uma vez que a tensão torsional das caudas hidrofóbicas permite a criação de espaços que facilitam a libertação do conteúdo lipossomal. [72] Os lipossomas contendo DOPC (em vez do DSPC) também foram preparados pelo método de injeção do etanol, como descrito anteriormente (Tabela 8).

**Tabela 8: Composição lipídica dos lipossomas preparados pelo método de injeção de etanol para encapsulação de calceína e LUZ51b (LUZ51b-DOPC) e respetiva formulação controlo, ou seja, sem LUZ51b (Ctr)**

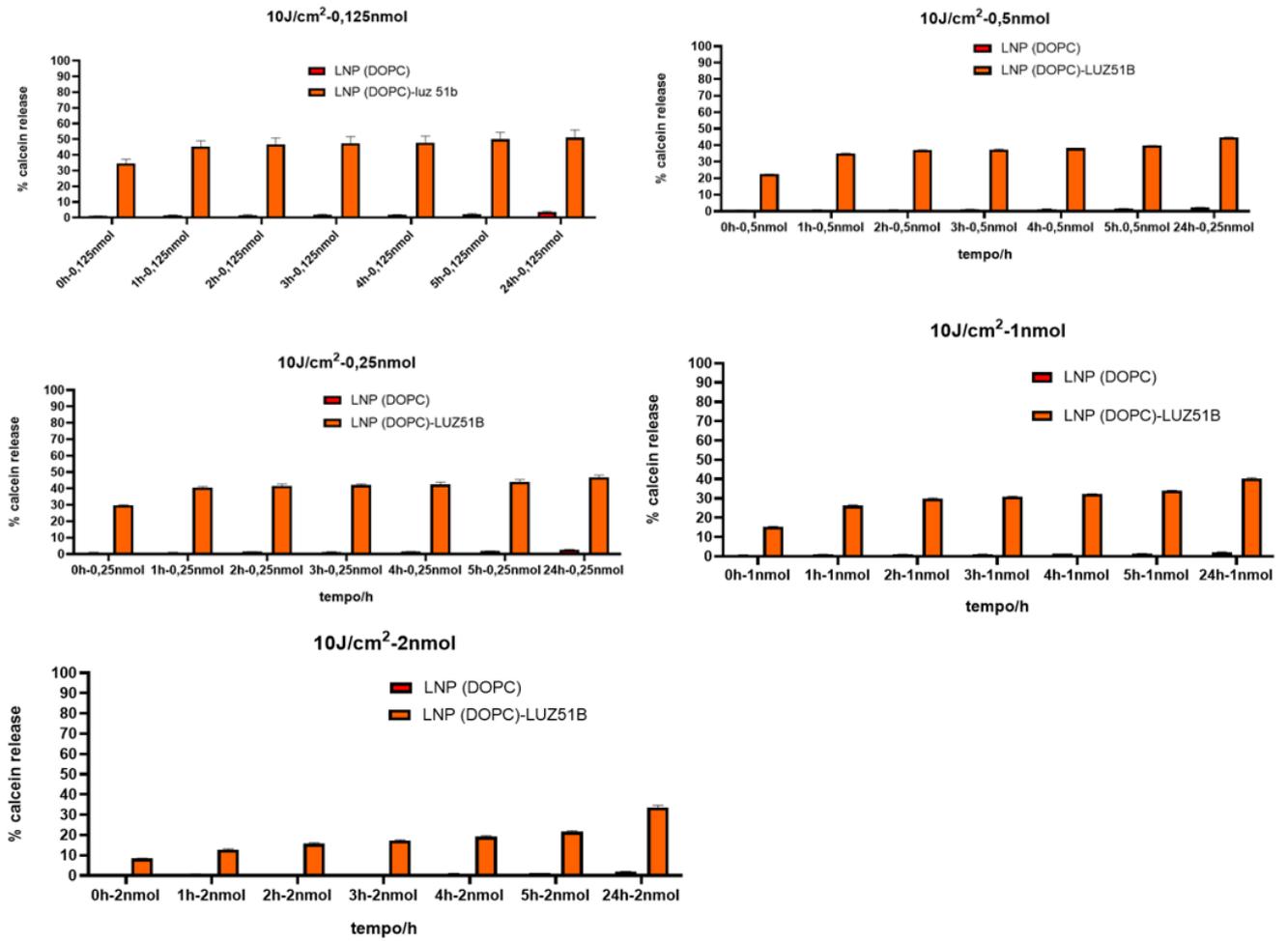
| Nome               | Composição e rácio lipídico (%)                             | Calceína                    | Lípidos             | LUZ51b             | Carga calceína                          | Carga Luz51b                           |
|--------------------|---|-----------------------------|---------------------|--------------------|---|--|
| <b>LUZ51b-DOPC</b> | DODAP:<br>DOPC:<br>CHOL:<br>DSG-S-<br>PEG2000<br>30:20:42:8 | 3500 nmol em tampão citrato | 6500 nmol em etanol | 150 nmol em etanol | 0.54 nmol de calceína/nmol lípido total | 0.023 nmol de Luz51b/nmol lípido total |
| <b>Ctr</b>         | DODAP:<br>DOPC:<br>CHOL:<br>DSG-S-<br>PEG2000<br>30:20:42:8 | 3500 nmol em tampão citrato | 6500 nmol em etanol | -                  | 0.54 nmol de calceína/nmol lípido total | -                                      |

Verificou-se que a eficiência de encapsulação da calceína e da LUZ51b foi semelhante à obtida nas formulações com DSPC. O tamanho médio dos lipossomas contendo o fotossensibilizador e os controlos foi respetivamente de 56,8 nm e de 65,6 nm logo, semelhante às formulações com DSPC. O índice de polidispersão foi inferior a 0.2 o que indica que há homogeneidade da amostra. O potencial zeta para as amostras encontrou-se entre -10 mV e 10 mV pelo que são considerados neutros (Tabela 9).

**Tabela 9: Caracterização das formulações LUZ51b-150-DOPC e Ctr.**

| Nome               | Carga calceína real                      | Carga LUZ51b real                       | % EE (calceína) | % EE (Luz51b) | Tamanho (nm) | IP    | Potencial zeta |
|--------------------|--|---|-----------------|---------------|--------------|-------|----------------|
| <b>LUZ51b-DOPC</b> | 0,54 nmol de calceína/ nmol lípido total | 0,015 nmol de Luz51b/ nmol lípido total | 5,59            | 63,8          | 56,8         | 0,197 | -3,93          |
| <b>Ctr</b>         | 0,54 nmol de calceína/ nmol lípido total | 0 nmol de Luz51b/ nmol lípido total     | 3,74            | N/A           | 65,6         | 0,123 | -2,530         |

Para verificar se os lipossomas **LUZ51b-150-DOPC** eram ativáveis pela ação de uma fonte de luz externa, diferentes quantidades de lipossomas, equivalentes a 0.125, 0.25, 0.5, 1 e 2 nmol de calceína encapsulada, foram irradiados a 740 nm com uma dose de luz 10 J/cm<sup>2</sup>. O sinal de fluorescência da calceína foi medido a diferentes intervalos de tempo após a irradiação e normalizado em função do sinal de fluorescência obtido na presença do detergente Triton. Os resultados obtidos demonstram que a liberação de calceína foi maior para quantidades menores de calceína por volume de solução. Esta liberação aumentou ligeiramente com o tempo. Contudo, a % de liberação de calceína não ultrapassou os 50 % para todas as condições testadas (Figura 21). Este resultado demonstra que, ao contrário do que seria de esperar, a presença do lípido insaturado não trouxe melhorias nos níveis de liberação de calceína.



**Figura 21:** Libertação da calceína após irradiação, a 740 nm, dos lipossomas preparados com DOPC. A dose de luz utilizado foi de 10 J/cm<sup>2</sup>.

# Conclusão

Dos estudos efetuados com as diferentes formulações preparadas, observou-se que a libertação da calceína foi maior nas formulações preparadas com maior quantidade de LUZ51b (150 nmol). De igual forma, a libertação da calceína também se revelou dependente da dose de luz utilizada. O protocolo mais eficiente foi obtido com a formulação **LUZ51b-150** após irradiação de uma dose única correspondente a 10 J/cm<sup>2</sup>. A presença do fotossensibilizador revelou-se um fator muito importante na promoção da libertação da calceína, uma vez que os lipossomas controlo (ou seja, sem LUZ51b) não resultaram em qualquer libertação da calceína ao longo do tempo. De uma forma geral, os resultados obtidos mostram que a formulação desenvolvida com 150 nmol de LUZ51b tem potencial para constituir uma nova nanopartícula passível de activação por uma fonte externa de luz. Contudo, ainda há várias limitações a superar nomeadamente os baixos níveis de eficiência de encapsulação, quer da calceína quer da LUZ51b. É de esperar que melhorando os níveis de encapsulação da LUZ51b também se consiga potenciar ainda mais a libertação da calceína. Seria ainda desejável que os diferentes lotes de lipossomas preparados pelo método de injeção do etanol fossem mais reprodutíveis.

No futuro, seria importante confirmar o potencial das formulações desenvolvidas *in vitro*, nomeadamente para verificar se existe libertação endossomal significativa. Finalmente, para aumentar a especificidade para o alvo terapêutico e internalização celular, o uso de ligandos é uma possibilidade a explorar.

# Referências

1. Oral cancer prevention and control – The approach of the World Health Organization. Volume 45, Issues 4–5, April–May 2009: 454-460
2. A review on dangerous neoplasm cancer Vipin Kesharwani, Sudha Kumari, Nikhil Kushwaha and Kuldeep Singh, The Pharma Innovation Journal 2019; 8(11): 302-309
3. Hallmarks of cancer: the next generation”, Weinberg and Hanahan 2011
4. <https://www.ligacontracancro.pt/melanoma-efeitos-secundarios/>
5. <https://www.ligacontracancro.pt/metodos-de-tratamento/>
6. Carthew RW, Sontheimer WJ. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. Cell. 2009;136:642–655
7. Wilson RC, Doudna JA. Molecular Mechanisms of RNA Interference. Annu. Rev. Biophys. 2013;42:217–239.
8. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. Nature. 1998;391:806–811.
9. Endoh T, Ohtsuki T. Cellular siRNA delivery using cell-penetrating peptides modified for endosomal escape. Advanced Drug Delivery Reviews. 2009;61:704–709.
10. Kaikkonen MU, Lam MT, Glass CK. Non-coding RNAs as regulators of gene expression and epigenetics. Cardiovasc. Res. 2011;90(3):430–440.
11. Batista PJ, Chang HY. Long noncoding RNAs: cellular address codes in development and disease. Cell. 2013;152(6):1298–1307.
12. 26 June 2012 RNAi in the regulation of mammalian viral infections Kuan-Teh Jeang
13. Gunawardane LS, Saito K, Nishida KM, Miyoshi K, et al. A slicer-mediated mechanism for repeat-associated siRNA 5' end formation in *Drosophila*. Science. 2007;315(5818):1587–1590.
14. Yigit E, Batista PJ, Bei Y, Pang KM, et al. Analysis of the *C. elegans* Argonaute family reveals that distinct Argonautes act sequentially during RNAi. Cell. 2006;127:747–757.

15. Advances in Lipid Nanoparticles for mRNA-Based Cancer Immunotherapy, Lígia C. Gomes-da-Silva††, Nuno A. Fonseca††, Vera Moura††, Maria C. Pedroso de Lima†§, Sérgio Simões\*††, and João N. Moreira\*††, *Acc. Chem. Res.* 2012, 45, 7, 1163–1171
16. Aigner A. Nonviral in vivo delivery of therapeutic small interfering RNAs. *Curr. Opin. Mol. Ther.* 2007;9:345–352.
17. Santel A, Aleku M, Keil O, Endruschat J, et al. RNA interference in the mouse vascular endothelium by systemic administration of siRNA–lipoplexes for cancer therapy. *Gene Ther.* 2006;13:1360–1370.
18. Juliano R, Alam MR, Dixit V, Kang H. Mechanisms and strategies for effective delivery of antisense and siRNA oligonucleotides. *Nucleic Acids Res.* 2008;36:4158–4171.
19. Lipid-based nanoparticles for siRNA delivery in cancer therapy: paradigms and challenges Lígia C. Gomes-da-Silva††, Nuno A. Fonseca††, Vera Moura††, Maria C. Pedroso de Lima†§, Sérgio Simões\*††, and João N. Moreira\*†† *Acc. Chem. Res.* 2012, 45, 7, 1163–1171
20. Borawake, Dhanashri, Vishal, Pande, Giri, Mahendra Mesoporous Silica Nanoparticles as Theranostic Platform for Smart Drug Delivery: A Review 2017- *Nanomedicine and Nanoscience Research*
21. Akbarzadeh, A., Rezaei-Sadabady, R., et al. (2013). Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale Research Letters* 8(1). DOI: 10.1186/1556-276X-8-102.
22. Li, M., Du, C., Guo, N., Teng, Y., Meng, X., Sun, H., Li, S., Yu, P., & Galons, H. (2019). Composition design and medical application of liposomes. *European Journal of Medicinal Chemistry* 164; 640-653. DOI: 10.1016/j.ejmech.2019.01.007.
23. Ozpolat B., Sood A.K., Lopez-Berestein G. Liposomal siRNA nanocarriers for cancer therapy. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2014;66:110–116. doi: 10.1016/j.addr.2013.12.008.
24. Cullis and Hope, 2017; Guevara et al., 2019b.
25. Advances in Lipid Nanoparticles for mRNA-Based Cancer Immunotherapy Maria L. Guevara<sup>1</sup>, Francesca Persano<sup>2</sup> and Stefano Persano<sup>3\*</sup>

26. Basis of Pulmonary Toxicity Associated with Cationic Lipid-Mediated Gene Transfer to the Mammalian Lung
27. Advances in Lipid Nanoparticles for mRNA-Based Cancer Immunotherapy
28. The Onpattro story and the clinical translation of nanomedicines containing nucleic acid-based drugs Akin Akinc, Martin A. Maier, Muthiah Manoharan, Kevin Fitzgerald, Muthusamy Jayaraman, Scott Barros, Steven Ansell, Xinyao Du, Michael J. Hope, Thomas D. Madden, Barbara L. Mui, Sean C. Semple, Ying K. Tam, Marco Ciufolini, Dominik Witzigmann, Jayesh A. Kulkarni, Roy van der Meel and Pieter R. Cullis.
29. Kowalski, P. S. et al. Delivering the messenger: advances in technologies for therapeutic mRNA delivery. *Mol. Ther.* 27, 710–728 (2019).
30. T. Yang, C. Li, X. Wang, D. Zhao, M. Zhang, H. Cao, Z. Liang, H. Xiao, X.J. Liang, Y. Weng, Y. Huang Efficient hepatic delivery and protein expression enabled by optimized mRNA and ionizable lipid nanoparticle *Bioact Mater.*, 5 (2020), pp. 1053-1061
31. Published: 17 January 2010, Rational design of cationic lipids for siRNA delivery Sean C Semple, Akin Akinc, Jianxin Chen, Ammen P Sandhu, Barbara L Mui, Connie K Cho, Dinah W Y Sah, Derrick Stebbing, Erin J Crosley, Ed Yaworski, Ismail M Hafez, J Robert Dorkin, June Qin, Kieu Lam, Kallanthottathil G Rajeev, Kim F Wong, Lloyd B Jeffs, Lubomir Nechev, Merete L Eisenhardt, Muthusamy Jayaraman, Mikameh Kazem, Martin A Maier, Masuna Srinivasulu, Michael J Weinstein, Qingmin Chen, Rene Alvarez, Scott A Barros, Soma De, Sandra K Klimuk, Todd Borland, Verbena Kosovrasti, William L Cantley, Ying K Tam, Muthiah Manoharan, Marco A Ciufolini, Mark A Tracy, Antonin de Fougères, Ian MacLachlan, Pieter R Cullis, Thomas D Madden & Michael J Hope
32. <https://avantilipids.com/product/890850>
33. Pozzi D, Colapicchioni V, Caracciolo G, Piovesana S, A L Capriotti. (2014) Effect of polyethyleneglycol (PEG) chain length on the bio-nano- interactions between PEGylated lipid nanoparticles and biological fluids: From nanostructure to uptake in cancer cells. , <https://doi.org/10.1039/c3nr05559k>. *Nanoscale* 6(5), 2782-2792.

34. Vonarbourg A, Passirani C, Saulnier P, J P Benoit. (2006) Parameters influencing the stealthiness of colloidal drug delivery systems. , <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.03.039>. *Biomaterials* 27(24), 4356-4373.
35. D E Owens, N A Peppas. (2006) 3). Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2005.10.010>. *International Journal of Pharmaceutics* .
36. Meng, C., Chen, Z., Li, G., Welte, T. & Shen, H. Nanoplatfoms for mRNA therapeutics. *Adv. Ther.* 4, 2000099 (2021).
37. Kim, J., Eygeris, Y., Gupta, M. & Sahay, G. Self-assembled mRNA vaccines. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 170, 83–112 (2021).
38. Ryals, R. C. et al. The effects of PEGylation on LNP based mRNA delivery to the eye. *PLoS ONE* 15, e0241006 (2020).
39. Knop, K., Hoogenboom, R., Fischer, D. & Schubert, U. S. Poly(ethylene glycol) in drug delivery: pros and cons as well as potential alternatives. *Angew. Chem. Int. Ed.* 49, 6288–6308 (2010).
40. Akinc, A. et al. Development of lipidoid–siRNA formulations for systemic delivery to the liver. *Mol. Ther.* 17, 872–879 (2009).
41. Zhu, X. et al. Surface De-PEGylation controls nanoparticle-mediated siRNA delivery in vitro and in vivo. *Theranostics* 7, 1990–2002 (2017).
42. <https://avantilipids.com/product/880152>
43. <https://avantilipids.com/tech-support/faqs/transition-temperature>
44. Weng et al., 2020.
45. <https://avantilipids.com/product/850365>
46. [https://www.sigmaaldrich.com/PT/en/search/cholesterol?focus=products&gclid=CjwKCAjwnZaVBhA6EiwAVVyv9H0t23fBTWHezKOzYrSDo1xUSnhuLwZxXcaO6ovYzce5xQmJjSeb2BoCpW4QAvD\\_BwE&page=1&perpage=30&sort=relevance&term=cholesterol&type=product\\_name](https://www.sigmaaldrich.com/PT/en/search/cholesterol?focus=products&gclid=CjwKCAjwnZaVBhA6EiwAVVyv9H0t23fBTWHezKOzYrSDo1xUSnhuLwZxXcaO6ovYzce5xQmJjSeb2BoCpW4QAvD_BwE&page=1&perpage=30&sort=relevance&term=cholesterol&type=product_name)
47. D.D. Lasič, A molecular model for vesicle formation, *BBA - Biomembr.* 692 (1982) 501– 502.
48. D.D. Lasic, Mechanisms of liposome formation, *J. Liposome Res.* 5 (1995) 431–441.

49. Toward a siRNA-containing nanoparticle targeted to breast cancer cells and the tumor microenvironment
50. Transferrin Receptor-Targeted Liposomes Encapsulating anti-BCR-ABL siRNA or asODN for Chronic Myeloid Leukemia Treatment
51. Wei, J. et al. RNA-induced silencing complex-bound small interfering RNA is a determinant of RNA interference-mediated gene silencing in mice. *Mol. Pharmacol.* 79, 953–963 (2011).
52. Landesman, Y. et al. In vivo quantification of formulated and chemically modified small interfering RNA by heating-in-Triton quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (HIT qRT-PCR). *Silence* 1, 16 (2010).
53. Chabner BA, Roberts TG. Chemotherapy and the war on cancer. *Nat Rev Cancer.* 2005;5:65–72.
54. Waring MJ. The search for new anticancer drugs. Lancaster, UK: Kluwer Academic Publishers; 1992.
55. Light-Activated Content Release from Liposomes Sarah J. Leung and Marek Romanowski  Theranostics. 2012; 2(10): 1020–1036.  
Published online 2012 Oct 18.
56. PHOTODYNAMIC THERAPY IN THE CLINICAL PRACTICE Filonenko E.V., Serova L.G National Medical Research Radiological Centre of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia
57. Mechanisms of light-induced liposome permeabilization, Dyego Miranda | Jonathan F. Lovell.
58. Berg, K.; Selbo, P.K.; Prasmickaite, L.; Tjelle, T.E.; Sandvig, K.; Moan, J.; Gaudernack, G.; Fodstad, O.; Kjolsrud, S.; Anholt, H.; Rodal, G.H.; Rodal, S.K.; Hogset, A. Photochemical internalization: A novel technology for delivery of macromolecules into cytosol. *Cancer Res.* 1999, 59, 1180–1183.
59. Berg, K.; Weyergang, A.; Prasmickaite, L.; Bonsted, A.; Hogset, A.; Strand, M.T.; Wagner, E.; Selbo, P.K. Photochemical internalization (PCI): A technology for drug delivery. *Methods Mol. Biol.* 2010, 635, 133–145.
60. Berg, K.; Berstad, M.; Prasmickaite, L.; Weyergang, A.; Selbo, P.K.; Hedfors, I.; Hogset, A. Photochemical internalization: a new tool for gene and oligonucleotide delivery. *Top Curr. Chem.* 2010, 296, 251–281.

61. Biochem J. 2016 Feb 15;473(4):347-64. New photosensitizers for photodynamic therapy Heidi Abrahamse 1, Michael R Hamblin 2
62. Allison, R.R. and Sibata, C.H. (2010) Oncologic photodynamic therapy photosensitizers: a clinical review. Photodiagnosis Photodyn. Ther. 7, 61–75 CrossRef PubMed
63. Yan X, G L Scherphof, Kamps J A A M. (2005) Liposome opsonization. <https://doi.org/10.1081/LPR-64971>. , Journal of Liposome Research
64. AU2016259188A1- patente LUZ5
65. <https://en.wikipedia.org/wiki/Calcein#/media/File:Calcein.svg>
66. Battersby, A.R. (2000) Tetrapyrroles: the pigments of life. Nat. Prod. Rep. 17, 507–526
- 67 Spontaneous Entrapment of Polynucleotides upon Electrostatic Interaction with Ethanol-Destabilized Cationic Liposomes
68. Transferrin Receptor-Targeted Liposomes Encapsulating anti-BCR-ABL siRNA or asODN for Chronic Myeloid Leukemia Treatment
3. PEREIRA NASCIMENTO COSTA, Gonçalo;. FERREIRA GONÇALVES, Nuno Paulo;. PEREIRA MONTEIRO, Carlos Jorge; Luzitin, REIS DE ABREU, Artur Carlos; FERRAZ CARDOSO SOARES, Hélder .BORGES ROCHA, Luis Gabriel;). SCHABERLE, Fabio Antonio. MIGUÉNS PEREIRA, Maria; DA SILVA ARNAUT MOREIRA, Luis Guilherme; 10 November 2016 (10.11.2016)
70. Active loading of verteporfin into cationic liposome for neovasculature- and tumor-targeted photodynamic therapy /Fang-jie WAN; Bin-long CHEN; Lin-jie YANG; Qing-qing YIN; Yue YAN; Ye YANG; Qiang ZHANG; Yi-guang WANG. Acta Pharmaceutica Sinica ; (12): 1680-1690, 2020.
- 71 .Verteporfin encapsulated in cationic liposomes as an alternative drug for PDT M RANJBAR,G MARTIN,HT AGOSTINI
72. Maherani, B., Arab-Tehrany, E., Kheiriloom, A., Geny, D., & Linder, M. (2013). Calcein release behavior from liposomal bilayer; influence of physicochemical/mechanical/structural properties of lipids. *Biochimie*, 95(11), 2018–2033. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2013.07.006>