



Universidade de Brasília

Instituto de Ciências Biológicas

Programa de Pós-Graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia

DESENVOLVIMENTO DE NANOPARTÍCULAS DE POLÍMERO SENSÍVEIS À OXIDAÇÃO PARA
USO EM TERAPIA FOTODINÂMICA COMBINADA A QUIMIOTERAPIA LOCAL

BRASÍLIA

2018



NÍCHOLLAS SERAFIM CAMARGO

DESENVOLVIMENTO DE NANOPARTÍCULAS DE POLÍMERO SENSÍVEIS À OXIDAÇÃO PARA
USO EM TERAPIA FOTODINÂMICA COMBINADA A QUIMIOTERAPIA LOCAL

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, como parte integrante dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Nanociência e Nanobiotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Luis Alexandre Muehlmann

BRASÍLIA

2018



NÍCHOLLAS SERAFIM CAMARGO

Desenvolvimento de Nanopartículas de polímero sensível à oxidação para uso em terapia fotodinâmica combinada a quimioterapia local.

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, como parte integrante dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Nanociência e Nanobiotecnologia.

Aprovado em __/__/__

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Luís Alexandre Muehlmann

Prof. Dr. Marcelo Henrique Sousa

Prof. Dr. Marcelo Oliveira Rodrigues

Prof. Dr. João Paulo Figueiró Longo



Agradecimentos

A Deus pelo dom da vida e por ter me presenteado com uma família incrível. À minha mãe Cláudia Lúcia Serafim e ao meu Pai José Carlos Camargo, por moldarem meu ser. A base da minha moral e ética. Obrigado por abrirem as portas que me guiaram pelo caminho do conhecimento e continuarão me guiando no caminho do sucesso. Pela sabedoria e pelos conselhos que me ajudam a superar inúmeras dificuldades, pelo amor e carinho. À Carla Luana Neres de Barros, pelo apoio, pelo companheirismo e por tornar minha vida mais feliz.

Ao meu orientador e amigo, Luís Alexandre Muehlmann, obrigado por gerar um espírito de criação e desenvolvimento que move nossa equipe na pesquisa. Pelos desafios que coloca no meu caminho a fim de extrair o melhor de mim e me impulsionar a ir mais longe.

Ao Professor e amigo Paulo Eduardo Narcizo de Souza, obrigado por compartilhar o entusiasmo que me move, sempre estimulando novas ideias. Pelos debates e pela ajuda em etapas fundamentais deste trabalho.

Àqueles que participaram diretamente no desenvolvimento deste trabalho, Alícia Simalie Ombredane e Marina Arantes Radicchi.

Ao Laboratório de Nanobiotecnologia e do Departamento de Genética e Morfologia, especialmente ao Professor Ricardo Bentes de Azevedo, por disponibilizar os materiais, acessórios e equipamentos do laboratório. A todos meus amigos do laboratório.

Ao Laboratório de Microscopia Eletrônica, especialmente à Professora Sônia Nair Bão e seus orientados, pelo suporte nos procedimentos envolvendo microscopias.

Ao Instituto de Física, especialmente ao Professor Sebastião William da Silva, pelo suporte nos procedimentos envolvendo análises.

Ao Instituto de Química, especialmente ao Professor Guilherme Dotto Brand, pelo suporte nos procedimentos envolvendo Espectrometria de Massas.

Ao CNPq, à FAP/DF, à CAPES e ao INCT de Nanobiotecnologia, pelo fomento dos estudos em nanotecnologia.



“Se eu vi mais longe, foi por estar de pé

Sobre ombros de gigantes”.

Isaac Newton.

Resumo

A terapia fotodinâmica (TFD) tem se mostrado eficiente no tratamento de câncer pela sua alta especificidade e segurança sob irradiação, além de promover respostas imunogênicas, acabando com metástase como demonstrado em diversos experimentos *in vivo*. Dentre os quimioterápicos, a doxorrubicina (DOX), se destaca, apresentando alta ação anticâncer, contudo é cardiotoxic, devido a um evento facilitado pela acumulação do fármaco no tecido cardíaco, o que causa a morte das células do miocárdio. O trabalho teve como objetivo: 1) desenvolver nanopartículas poliméricas sensíveis à oxidação para liberação de fármacos. 2) Avaliar a cinética de liberação do fármaco doxorrubicina (DOX), com e sem irradiação. 3) Avaliar a atividade anticâncer do sistema *in vitro*. Foram desenvolvidas nanopartículas constituídas de um núcleo sólido, poli(vinil, metil-co-anidrido maleico (PVMMA) associado a um agente cross linking, 2-aminofenil dissulfeto (2SS), que estabiliza as fitas poliméricas viabilizando o carregamento de DOX em seu núcleo e cloreto de alumínio ftalocianina (ALPHCN) adsorvida em sua superfície. Tal engenharia dá-se pela possibilidade da clivagem oxidativa da superfície da nanopartícula através da produção progressiva de EROs durante a irradiação do sistema, resultando na produção da forma reduzida do agente cross linking 2SS através do mecanismo de eliminação radicalar. Para avaliar a atividade anticâncer *in vitro*, foram realizados testes em células de adenocarcinoma mamário murino (4T1), fibroblasto murino (NIH-3T3) e células de adenocarcinoma mamário humano (MCF-7). Os resultados demonstraram que tanto a DOX quanto a LSN (nanopartículas poliméricas associadas ao 2SS contendo DOX e ALPHCN), possuem ação citotóxica contra células 4T1 e MCF-7 além do efeito aditivo de citotoxicidade da DOX e da ALPHCN após a irradiação do sistema. Estudos de citometria avaliaram o potencial de interiorização das nanopartículas LNS; LSNIRR e DOX livre (FDOX) demonstrando que as nanopartículas LSN são interiorizadas de forma mais rápida que a DOX e de forma semelhante à LSNIRR; O ensaio de potencial de membrana demonstrou que houve a despolarização da mitocôndria após o tratamento com LSNIRR; LSN; NFTCIRR e FDOX. Foi então desenvolvido nesse trabalho um sistema susceptível a clivagem oxidativa através de um mecanismo radicalar de fotooxidação que pode ser utilizado para aumentar a taxa de liberação de fármacos, causando efeitos de citotoxicidade tanto por efeito do fármaco quanto por efeito das EROs geradas no processo de irradiação.

Abstract

Photodynamic therapy (PDT) has been widely used for cancer treatment for its high selectivity under irradiation, besides its immunogenic activity, decreasing metastatic effect of cancer cells, as shown in several *in vivo* studies. Doxorubicin (DOX) although it shows high cytotoxic effects, it is also cardiotoxic, which easily occurs by its high selectivity for the cardio tissue. For this work, the main objectives were: 1) The development of polymeric nanoparticles sensitive to oxidation for drug release. 2) Evaluate the drug doxorubicin release kinetic with and without irradiation. 3) Evaluate its activity on cancer cells, *in vitro*. The nanoparticle was developed by reacting the polymer poly(vinyl methyl-co-maleic anhydride) (PVMMA) with 2-aminophenyl disulphide (2SS), with DOX occupying the core of the nanoparticle and aluminium phthalocyanine chloride (ALPHCN) adsorbed on nanoparticle's surface. Such engineering allows the surface of the nanoparticle to suffer oxidative cleavage, for progressive ROS production after irradiation, allowing water to access its core and by doing that, increasing the rate of drug release. The cytotoxicity tests were performed on mice mammary adenocarcinoma (4T1), fibroblast (NIH-3T3) and human mammary adenocarcinoma (MCF-7) cancer cells. Both DOX and LSN (polymeric nanoparticle attached to 2SS with DOX and ALPHCN) had shown high cytotoxic effects against 4T1 and MCF-7 cancer cells. Experiments had shown additive effect of DOX and ALPHCN over irradiation. By cytometry experiments, were evaluated endocytosis effect of LSN, LSNIRR and Free DOX, and was concluded that LSN nanoparticles were instantly internalized by cells, similar to LSNIRR, while Free DOX (FDOX) took longer to permeate the cell membrane. In all treatments (LSN, LSNIRR, NFTCIRR and FDOX) experiments had shown depolarization of mitochondria's membrane. This work shows the development of a system susceptible to surface degradation in the presence of intense oxidative stress, caused by irradiation, which increase the drug release performance, causing cell death by two different mechanisms, one by located oxidative stress and the second one by drug effect.

Lista de figuras

Figura 1. Representação adaptada da história da terapia fotodinâmica, figura retirada do artigo da Nature, referência 113.

Figura 2. Ilustração do mecanismo de morte celular apoptótica mediado por EROs, imagem adaptada da referência 114.

Figura 3. Dependência entre o comprimento de onda de incidência gerado por uma fonte LED com a profundidade de penetração em tecidos.

Figura 4. Representação estrutural de um macro ciclo porfirínico em sua forma neutra.

Figura 5. Representação da mistura oligomérica com atividade fototóxica descoberta por Schwartz.

Figura 6. Forma estrutural básica da classe de agentes fotossensibilizantes chamados de ftalocianinas.

Figura 7. Representação dos orbitais moleculares (TOM) para o oxigênio molecular em seu estado tripleto.

Figura 8. Ilustração de excitação de um fóton para transferência de energia gerando estados excitados de oxigênio, onde FS representa os estados do agente fotossensibilizante, ISC representa a transferência cruzada de energia entre estados excitados do agente fotossensibilizante e PS representa um decaimento de energia não radioativo do agente fotossensibilizante.

Figura 9. Representação esquemática do processo de quenching redutivo e oxidativo gerando espécies radiculares catiônicas e aniônicas, onde A representa um acceptor; S representa um substrato; D representa um agente doador e FS representa um agente fotossensibilizante.

Figura 10. Representação mecanística envolvendo a foto-oxidação do enxofre.

Figura 11. Representação ilustrativa de hipótese estrutural da nanopartícula polimérica.

Figura 12. Representação gráfica da estabilidade hidrodinâmica das nanopartículas LSN no período de 365 dias em diferentes condições. (a)-(b). Análise de diâmetro

hidrodinâmico e índice de polidispersão, a temperatura ambiente (20 °C - 30 °C); (c)-(d). Análise de diâmetro hidrodinâmico e índice de polidispersão, a temperatura ambiente (20 °C - 30 °C); (c)-(d). Análise de diâmetro hidrodinâmico e índice de polidispersão, realizados a 4°C (geladeira); (e)-(f). Análise de diâmetro hidrodinâmico e índice de polidispersão, realizados a 40 °C (estufa).

Figura 13. Representação esquemática da hidrólise dos grupamentos anidrido presentes no polímero PVM/MA.

Figura 14. Avaliação da morfologia superficial das nanopartículas LSN por microscopia eletrônica de varredura (MEV), (a) e (b). Imagens com diferentes aproximações. (c) Frequência de distribuição em função dos tamanhos das nanopartículas LSN.

Figura 15. Avaliação da morfologia superficial das nanopartículas LSN por microscopia eletrônica de transmissão (MET), (a) e (b). Imagens com diferentes magnificações; (c). Frequência de distribuição em função dos tamanhos das nanopartículas LSN.

Figura 16. Espectro de transmitância no infravermelho (FTIR) dos componentes presentes na nanopartícula polimérica LSN. (a). Espectro dos controles e do produto de reação entre o polímero PVM/MA e a DOX (POLDOX); (b). Espectro dos controles e do produto de reação entre o polímero PVM/MA e 2-aminofenil dissulfeto (POL2SS); (c) Espectro da nanopartícula (LSN) e controles.

Figura 17. Representação da estrutura esperada para o cross linking entre o polímero PVM/MA e o 2-Aminofenil dissulfeto.

Figura 18. Representação da estrutura esperada para a mistura do polímero PVM/MA com o 2-Aminofenil dissulfeto e o fármaco Doxorubicina.

Figura 19. Representação energética de grupamentos carbonila.

Figura 20. Espectrofotometria de UV-VIS para avaliação de taxa de liberação por diálise do corante IR-780 das nanopartículas; (a). Curva de calibração utilizando o padrão IR-780; (b). Perfil de liberação do controle, FIR780, puro; da nanopartícula não irradiada, NPD e da nanopartícula irradiada, NPDIRR, 5,0 cm de distância, comprimento de onda de 660 nm de excitação, Potência de 198,23 mW/cm² e Fluência de 594,68 J/cm².

Figura 21. Avaliação da taxa de liberação da DOX por HPLC nas condições de (a). Curva padrão de calibração; (b). DOX livre comparado com a nanopartículas LSN na ausência de irradiação; (c). Comparação entre POLDOX, LSN sob irradiação (potência de 198,23 mW/cm² e fluência de 594,68 J/cm²) e LSN não irradiada; (d). Relação entre fluência e taxa de liberação de DOX; (e). Taxa de degradação da DOX livre na presença de EROs.

Figura 22. Hipótese de ruptura da superfície das nanopartículas após a irradiação em λ igual a 660 nm.

Figura 23. Estados de excitação do oxigênio molecular após a irradiação na presença de um agente fotossensibilizante.

Figura 24. Espectro de massas por time of flight (TOF-MS) de (a) Padrão 2-aminofenil dissulfeto; (b) 2-aminofenil dissulfeto irradiado (potência de 198,23 mW/cm² e fluência de 594,68 J/cm²); (c) Espectro de fragmentação TOF-MSMS do pico m/z 126.0375 Da.

Figura 25. Proposta mecanística para degradação fotoativada do 2-aminofenil dissulfeto suportada pelo experimento de EPR e TOF-MSMS.

Figura 26. Espectro de fragmentação TOF-MSMS do pico m/z 138.0382 Da.

Figura 27. Proposta mecanística alternativa para formação de um segundo produto de degradação fotoativada do 2-aminofenil dissulfeto suportada pelo experimento de EPR e TOF-MSMS.

Figura 28. Viabilidade de células 4T1. (a) Viabilidade das células após tratamento com controles contendo apenas polímero PVM/MA conjugado a 2SS (Branca); DOX livre (FDOX); Nanopartículas de PVM/MA contendo apenas DOX (NDOX) e nanopartículas poliméricas contendo cloreto de alumínio ftalocianina e DOX (LSN); (b). Avaliação de viabilidade dos tratamentos não irradiados, nanopartículas poliméricas contendo DOX e cloreto de alumínio ftalocianina (LSN) e nanopartículas contendo apenas cloreto de alumínio ftalocianina (NFTC) e avaliação de viabilidade de nanopartículas sob irradiação (15 minutos LED 660 nm; Potência de 202,91 mW/cm²; distância de 5 cm; Fluência de 185,57 J/cm²), das nanopartículas poliméricas contendo apenas cloreto de alumínio ftalocianina (NFTCIRR) e das nanopartículas poliméricas contendo DOX e AIPHCN (LSNIRR).

Figura 29. Viabilidade de células MCF-7. (a). Viabilidade das células tratadas com os controles contendo apenas DOX livre (FDOX), PVM/MA conjugado a 2SS (Branca), nanopartículas de PVM/MA contendo apenas DOX (NDOX), ou nanopartículas de PVM/MA contendo cloreto de alumínio ftalocianina e DOX (LSN); (b). Viabilidade das células tratadas com nanopartículas poliméricas contendo DOX e cloreto de alumínio ftalocianina (LSN) e nanopartículas contendo apenas cloreto de alumínio ftalocianina (NFTC) e avaliação de viabilidade de nanopartículas sob irradiação (15 minutos LED 660 nm; Potência de 202,91 mW/cm²; distância de 5 cm; Fluência de 185,57 J/cm²), das nanopartículas poliméricas contendo apenas cloreto de alumínio ftalocianina (NFTCIRR) e das nanopartículas poliméricas contendo DOX e cloreto de alumínio ftalocianina (LSNIRR).

Figura 30. Avaliação de viabilidade celular por MTT da linhagem de células NIH-3T3; (a). Avaliação da viabilidade dos controles contendo apenas polímero PVM/MA conjugado a 2SS (Branca); nanopartículas poliméricas contendo cloreto de alumínio ftalocianina e DOX (LSN); Nanopartículas de PVM/MA contendo apenas DOX (NDOX) e DOX livre (FDOX); (b). Avaliação de viabilidade dos tratamentos não irradiados, nanopartículas poliméricas contendo DOX e cloreto de alumínio ftalocianina (LSN) e nanopartículas contendo apenas cloreto de alumínio ftalocianina (NFTC) e avaliação de viabilidade de nanopartículas sob irradiação (15 minutos LED 660 nm; Potência de 202,91 mW/cm²; distância de 5 cm; Fluência de 185,57 J/cm²), das nanopartículas poliméricas contendo apenas cloreto de alumínio ftalocianina (NFTCIRR) e das nanopartículas poliméricas contendo DOX e cloreto de alumínio ftalocianina (LSNIRR).

Figura 31. Avaliação de interiorização por citometria de fluxo em células de linhagem 4T1 nos períodos de a) 15 min; b) 30 min; c) 1 h; d) 2 h e e) 3 h; A. Interiorização de DOX livre (FDOX). B. Cinética de interiorização das nanopartículas poliméricas contendo cloreto de alumínio ftalocianina e DOX (LSN) avaliando a fluorescência da DOX. C. Avaliação da interiorização no sistema irradiado (15 minutos LED 660 nm; Potência de 202,91 mW/cm²; distância de 5 cm; Fluência de 185,57 J/cm²) nanopartículas poliméricas contendo DOX e cloreto de alumínio ftalocianina (LSNIRR) avaliando a fluorescência da DOX; D. Relação de fluorescência entre DOX e cloreto de alumínio ftalocianina na cinética de interiorização e E. Média geométrica dos histogramas de internalização para a DOX livre (FDOX) e nanopartículas antes e após irradiação, LSN e LSNIRR respectivamente.

Figura 32. Padrão de alterações morfológicas em células de linhagem 4T1, 24 h após os tratamentos: b) DOX livre (FDOX); c) Nanopartículas poliméricas contendo cloreto de alumínio ftalocianina e DOX (LSN); d) Nanopartículas sob irradiação (15 minutos LED 660 nm; Potência de 202,91 mW/cm²; distância de 5 cm; Fluência de 185,57 J/cm²), das nanopartículas poliméricas contendo apenas cloreto de alumínio ftalocianina (NFTCIRR); e) Nanopartículas sob irradiação contendo cloreto de alumínio ftalocianina e DOX (LSNIRR) e a) Controle. Células que apresentaram diminuição de tamanho e aumento de granulosidade Q1; Células que apresentaram aumento tamanho e granulosidade Q2; Células que apresentaram aumento de tamanho e diminuição de granulosidade Q3 e Células que apresentaram diminuição de tamanho e granulosidade Q4.

Figura 33. Histogramas do potencial de membrana mitocondrial de células de linhagem 4T1 24 h após os tratamentos: a) DOX livre (FDOX); b) Nanopartículas poliméricas contendo cloreto de alumínio ftalocianina e DOX (LSN); c) Nanopartículas sob irradiação (15 minutos LED 660 nm; Potência de 202,91 mW/cm²; distância de 5 cm; Fluência de 185,57 J/cm²), das nanopartículas poliméricas contendo apenas cloreto de alumínio ftalocianina (NFTCIRR); d) Nanopartículas sob irradiação contendo cloreto de alumínio ftalocianina e DOX (LSNIRR) e Controle que representa o potencial normal de membrana mitocondrial. Na figura A está expressa o efeito de despolarização da membrana mitocondrial após os tratamentos e controles e na figura B está representado o efeito do tratamento principal, LSN (d) despolarizando de forma considerável a membrana mitocondrial.

Figura 34. Avaliação quantitativa por média geométrica dos histogramas obtidos para o potencial mitocondrial 24 h após os tratamentos: DOX livre (FDOX); Nanopartículas poliméricas contendo cloreto de alumínio ftalocianina e DOX (LSN); Nanopartículas sob irradiação (15 minutos LED 660 nm; Potência de 202,91 mW/cm²; distância de 5 cm; Fluência de 185,57 J/cm²), das nanopartículas poliméricas contendo apenas cloreto de alumínio ftalocianina (NFTCIRR) e Nanopartículas sob irradiação contendo cloreto de alumínio ftalocianina e DOX (LSNIRR) em função do potencial mitocondrial normal representado pelo controle.

Lista de tabelas

Tabela 1. Materiais utilizados nos experimentos

Tabela 2. IC50 dos tratamentos realizados em células de linhagem cancerosa 4T1 e MCF-7 e célula normal de linhagem NIH-3T3 para o fármaco Doxorrubicina livre (FDOX) e nanopartículas LSN; NFTCIRR e LSNIRR contendo DOX e ALPHCN em sistemas irradiados e não irradiados.

Lista de abreviaturas e siglas

INCA – Instituto Nacional de Câncer;

TFD – Terapia fotodinâmica;

EROs – Espécies reativas de oxigênio;

FS – Agente fotossensibilizante;

UV – Luz ultravioleta;

HpD – Hematoporfirina;

$^1\text{O}_2$ – Oxigênio singlete;

DOX – Doxorrubicina;

ALPHCN – Cloro alumínio ftalocianina;

O_2 – Oxigênio molecular;

$(X^3 \Sigma_g^-)$ – Oxigênio triplete;

$(a^1\Delta_g)$ - Primeiro estado singlete de excitação;

$(b^1 \Sigma_g^+)$ - Segundo estado singlete de excitação;

DNA – Ácido desoxirribonucleico;

ATR – Refletância total atenuada;

PVM/MA – Poli(vinil, metil – co – anidrido maleico);

TFA – Ácido Trifluoro acético;

DMSO – Dimetilsufóxido;

DMF – Dimetilformamida;

HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência;

DLS – Espalhamento de luz dinâmico;

2SS – 2 – Aminofenil dissulfeto;

ISC – Travessia entre sistemas;

LSN – Nanopartículas contendo DOX, ALPHCN e PVM/MA associado a 2SS;

FDOX – Doxorrubicina livre;

NFTC – Nanopartículas poliméricas de PVM/MA associada a 2SS contendo ALPHCN;

NDOX – Nanopartículas poliméricas de PVM/MA contendo DOX associadas a 2SS;

LSNIRR – Nanopartículas poliméricas LSN irradiadas;

NFTCIRR – Nanopartículas poliméricas NFTC irradiadas;

POLDOX – Polímero PVM/MA associado a doxorrubicina;

λ – Comprimento de onda;

Efeito EPR – Efeito de permeação e retenção vascular aumentado;

EPR – Ressonância Paramagnética Eletrônica;

CMH – 1-Hidroxi-3-Metoxycarbonil-2,2,5,5-tetrametilpirrolidina;

FTIR – Infravermelho com transformada de Fourier;

MEV – Microscopia eletrônica de varredura;

EDS – Espectroscopia de raio-x de energia dispersiva;

DMEM – Meio Eagle modificado por Dulbecco;

IC50 – Concentração inibitória 50%;

MTT – 3-(4,5Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio brometo;

NIH-3T3 – Fibroblasto murino;

PDI – Índice de polidispersão;

RPMI – Meio do instituto Memorial Park Roswell;

SFB – Soro fetal bovino;

NMQ⁺ – N-metilquinolino tetrafluoroborato;

TOM – Teoria do Orbital Molecular;

TA – Temperatura Ambiente;

DH – Diâmetro Hidrodinâmico;

H₂O₂ – Peróxido de Hidrogênio

Sumário

1.INTRODUÇÃO	19
2.REVISÃO DA LITERATURA.	19
2.1.APLICAÇÕES DA TERAPIA FOTODINÂMICA (TFD) NO TRATAMENTO DE CÂNCER	20
2.2.1.MECANISMO DE AÇÃO DAS EROS EM TECIDO TUMORAL	23
2.2.AGENTES FOTOSENSIBILIZANTES	25
2.2.1.FOTOSENSIBILIZANTES DE 1 ^A GERAÇÃO	26
2.2.2.FOTOSENSIBILIZANTES DE 2 ^A GERAÇÃO	27
2.2.2.1.FTALOCIANINAS.....	27
2.2.3.MECANISMO DE TRANSFERÊNCIA DE ENERGIA PARA FORMAÇÃO DE EROS	28
2.2.4.MECANISMO DE FOTO-OXIDAÇÃO RADICALAR	30
3.JUSTIFICATIVA	32
4.OBJETIVOS.....	33
4.1.OBJETIVO GERAL	33
4.2.OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
5.MÉTODOS	34
5.1.MATERIAIS.....	34
5.2.SÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS	36
5.3.CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS CONTENDO DOX E ALPHCN	37
5.3.1.AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES COLOIDAIIS	37
5.3.2.ESTABILIDADE FÍSICA DAS NANOPARTÍCULAS	37
5.3.3.AVALIAÇÃO DE MORFOLOGIA E ESTRUTURA SUPERFICIAL	38
5.3.4.QUANTIFICAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DO CORANTE IR-780 POR ESPECTROFOTOMETRIA DE UV-VIS	38
5.3.5.QUANTIFICAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE DOX POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA PERFORMANCE (HPLC)	39
5.3.6.PERFIL DE LIBERAÇÃO DE DOX	39
5.3.7.ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO (FTIR)	40
5.3.8.AVALIAÇÃO DA FOTODEGRADAÇÃO DO 2-AMINOFENIL DISSULFETO (2SS) POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS (UHPLC-MS/MS)	40
5.4.ENSÁIOS <i>IN VITRO</i>	41
5.4.1.CULTIVO CELULAR.....	41
5.4.2.ANÁLISE DE VIABILIDADE PELO MÉTODO MTT	41
5.4.3.AVALIAÇÃO DE INTERIORIZAÇÃO.....	42
5.4.4.ANÁLISE DE MORFOLOGIA CELULAR	42
5.4.5.ANÁLISE DE POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL	42

5.4.6. TESTES ESTATÍSTICOS.....	43
6. RESULTADOS	43
6.1. CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS.....	43
6.1.1. AVALIAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS COLOIDAIS E ESTABILIDADE DAS NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS	43
6.1.2. ANÁLISE DE MORFOLOGIA POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA	46
6.1.3. ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO (FTIR).....	48
6.1.4. PROVA DE CONCEITO; AVALIAÇÃO DA TAXA DE LIBERAÇÃO DO CORANTE IR-780.....	51
6.1.4. PERFIL DE LIBERAÇÃO DA DOXORRUBICINA	52
6.1.5. ANÁLISE DE SUBPRODUTOS DE DEGRADAÇÃO POR ULTRA CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA ACOPLADA AO ESPECTRÔMETRO DE MASSAS - UHPLC-MS/MS	54
6.2. AVALIAÇÃO <i>IN VITRO</i>	59
6.2.1. AVALIAÇÃO DE VIABILIDADE CELULAR.....	59
6.2.2. CINÉTICA DE INTERIORIZAÇÃO DE DOX POR CITOMETRIA DE FLUXO EM CÉLULAS DE LINHAGEM CANCEROSA 4T1	62
6.2.3. AVALIAÇÃO DE ALTERAÇÃO NA MORFOLOGIA CELULAR POR CITOMETRIA DE FLUXO APÓS O TRATAMENTO EM CÉLULAS DE LINHAGEM CANCEROSA 4T1.....	64
6.2.4. AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL POR CITOMETRIA DE FLUXO EM CÉLULAS CANCEROSAS DE LINHAGEM 4T1	65
7. CONCLUSÕES	68
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69

1. Introdução

A terapia fotodinâmica (TFD), foi descrita pela primeira vez por Finsen ¹ para o tratamento de varíola e tuberculose cutânea. Anos após o sucesso da terapia, em 1942, Auler e Banzer ², buscando alternativas para o tratamento do câncer, verificaram que a utilização de porfirinas sob a ação de luz ultravioleta (UV) causava necrose em tecidos tumorais. Com os avanços tecnológicos, fotossensibilizantes mais eficientes e com melhor biodistribuição surgiram, tais como as ftalocianinas ³, tornando a TFD mais eficaz.

A TFD é uma modalidade terapêutica baseada na utilização da luz, e um fotossensibilizante, cuja combinação provoca um estresse oxidativo localizado, levando assim à necrose ou apoptose das células as atingidas ⁴. A causa desse estresse oxidativo é a formação de uma espécie excitada de oxigênio molecular, o oxigênio singlete (1O_2), que é gerada pela absorção de energia quantizada, ou através do relaxamento do agente fotossensibilizante que foi previamente excitado por uma radiação incidente. ⁵

Inúmeros estudos demonstram os efeitos oxidativos de EROs tanto em sistemas biológicos, causando morte celular ⁶, quando em reações orgânicas. Neste trabalho desenvolveu-se um sistema inovador que utiliza nanopartículas ativadas através de mecanismos de fotooxidação radicalar para aumentar a taxa de liberação de fármacos de forma localizada, com isso diminuindo seus efeitos adversos em tecidos saudáveis, já que há um controle externo para liberação de fármacos.

Os mecanismos de fotooxidação dão-se por duas formas, como a peroxidação de hidrocarbonetos insaturados ⁷, ou através de ressonâncias radicalares, causando clivagens e eliminações em compostos orgânicos ⁸. O foco principal foi o mecanismo de ação radicalar, que pode causar eliminações e reduções através de ressonância aromática, causando fragmentações da superfície das nanopartículas facilitando a difusão simples de fármacos para o meio externo.

Diversas formas de entrega de fármacos têm sido exploradas, podendo essas ser pela ação de luz ⁹, pela aplicação de um campo magnético ¹⁰, ou utilizando as condições fisiológicas como pH para liberação do fármaco no sítio alvo ¹¹. Este projeto propõe o desenvolvimento de um polímero, que seja degradado pelas espécies reativas geradas pela TFD. Com isso, foram obtidas nanopartículas poliméricas carregadas com fotossensibilizante (cloro alumínio ftalocianina) e um fármaco quimioterápico (doxorubicina) que atuem sobre o câncer não apenas pelo mecanismo de TFD, mas que também liberem o fármaco quimioterápico quando submetidas à TFD. Assim, tal sistema seria usado para terapia combinatória do câncer, fundamentada no uso concomitante de TFD e quimioterapia local ativada por luz.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. APLICAÇÕES DA TERAPIA FOTODINÂMICA (TFD) NO TRATAMENTO DE CÂNCER

A TFD é um tratamento que consiste na fotoativação de um agente fotossensibilizante (FS) com consequente geração de espécies reativas.¹² Assim, o efeito terapêutico da TFD se dá por meio da formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), de maneira a formar um estresse oxidativo local, tendo como consequência eventual a morte celular.¹³ Tais espécies reativas podem ser radicais aniônicos ou oxigênio singlete, os quais podem causar danos irreparáveis às células tumorais e a pequenos vasos que irrigam o tumor.¹⁴ Existem dois mecanismos fotoquímicos de formação de espécies reativas de oxigênio, as chamadas reações tipo I, que envolvem a formação de espécies radicalares, e as reações do tipo II, que são decorrentes da transferência de energia de estados triplete de excitação do agente FS para o oxigênio. Ainda, a TFD possui três mecanismos biológicos de ação antitumoral:

- 1) A morte direta de células cancerosas através da formação de EROs.^{15, 16}
- 2) O ataque da vascularização do tumor, causando morte por falta de nutrientes e hipóxia na região tumoral.^{17, 18}
- 3) A ativação ou reforço da resposta imunitária adaptativa contra células cancerosas.^{19, 20, 21}

O uso clínico de TFD foi proposto entre o fim do século XIX e o início do século XX, tendo início com o experimento de fototoxicidade vislumbrado por Oscar Raab, que posteriormente rendeu o prêmio Nobel de Medicina a Niels Finsen ¹ por seu trabalho no tratamento de uma condição especial de tuberculose na pele. Desde então, sua aplicação na medicina evoluiu e a utilização da luz passou a fazer parte do tratamento de diversas condições. Dessa maneira, em 1942, Auler e Banzer começaram as observações do efeito da luz UV sobre o câncer e em 1976 foi reportado o primeiro veículo carregado com fotossensibilizantes para aplicação em TFD.²² Desde então diversas classes de agentes fotossensibilizantes foram desenvolvidas visando aplicação antineoplásica,²² como representados na figura 1.

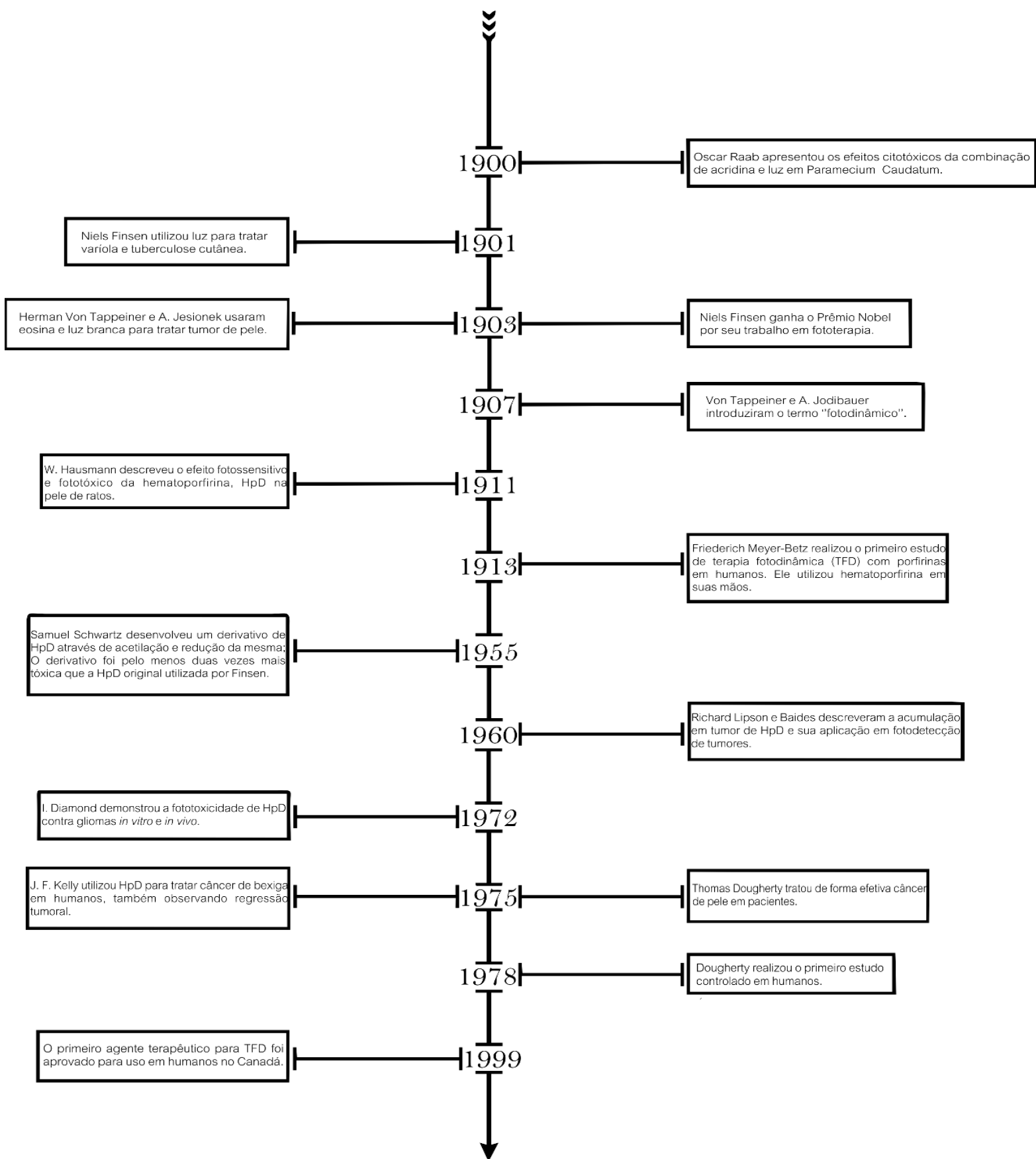


Figura 1. Representação adaptada da história da terapia fotodinâmica, figura retirada do artigo da Nature, referência 113.

Duas limitações hipotéticas surgiram para questionamento sobre a TFD, sendo essas: 1) Sobre a ineficácia da terapia pela escassez de oxigênio na região tumoral devido ao seu consumo pela TFD, já que o efeito de inativação da microvascularização entorno da região tumoral poderia interromper o tratamento por hipóxia local. Contudo, estudos através de projeções matemáticas mostraram que nem toda a vascularização é comprometida e que as restantes após o tratamento com TFD são suficientes para garantir a eficácia do tratamento.²³

E 2) A existência de problemas associados ao tempo de vida das espécies fotoexcitadas em meio aquoso, já que um tempo de vida curto demais poderia tornar o tratamento excessivamente localizado, enquanto tempos de vida muito longos levariam a uma grande difusão de tais espécies reativas, aumentando chance de ocorrência de efeitos colaterais negativos. O tempo ideal foi encontrado com uma classe de compostos do tipo benzoporfirinas, que são capazes de propagar o estresse oxidativo pelo decaimento radicalar de oxigênio para peróxido de hidrogênio, assim degradando proteínas e aumentando o raio de ação das EROs a uma difusão não letal, consequentemente fazendo com que a aplicação seja mais efetiva.²⁴

Além das diversas classes de agentes FS desenvolvidos, novas plataformas para carregamentos de tais agentes também têm avançado^{25, 26, 27}. Nesse contexto, a escolha de sistemas nanoestruturados tem sido uma saída viável e vantajosa, por sua alta área superficial e biocompatibilidade, excluindo problemas de extinção de agentes FS por agregação e por proporcionar um aumento notável no acúmulo de fármaco na região tumoral^{28, 29}, além de ser uma forma simples e eficaz de dispersar fármacos hidrofóbicos em meio aquoso.³⁰ Ainda, estudos do microambiente tumoral, demonstram a presença do efeito de permeação e retenção aumentados (efeito EPR), que é aproveitado para aumentar o acúmulo de nanopartículas de tamanhos específicos (aproximadamente 100 nm) no tumor³¹. Dentre as estruturas nanométricas, aquelas formadas por matriz polimérica constituem um sistema muito suscetível a transformações químicas, podendo assim ser multifuncionalizadas e dotadas de propriedades, como adesão de anticorpos^{32, 33}, incorporação de biossensores,^{34, 35} entre outros, que favoreçam sua entrega ao tumor.³⁶

Novas plataformas orgânicas e inorgânicas^{37, 38} vêm sendo aprimoradas. Para a produção de nanopartículas poliméricas, novos polímeros com melhor perfil de biocompatibilidade têm sido desenvolvidos.^{39, 40} Além disso, matrizes inorgânicas com características ópticas do tipo upconversion têm ganhado espaço na área médica.⁴¹ Assim, tendo em vista a alta susceptibilidade

a transformações que tais sistemas apresentam, hoje, uma partícula pode apresentar propriedades diversas.

2.1.1. Mecanismo de ação das EROs em tecido tumoral

Os mecanismos de morte celular podem ser divididos em dois grupos, Morte por necrose que é resultado de lise celular, gerando danos a membrana e extravasamento de constituintes celulares, o que leva à inflamação local e danos aos tecidos que circundam a região necrótica.⁴² A morte por necrose causada por TFD acontece pela produção de EROs localizados no citoplasma da célula, sem que haja a liberação de qualquer fator imuno indutor. O segundo mecanismo de morte celular é a forma de apoptose, tal mecanismo é controlado e ocorre pela ação de proteases e nucleases, sem dano a membrana plasmática, e suas características são: 1) aumento da permeabilidade da membrana plasmática e 2) alteração no potencial de membrana mitocondrial.

^{43, 44, 45}

No tratamento de câncer, espera-se que além da morte celular haja a resposta imunitária alertando o sistema imune contra a enfermidade, para isso, diversos fármacos foram desenvolvidos para não apenas causarem morte celular, mas também desencadear uma resposta imunitária, tais agentes como β – Lapachona, Apoptolidina e Honkil.⁴⁶ Além dos fármacos convencionais, a TFD é um método capaz de induzir necrose e apoptose de tecidos tumorais, sendo efetivo até mesmo em células resistentes a quimioterápicos clássicos e desencadeando, em muitos casos, de forma efetiva respostas imunitárias específicas contra o câncer.^{47, 48}

Foi descrita a eficiência de agentes FS em diversos tipos de câncer e células selvagens, extraídas de pacientes, que são resistentes a tratamento quimioterápico clássico,^{49, 50, 51, 52} A TFD induz apoptose por dois mecanismos, o modo mediado por mitocôndria, ou por receptor, os métodos intrínsecos, ou mitocondriais se dão pelo acúmulo de FS na mitocôndria, clivando sua membrana e liberando o fator citocromo c ao citosol ativando complexos enzimáticos hidrolíticas, como representado pela figura 2.⁵³

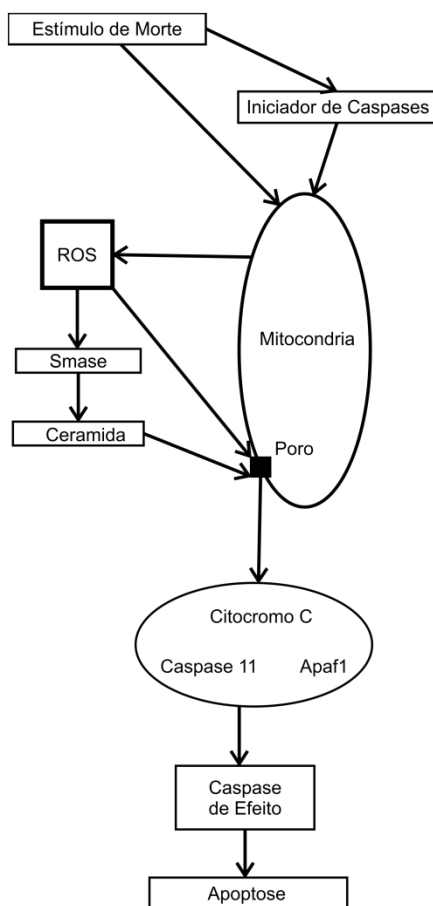


Figura 2. Ilustração do mecanismo de morte celular apoptótica mediado por EROs, imagem adaptada da referência 114.

O segundo mecanismo de morte celular mediado por FS é seu acúmulo na membrana plasmática ativando os fatores de necrose tumoral, nesse caso, as EROs lisam a membrana causando inflamação local.⁵⁴ Os dois processos de morte celular ocorrem no processo de ativação do agente FS, contudo, a ação necrótica é visível, causando inflamação local, contudo apoptose se mostrou como uma forma efetiva e dominante de morte celular em diversos tipos de células cancerosas.⁵⁴

Estudos imunológicos mais recentes desvendam a supressão imunológica causado por células cancerosas, o que diminui a efetividade do tratamento imunogênico, já que na presença de células pertencentes ao sistema imunológico, como linfócitos, as células cancerosas começam a produzir agentes supressores como prostaglandina E^{55,56}; Adenosina;⁵⁷ interleucinas;⁵⁸ Fator de necrose tumoral entre outros⁵⁹, dessa forma, apesar de diversos compostos apresentarem atividade imunogênica, é difícil prever a atenuação entre um tratamento efetivo e uma resposta imunitária não compensada, já que há diversos mecanismos de supressão atuantes ao mesmo tempo.

Dentre os fármacos que tem o poder de estimular uma resposta imunogênica, a Doxorubicina (DOX) possui alta ação antineoplásica, agindo na inibição da síntese de macromoléculas por danificar o DNA celular, pela inativação de topoisomerases II.⁶⁰ Além disso, a DOX também pode se acumular na mitocôndria celular, o que pode levar a produção endógena de EROs.⁶¹

Além do alto potencial citotóxico da DOX, um de seus principais problemas é a sua inespecificidade, tendo acúmulo preferencial no coração, o que causa a morte de células no miocárdio, causando insuficiência cardiovascular. Inúmeros estudos demonstram soluções voltadas a esse problema utilizando nanopartículas carregadoras. Em especial, o polímero PVM/MA forma nanopartículas interessantes, já que sua elasticidade química abre uma gama de possibilidades para a montagem de diferentes tipos de nanoestruturas.⁶²

2.2. AGENTES FOTOSSENSIBILIZANTES

Os primeiros testes clínicos voltados ao tratamento de câncer foram realizados com fotossensibilizantes denominados de primeira geração, as porfirinas, contudo, seus principais problemas eram baixa seletividade, baixo tempo de vida do estado tripleto de excitação do FS, acúmulo prolongado em tecidos não tumorais, que poderiam durar mais que 6 semanas após o tratamento, entre outras desvantagens.⁶³

De forma geral, o desenvolvimento de novos FS buscou superar problemas que foram observados na primeira geração. Assim, tendo como objetivo criar agentes fotossensibilizantes com estados de excitação de vida longa, maior seletividade para região tumoral, baixo efeito quimiotóxico, baixo acúmulo em tecidos normais e que fossem ativados em comprimentos de onda próximos a 700 nm.⁶⁴

A necessidade da utilização de uma faixa de comprimento de onda estreita no tratamento, 600 – 800 nm é pela absorção de luz por moléculas como a hemoglobina em comprimentos de onda entre 500 e 600 nm, e pela absorção de luz na faixa UV por quaisquer compostos insaturados, inclusive o próprio DNA. Assim, a luz na região do vermelho e do infravermelho próximo possui maior poder de penetração em tecidos biológicos em comparação a outras faixas do espectro visível ou da região UV, como demonstrado na figura 3.

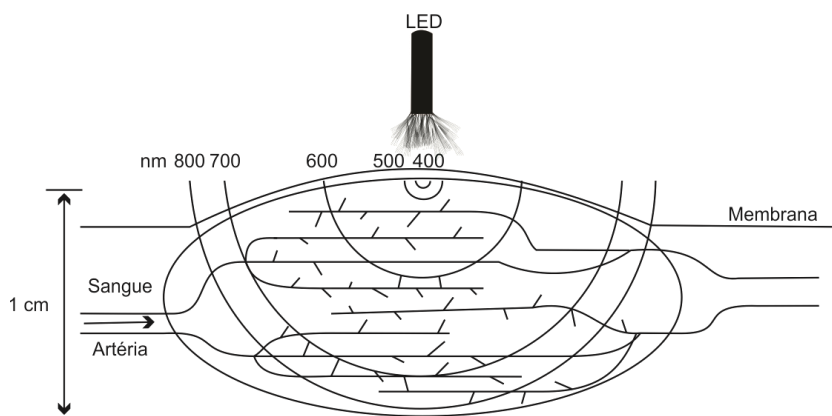


Figura 3. Dependência entre o comprimento de onda de incidência gerado por uma fonte LED com a profundidade de penetração em tecidos. ⁶⁴

2.2.1. Fotossensibilizantes de 1ª geração

O macrociclo porfirínico é um dos principais representantes da primeira geração de fotossensibilizantes. Sua estrutura, demonstrada na figura 4, consiste de uma porfirina livre de coordenação. Sua descoberta levou a aplicações clínicas, contudo, com diversos problemas, como baixo rendimento de produção de EROs, além de apresentar alto acúmulo em tecidos normais, e longo tempo de excreção do composto. ⁶³

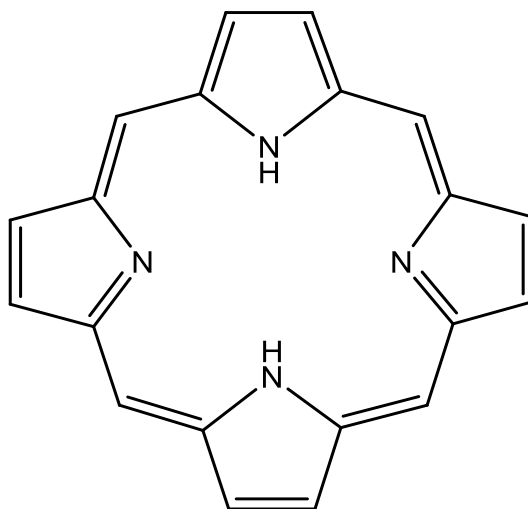


Figura 4. Representação estrutural de um macro ciclo porfirínico em sua forma neutra.

Apesar da elucidação da estrutura da classe das porfirinas, próximo de 1950, Schwartz provou através de estudos investigativos de mecanismo de ação molecular, que, na verdade, o que causa ação fototóxica das porfirinas é um complexo oligomérico, representado pela figura 5. Porfirinas em sua forma primordial não acumulavam de forma eficiente no tumor e a sua excreção

era muito rápida. Contudo a mistura oligomérica conferia ao composto grande acúmulo na região tumoral, assim como nos tecidos normais, explicando os resultados clínicos.

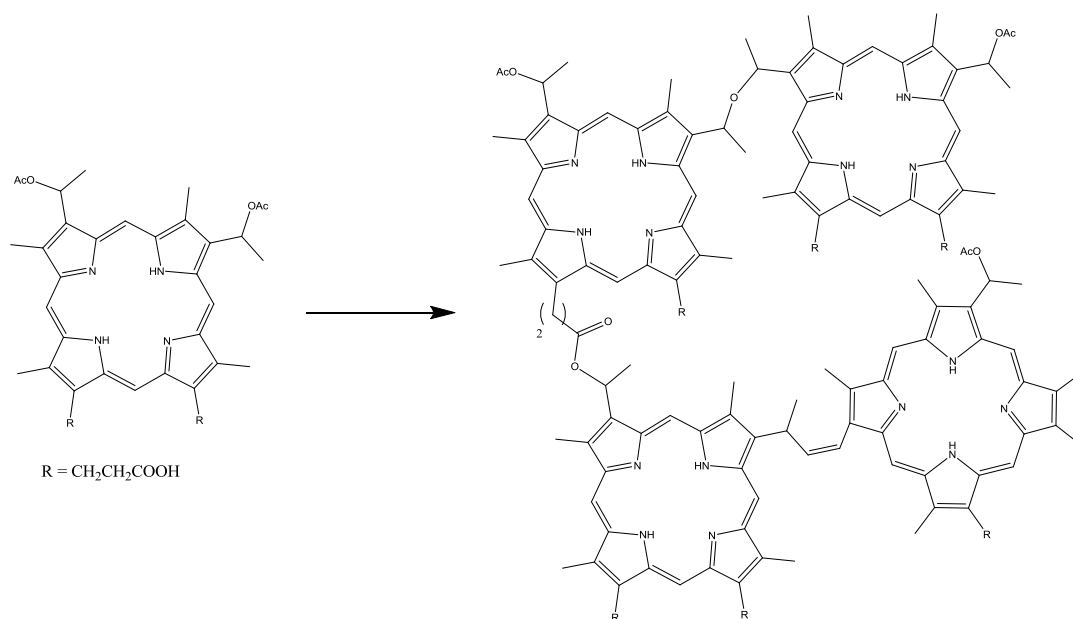


Figura 5. Representação da mistura oligomérica com atividade fototóxica descoberta por Schwartz.⁶⁴

2.2.2. Fotossensibilizantes de 2ª geração

Os fotossensibilizantes de segunda geração foram desenvolvidos com o intuito de suprir as necessidades técnicas observadas em testes clínicos com agentes sensibilizantes de primeira geração. Derivados de porfirinas e fotossensibilizantes não porfirínicos foram sintetizados e sua aplicação rendeu grande melhoria comparada aos agentes da primeira geração. Estudos utilizando metais para e diamagnéticos renderam diferentes resultados quanto ao tempo de vida do estado tripleto do fotossensibilizante, por aproximar as bandas dos orbitais moleculares do agente FS, tornando o estado excitado mais estável, aumentando consequentemente a eficiência fotofísica e fotoquímica dos fotossensibilizantes. Também foram desenvolvidos compostos mais seletivos à região tumoral.

2.2.2.1. Ftalocianinas

A classe das ftalocianinas (figura 6) são amplamente utilizadas por possuírem alta absorvidade molar, $2.5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, em comparação com as porfirinas de primeira geração significativo acúmulo em regiões tumorais e longo tempo de retenção por células cancerosas. Apesar da grande evolução com a entrada da classe das ftalocianinas, um agravante em sua aplicação biológica é devido a sua alta hidrofobicidade, formando agregados em meio aquoso por sobreposição π de orbitais moleculares.^{65, 66}

Tais agregados diminuem a eficiência do tratamento por causar efeito de perda de fluorescência por agregação, ou, extinção, que diminui a produção de EROs por inativação do agente fotossensibilizante ^{67, 68}, além do alto acúmulo do FS em sua grande maioria nos tecidos saudáveis, como fígado, baço e rins ⁶⁹.

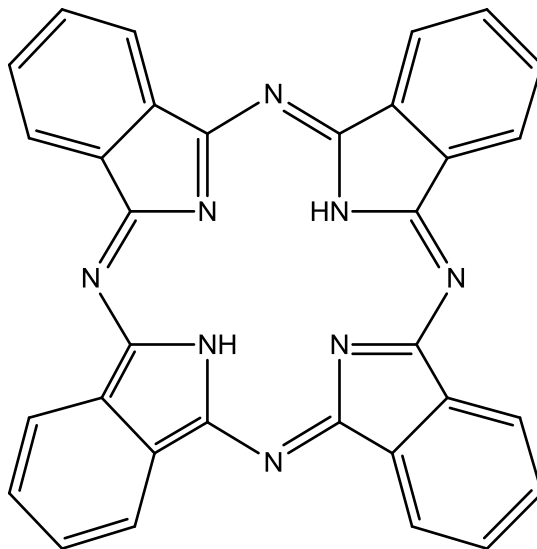


Figura 6. Forma estrutural básica da classe de agentes fotossensibilizantes chamados de ftalocianinas.

Para contornar tal inconveniente, inicialmente foi proposto acoplar em sua estrutura grupamentos anfifílicos ou hidrofílicos, aumenta a solubilidade do fármaco em água, contudo, junto com essa possível solução, surgiu um segundo problema, sendo esse, a má retenção do fármaco por células neoplásicas em comparação com a ftalocianina não modificada.^{70, 71, 72} Outra solução foi a aplicação de nanopartículas como carregadores, com o intuito de manter as moléculas de ftalocianina desagregadas, reduzindo os efeitos negativos na extinção sobre sua atividade fotodinâmica e melhorando sua biodistribuição, como demonstrado em estudos *in vivo*.^{73, 74}

2.2.3. Mecanismo de transferência de energia para formação de EROs

O modo de excitação do oxigênio molecular se dá pela sua estrutura eletrônica específica, tornando esse composto peculiar, como demonstrado na figura 7. Mais de 10 anos de estudos sobre o oxigênio foram necessários para compreender de fato como ocorrem as transferências de energia, com todas suas formas excitadas possíveis, e concluiu-se que tal peculiaridade é consequência de sua estrutura eletrônica aberta. Visto isso, Mullikan previu três estados eletrônicos possíveis, o estado triplete de energia, ou estado fundamental $O_2(X^3 \Sigma_g^-)$. Espécies com estado triplete de energia tem como característica a participação em reações de forma radicalar, dessa maneira os dois estados excitados de menor energia, são previstos como sendo

$O_2(a^1\Delta_g)$ e $O_2(b^1\Sigma_g^+)$, que são estados singletes de excitação. Posteriormente, por práticas espectroscópicas utilizando marcadores de spin ou marcadores fluorescentes, todos os estados de excitação foram comprovados.⁷⁵

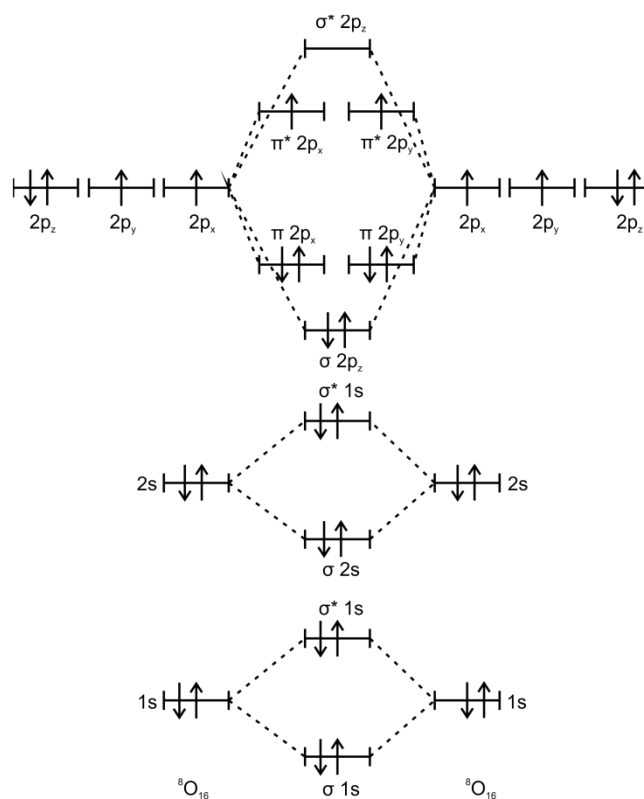


Figura 7. Representação dos orbitais moleculares (TOM) para o oxigênio molecular em seu estado tripleto.

Estados de excitação de moléculas são usualmente decorrentes da interação da matéria com uma radiação de alta energia, como o ultravioleta. Contudo, é inviável a utilização de ondas eletromagnéticas de alta energia para fins biológicos, tanto pela fototoxicidade quanto pela baixa penetração destes fótons.^{67, 68} Dessa forma, foi pertinente a busca de métodos que combinam a química de compostos com a física de transferência de energia entre sistemas, para controlar a formação de tais estados excitados de oxigênio e possibilitar sua aplicação em sistemas biológicos. Assim os agentes fotossensibilizantes foram o foco dos estudos após as observações feitas por Finsen¹ em 1901.

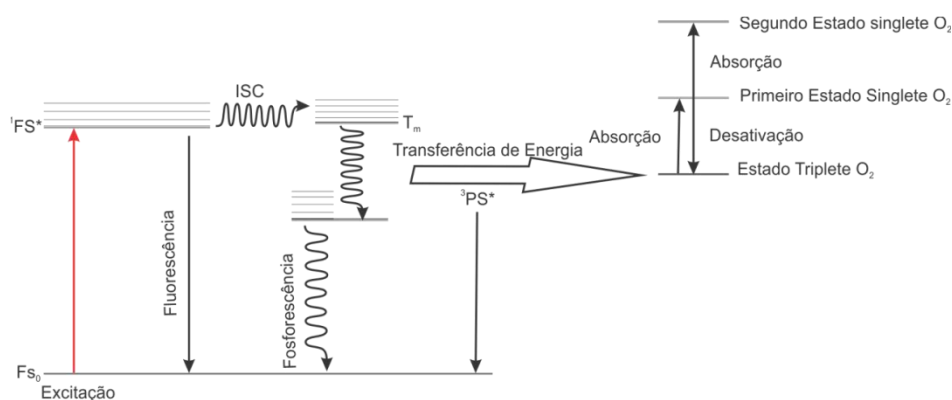


Figura 8. Ilustração de excitação de um fóton para transferência de energia gerando estados excitados de oxigênio, onde FS representa os estados do agente fotossensibilizante, ISC representa a transferência cruzada de energia entre estados excitados do agente fotossensibilizante e PS representa um decaimento de energia não radioativo do agente fotossensibilizante.⁷⁶

Agentes fotossensibilizantes são amplamente estudados a fim de se desenvolver métodos de tratamentos menos prejudiciais ao paciente e com alto rendimento quântico, possibilitando atingir altas concentrações de oxigênio em estados excitados.^{77, 78} A transferência de energia se dá como representado na figura 8, o agente fotossensibilizante absorve energia dos fótons introduzidos no sistema, podendo tal absorção ser de um ou dois fótons, então o decaimento da espécie excitada pode ser de três formas: a primeira é a perda de energia em forma não radioativa, como movimentos de vibração, translação e rotação,⁷⁹ a segunda forma é na emissão de energia eletromagnética e a terceira é um cruzamento entre estados dando origem a um novo estado de energia, chamado de estado tripleto.^{80, 81} Tal estado tripleto pode decair em forma de fosforescência ou transferir energia em estado tripleto – tripleto de excitação para um agente aceptor, tal como o oxigênio, nesse caso, dando origem a suas formas excitadas.⁸²

Além da transferência de energia utilizando uma fonte de excitação luminosa, existem outras formas químicas de produção de espécies reativas de oxigênio que foge do escopo do trabalho, contudo, é válido ressaltar clivagens hemolíticas e heterolíticas para formação de estados excitados de oxigênio, onde a transferência de energia se dá pela quebra de um composto orgânico instável, liberando porções de baixa energia após sua clivagem.^{83, 84, 85}

2.2.4. Mecanismo de foto-oxidação radicalar

Há duas maneiras pelas quais pode ocorrer extinção envolvendo reações com oxigênio singlete. Tal extinção pode ser: 1) Redutiva, na qual ocorre a redução do agente FS, oxidando um aceptor ou oxidante, ou 2) Oxidativa, na qual ocorre a oxidação de agente FS reduzindo um doador,^{86, 87, 88} como demonstrado na figura 9.⁸⁹

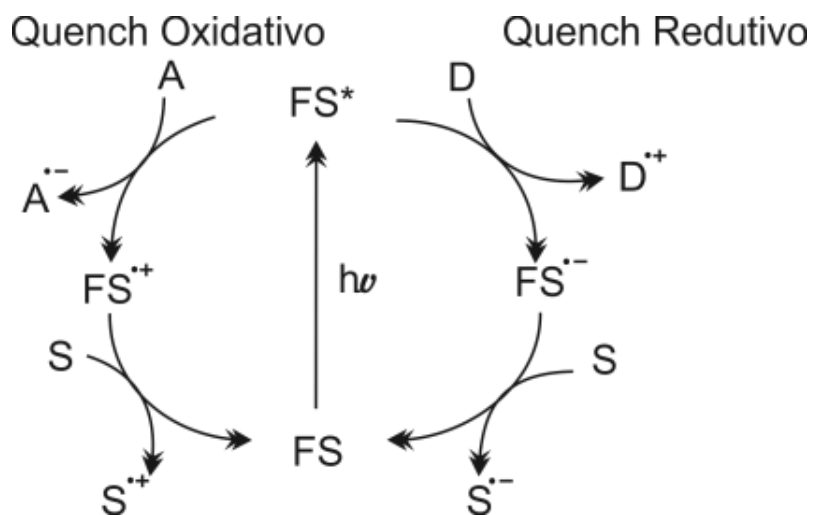


Figura 9. Representação esquemática do processo de quenching redutivo e oxidativo gerando espécies radiculares catiônicas e aniônicas, onde A representa um acceptor; S representa um substrato; D representa um agente doador e FS representa um agente fotossensibilizante.

Hidrocarbonetos halogenados usualmente respondem a interação oxidante de formas variáveis, na figura 10, por exemplo, utilizou-se o agente fotossensibilizante N-metilquinolino tetrafluoroborato (NMQ^+) que é excitado no comprimento de onda de 313 nm, onde a resposta reacional deu-se com a formação de sulfóxido. Reações radiculares são de extrema complexidade em questão de controle. Assim como demonstrado nas figuras 10 e 11, diversos tipos de reações podem ocorrer na presença de oxigênio singlete e, dessa forma, misturas de produtos são muito comuns em soluções que contenham haletos orgânicos em sistemas insaturados⁹⁰. No sistema proposto nesse trabalho, é certo que a clivagem de nanopartículas pela presença de oxigênio singlete não seja a via preferencial, já que podem ocorrer diversos tipos de oxidação.^{91,92} Contudo, ela ocorre, de forma significativa, como será demonstrado nos sessão de resultados.

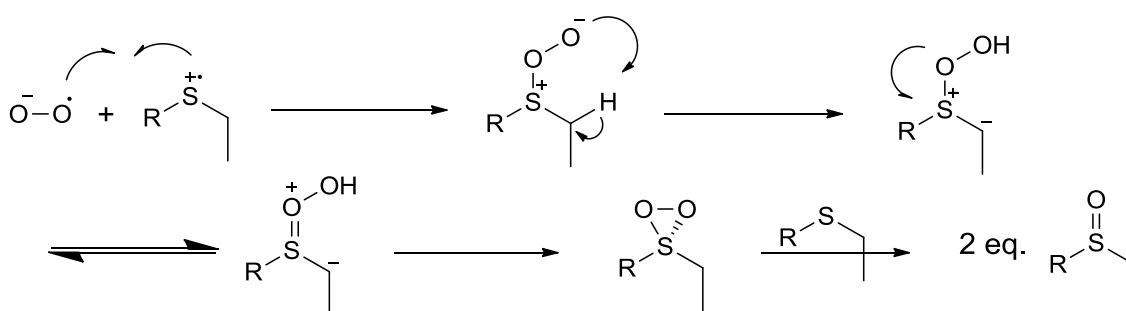


Figura 10. Representação mecanística envolvendo a foto-oxidação do enxofre.

3. JUSTIFICATIVA

A quimioterapia anticâncer demanda aperfeiçoamentos devido a sua inespecificidade e ações adversas negativas irreversíveis, que são relacionadas muitas vezes à aplicação sistêmica de fármacos quimioterápicos. Muitos estudos sugerem o uso de nanotecnologia para aumentar a eficácia e diminuir os efeitos adversos destes fármacos anticâncer, já que certas nanoestruturas possuem características que melhoram a farmacocinética de quimioterápicos convencionais, propiciando sua liberação sustentada, maior biodisponibilidade, entrega aumentada ao sítio alvo, entre outras vantagens. Além disso, a liberação do fármaco associado a nanoestruturas pode ser ativada no sítio alvo por estímulos externos, tais como a irradiação com luz, reduzindo assim a chegada do fármaco em tecidos saudáveis.

Dessa forma, esse projeto tem como hipótese a possibilidade de desenvolver um sistema nanoestruturado fotossensível para liberação controlada de fármacos por fotooxidação de superfície, além de promover efeito sinérgico/aditivo do fármaco quimioterápico com o agente FS que causa oxidação de superfície. Assim promovendo um efeito mais direcionado e efetivo, por aumentar a toxicidade do fármaco no sítio alvo e liberar uma dose maior de fármaco após a fotoativação. Tal sistema é interessante cientificamente, pois abre uma porta para inúmeras possibilidades de criação no campo de controle de liberação de fármacos em sistemas nanoestruturados, melhorando a seletividade e a dosagem de compostos bioativos.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GERAL

Desenvolver uma solução de nanopartículas poliméricas que atuem por TFD e por quimioterapia localizada fotoativada, tendo como indutora de liberação do fármaco quimioterápico processos fotodinâmicos.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Utilizar compostos orgânicos que possuem grupos funcionais físeis sob reação com oxigênio singleto, para transformação do polímero PVM/MA.⁹³
- Produzir, por meio de nanoprecipitação, uma nanopartícula polimérica sensível a TFD e carregada com doxorrubicina.
- Associar às nanopartículas o agente fossensibilizante cloreto de alumínio-ftalocianina.
- Estudar a cinética de liberação, fotoativada ou não, do fármaco doxorrubicina associado às nanopartículas.
- Realizar ensaio *in vitro* de citotoxicidade em células cancerosas 4T1 (adenocarcinoma; mamário murino), MCF-7 (adenocarcinoma mamário humano); e células normais NIH-3T3 (fibroblasto murino).
- Analisar o perfil de distribuição intracelular das nanopartículas poliméricas.
- Analisar o perfil de morte de células tratadas com as nanopartículas no escuro ou sob irradiação.

5. MÉTODOS

5.1. MATERIAIS

Tabela 1. Materiais utilizados nos experimentos

Materiais	Fabricante
Acetonitrilo (99,96% - Grau HPLC)	J.T. Jacker, Brasil
PVMMMA (Gantrez AN-119)	ISP, Brasil
2-Aminofenil dissulfeto	Sigma Aldrich, EUA
Ácido trifluoro acético (TFA)	Sigma Aldrich, EUA
Dimetilsufóxido (DMSO)	Sigma Aldrich, EUA
Dimetilformamida (DMF)	Sigma Aldrich, EUA
Metanol (99,96% - Grau HPLC)	J.T. Jacker, Brasil
Membrana éster de celulose mista 47mm 0.47µm	Analitica, Brasil
Etanol (99,3 ° INPM)	J.T. Jacker, Brasil
Acetona (99,6%)	J.T. Jacker, Brasil
cloreto de alumínio-ftalocianina	Sigma Aldrich, EUA
Tween 80	Sigma Aldrich, EUA
Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5- difeniltetrazólico (MTT)	Invitrogen, EUA
Azul de tripan	Sigma Aldrich, EUA

Hidrocloridrato de doxorubicina	Sigma Aldrich, EUA
Etanol (99,3° INPM)	J.T. Backer, Brasil
Parafolmaldeído	Sigma Aldrich, EUA
Meio do Instituto Memorial Park Roswell (RPMI)	Gibco, EUA
Meio Eagle Modificado por Dulbecco (DEMEM)	Gibco, EUA
Penicilina	Gibco, EUA
Peróxido de hidrogênio	Vetec, Brasil
Rhodamina 123	Probes – ThermoFisher, EUA
Soro fetal bovino	Gibco, EUA
Tripsina	Gibco, EUA
Tampão de ligação (0,1 M HEPES (pH 7,4); 1,4 M de NaCl e 25 mM de CaCl ₂)	Sigma, EUA
Metanol (99,96% Grau HPLC)	J.T. Backer, Brasil
Grid de cobre 300 Mesh	PELCO® Grids for TEM
Solução Salina Tamponada (PBS)	Laborclin, Brasil
Estreptomicina	Gibco, EUA

5.2. SÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS

As nanopartículas poliméricas foram preparadas pelo método clássico de nanoprecipitação, representado de forma esquemática na figura 11, chamado precipitação de Ouzo, onde ocorre um processo de aglomeração de fitas poliméricas devido a sua baixa solubilidade no meio aquoso. Em um frasco âmbar, uma solução de 20 mg/mL⁹⁴ de PVM/MA foi preparada em acetonitrilo sob agitação magnética durante 10 minutos. Em seguida 15 mg de 2-aminofenil dissulfeto (2SS) foram adicionados ao sistema junto a 2,5 mg de doxorubicina (DOX). Imediatamente após a adição de DOX e 2SS, 10 mL de água foram adicionados ao sistema, causando a precipitação do polímero em forma de nanopartículas carregadas de DOX, já que o fármaco doxorubicina em sua forma neutra possui caráter hidrofóbico, sendo direcionada ao núcleo das nanopartículas. O sistema prosseguiu por 24 h sob agitação magnética a temperatura ambiente (TA) para a completa reação do 2SS com o polímero dando ao PVMMA estabilidade e conferindo propriedades específicas, como a sensibilidade a EROs.

Após 24 h de agitação magnética a temperatura ambiente, 50 µL de Tween 80 foram adicionados ao sistema, tendo como função principal de aumentar o poder de adsorção do agente FS na superfície da nanopartícula, aumentando a dispersão do agente FS e assim evitando o efeito de quenching causado por empacotamento entre moléculas de ALPHCN através de interação entre os orbitais π moleculares dos anéis aromáticos, conseguinte após 10 minutos de homogeneização, 6 µL de uma solução etanólica de ALPHCN (300 µM) foram adicionados. Por fim, o sistema foi rotaevaporado para retirada de resíduos de solventes orgânicos utilizados durante a síntese tendo como resultado uma solução de nanopartículas dispersas em meio aquoso.

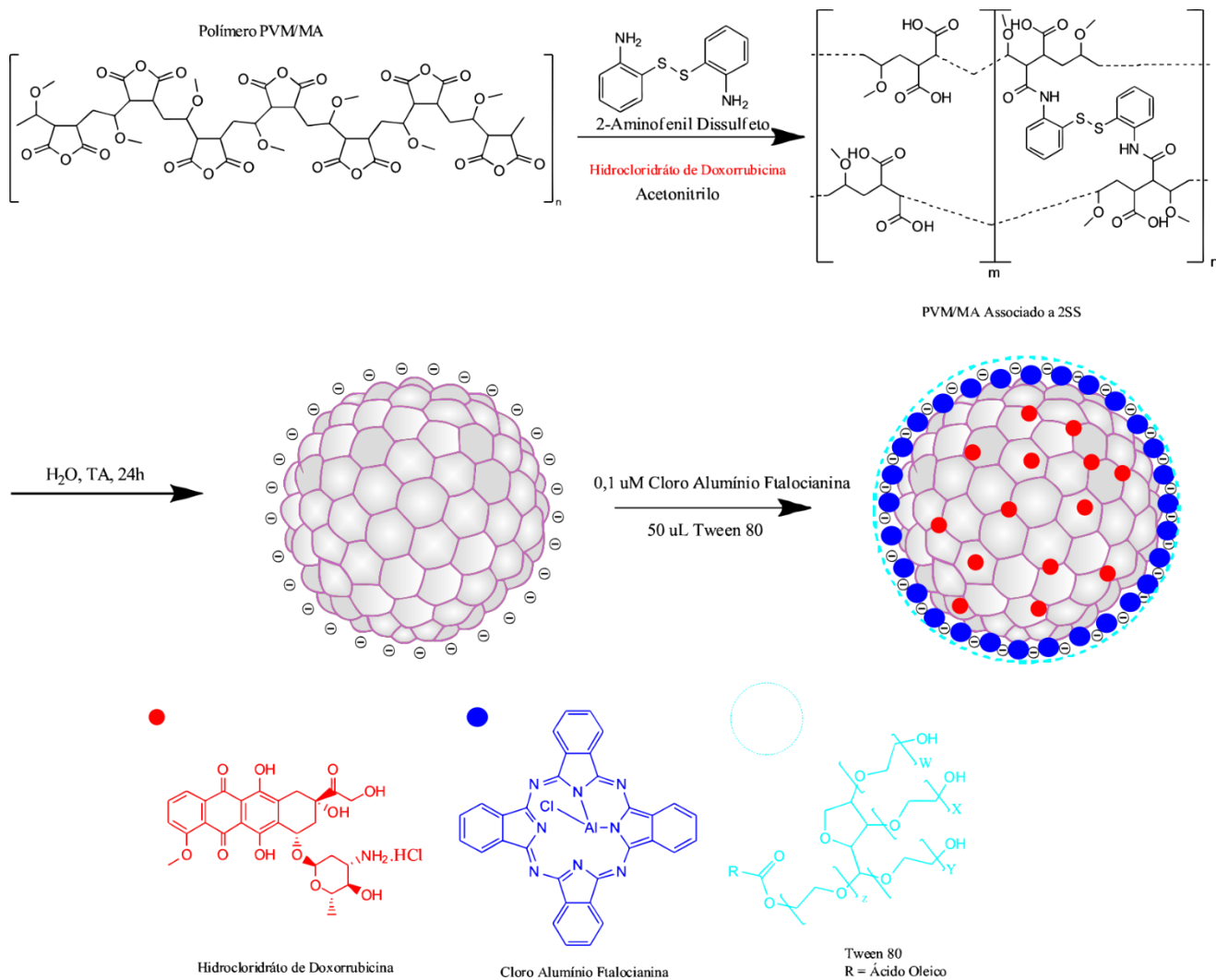


Figura 11. Representação ilustrativa de hipótese estrutural da nanopartícula polimérica.

5.3. CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS CONTENDO DOX E AIPHCN

5.3.1. Avaliação das propriedades coloidais

As nanopartículas poliméricas foram armazenadas a condições normais de temperatura e analisadas em um fotômetro de dispersão dinâmica de luz (DLS) (Zetasizer Nano ZS®, Malvern Instruments Ltd., Reino Unido; laser 633 nm), para determinação de seu diâmetro hidrodinâmico, potencial zeta e índice de polidispersão. Soluções de 5% (v/v) de nanopartículas em água MiliQ foram analisadas a temperatura de 25 °C com incidência de laser a 90°. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

5.3.2. Estabilidade física das nanopartículas

Alíquotas contendo nanopartículas poliméricas (LSN) foram mantidas sob as seguintes condições: 20 – 30 °C sob condições ambientes, 4 °C em geladeira e 40 °C em estufa e, por fim, uma das alíquotas passou pelo processo de centrifugação a 5000 rpm durante 15 minutos para

investigar uma eventual separação de fases. As amostras expostas a diferentes condições foram analisadas pelo período de 1 ano por DLS.

5.3.3. Avaliação de morfologia e estrutura superficial

Para avaliar a morfologia de superfície das nanopartículas, foi realizada microscopia eletrônica de varredura (Quanta Feg 250, FEI Company, EUA). Tipicamente, a dispersão de nanopartículas foi diluída 1:1000 (v/v) em água destilada, e 30 μ L da dispersão final foram depositados sobre a superfície de um suporte metálico (Stub). O suporte foi deixado para secar por 24 horas sobre a bancada e, em seguida, foi metalizado em um metalizador Blazers SCD 050® (Blazers Union AG, Liechtenstein).

Para avaliação de forma, as nanopartículas foram analisadas em um microscópio eletrônico de transmissão (JEOL GEM 1011®, Japão). A amostra foi diluída 1:1000 (v/v) em água e depositada sobre telas de cobre de 300 mesh recoberta com Formvar 0,5%. Ainda, a amostra foi contrastada negativamente com ácido fosfotúngstico por 10 minutos.

5.3.4. Quantificação da concentração do corante IR-780 por espectrofotometria de UV-VIS

Para avaliação de hipótese deste trabalho, a DOX foi substituída por um corante inerte, IR-780, evitando reações inespecíficas pelos sítios ativos do polímero PVM/MA, o que impede que 100% do fármaco seja liberado do interior das nanopartículas. Para análise de liberação do corante IR-780, utilizou-se o método de diálise por membrana de éster e celulose mista 47 mm com poros de 50 KDa. As membranas de celulose foram previamente hidratadas por 36 h, então foram realizados três experimentos para avaliar a taxa de liberação do corante; 1) 1,0 mL da formulação contendo o corante IR-780 livre na concentração de 0,25 mg/mL. 2) 1,0 mL da formulação NPD (nanopartículas contendo o polímero PVM/MA associado a 2SS carregando o corante IR-780), na concentração 0,25 mg/mL, na ausência de irradiação, e 3) 1,0 mL da formulação NPD, na concentração de 0,25 mg/mL, após irradiação (50 minutos, 5,0 cm de distância, comprimento de onda de 660 nm de excitação, Potência de 198,23 mW/cm² e Fluência de 594,68 J/cm²), utilizando o equipamento de LED 660nm, [Desenvolvido pelo Professor Paulo Eduardo N. de Souza (psouza@unb.br – psouza1974@gmail.com) no Laboratório de Softwares e Instrumentação em física aplicada do Instituto de Física (IF) da Universidade de Brasília]. As amostras foram adicionadas a uma membrana, que foi selada e imersa em 50 mL de solução contendo acetonitrilo e água MiliQ 4:1 (v:v) por 24 horas sobre agitação contínua. Em determinados tempos, 2,0 mL da solução de diálise foi coletada e imediatamente analisada por espectrofotometria de UV-VIS em λ igual a 780nm. Os valores de concentração plotados são

referentes à porcentagem de IR-780 acumuladas no meio de diálise, determinados pela seguinte equação:

$$\text{Liberação (\%)} = \frac{[\text{IR} - 780 \text{ Liberada}]}{[\text{IR} - 780 \text{ Total}]} \times 100\%$$

No qual IR-780 liberado é a concentração de IR-780 determinado no meio dialisador e IR-780 total é a concentração do máximo teórico (2,0 µg/mL).

5.3.5. Quantificação da concentração de DOX por Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC)

Para análise do perfil de liberação de DOX, foi utilizada cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), com um cromatógrafo (Shimadzu-Prominence) acoplado a um degaseificador (DGU 20A5), com módulo de distribuição de solvente (LC-20AT), amostrador automático (SIL-20AHT), forno de coluna (CTO-20A), detector de fluorescência (RF 10-AXL) e controlador de sistema (CBM-20A). A coluna utilizada foi C18 de fase-reversa ACE 5AQ (25 x 0,4 cm, 5 µm) (ACE, Aberdeen, Scotland) com pré-coluna (1,0 x 0,4 cm, 5 µm) (ACE, Aberdeen, Scotland).

Para curva de calibração, foram feitas soluções padrões de DOX com concentrações entre 0,5 e 2,0 µg/mL preparadas em água MiliQ. A fase móvel foi composta por 65% de uma solução 0,012% (v/v) de TFA em Água MiliQ e 35% de acetonitrilo (v/v).⁹⁵ A detecção foi realizada em célula de fluxo de 12 µL com excitação em 470 nm e emissão em 555 nm. O volume de injeção foi de 20 µL com fluxo de 1,0 mL/min e temperatura de coluna de 30 °C. O tempo de corrida foi de 7 minutos e o processamento e identificação de picos foram realizados no software LC Solution (Shimadzu, Tokyo, Japan).

5.3.6. Perfil de liberação de DOX

Para análise de liberação de DOX das nanopartículas poliméricas, utilizou-se o método de diálise¹²¹ por membrana de ésteres de celulose de 47 mm com poros de 50 kDa. As membranas de celulose foram hidratadas por 36 h e então três experimentos de liberação foram realizados, avaliando diversos tempos em um período de 24 h; 1). 1,0 mL de DOX livre, na concentração de 0,25 mg/mL. 2). 1,0 mL da formulação LSN, na concentração de 0,25 mg/mL de DOX e 3). 1,0 mL da formulação LSN, na concentração de 0,25 mg/mL de DOX, o sistema foi previamente irradiado antes da análise de liberação, (50 minutos, 5,0 cm de distância, comprimento de onda de 660 nm de excitação, Potência de 198,23 mW/cm² e Fluência de 594,68 J/cm²). Os sacos de diálise foram então selados e imersos em 250 mL de solução contendo água MiliQ e metanol 1:1 (v:v) por 24 horas sob agitação contínua. Em determinados tempos, 500 µL da solução de diálise foram

coletados e imediatamente analisados por HPLC. Os resultados foram plotados como porcentagem de DOX liberada ao meio de diálise, de acordo com a seguinte equação abaixo, na qual [DOX Liberada] é a concentração de DOX quantificada no meio dialisador e [DOX Total] é a concentração máxima teórica (2,0 µg/mL).

$$\text{Liberação (\%)} = \frac{[\text{DOX Liberada}]}{[\text{DOX Total}]} \times 100\%$$

5.3.7. Espectroscopia de Infravermelho (FTIR)

Para compreensão dos acoplamentos envolvidos na estrutura das nanopartículas entre o polímero PVM/MA, 2SS e DOX, o método de FTIR foi utilizado. As amostras foram preparadas e secadas a TA sobre lâminas de microscopia. Após a secagem, os filmes formados sobre as lâminas foram raspados e os produtos foram então analisados pelo método ATR-FTIR, que utiliza o módulo de refletância total atenuada (ATR), não sendo necessário o preparo da pastilha KBr para análise. Para tal, 15 mg das amostras foram comprimidos sobre a sonda ATR e as amostras foram analisadas pelo espectroscópio FTIR (Vertex 70, Bruker, EUA) a temperatura ambiente com 64 varreduras por amostra.

5.3.8. Avaliação da fotodegradação do 2-aminofenil dissulfeto (2SS) por espectrometria de massas (UHPLC-MS/MS)

Para avaliação da formação de produtos de degradação do 2SS após irradiação, uma amostra de 5 mL de uma solução hidroetanólica 80% contendo 10 mg/mL de 2SS, e 6 µM de ALPHCN, foi irradiada durante 50 minutos, 5,0 cm de distância, comprimento de onda de excitação de 660 nm, potência de 198,23 mW/cm² e fluência de 594,68 J/cm². Após o período de irradiação, a solução foi seca por rotaevaporação e os produtos de degradação foram fracionados por cromatografia de coluna, com fase móvel composta por uma solução de 80% clorofórmio e 20% etanol, e a fase estacionária de sílica em pó. Frações de aproximadamente 10 mL foram coletadas e o conteúdo dos tubos de coleta foram avaliados por cromatografia em camada delgada (TLC). Os tubos que continham os mesmos produtos foram secos por rotaevaporação.

Para avaliação no espectrômetro de massas, uma solução de 1 ppm foi preparada em metanol padrão HPLC contendo 5% (v:v) de ácido fórmico. Como controle foi utilizado um padrão de 2SS puro e não irradiado. Os produtos foram injetados no UHPLC-MSMS (Cromatógrafo Líquido Eksigent Ekspert 100-XL; Espectrômetro AB Sciex TripleTOF 5600+) utilizando metanol puro como eluente na ausência de coluna. O espectro base foi obtido por *Time of Flight* (TOF-MS) com faixa de razão massa (m)/carga (z) entre 0 e 250 m/z no período de tempo de 0.382 a 0.576 minutos

de corrida do UHPLC e, a partir do espectro base, o pico em 126.0385 m/z foi fragmentado por TOF-MSMS em potencial positivo, utilizando câmara de gás CID de nitrogênio na pressão de 1×10^{-5} torr.

5.4. ENSÁIOS *IN VITRO*

5.4.1. Cultivo Celular

Células de adenocarcinoma mamário murino da linhagem 4T1 foram obtidas do banco de células da *American Type Culture Collection* (ATCC), EUA. Células de adenocarcinoma mamário humano MCF-7 e fibroblastos murinos NIH-3T3 foram obtidos do Banco de Células do Rio de Janeiro. As células 4T1 foram cultivadas em meio RPMI suplementado com 10% (v/v) SFB (Soro fetal bovino) e 1% (v/v) antibiótico contendo 100 U/mL de penicilina e 100 mg/ml de estreptomicina. As células NIH-3T3 e MCF-7 foram ambas cultivadas em meio DEMEM, seguindo as mesmas proporções de suplementação da linhagem 4T1. Todas as células foram mantidas em incubadora a 37 °C e atmosfera úmida com 5% de CO₂.

5.4.2. Análise de viabilidade pelo método MTT

O ensaio de MTT (3-(4,5dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio brometo) foi realizado a fim de se estudar a viabilidade celular resultante dos tratamentos.⁹⁶ Para tal, foram utilizadas placas de 96 poços – $0,5 \times 10^4$ células/poço-expostas por 24 h aos seguintes tratamentos: 1) FDOX (DOX livre dissolvida em meio de cultivo); 2) NDOX (nanopartículas de PVM/MA contendo DOX); 3) NFTC (nanopartículas de PVM/MA contendo ALPHCN); 4) LSN (nanopartículas de PVM/MA contendo DOX e ALPHCN); 5) LSNIRR (nanopartículas LSN, irradiadas por 15 minutos, LED 660 nm; Potência de 202,91 mW/cm²; distância de 5 cm; Fluência de 185,57 J/cm²); 6) NFTCIRR (nanopartículas NFTC, irradiadas por 15 minutos, LED 660 nm; Potência de 202,91 mW/cm²; distância de 5 cm; Fluência de 185,57 J/cm²); 7) NPol (nanopartículas de PVM/MA), 8) meio de cultivo (controle).

Cada experimento foi realizado em quadruplicata e em 9 concentrações diferentes de DOX (0.049, 0.098, 0.195, 0.391, 0.781, 1.563, 3.125, 6.250 e 12.500 µg/mL) e 9 concentrações diferentes de ALPHCN (1.953×10^{-5} , 3.906×10^{-5} , 7.812×10^{-5} , 15.625×10^{-5} , 31.250×10^{-5} , 62.500×10^{-5} , 100.000×10^{-5} , 300.000×10^{-5} e 500.000×10^{-5} µM). As concentrações de PVM/MA foram mantidas constantes para todos os tratamentos ($1,690 \times 10^{-5}$, $5,080 \times 10^{-5}$, $1,520 \times 10^{-4}$, $4,570 \times 10^{-5}$, $1,372 \times 10^{-3}$, $4,115 \times 10^{-3}$, 0,012, 0,037, 0,111 mg/mL).

Depois de 24 h, as amostras foram incubadas por 2 horas e 30 minutos a 37 °C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ com uma concentração de 0,5 mg/mL de MTT. Após o período de 2,5 h, os cristais de formazan aderidos no fundo da placa foram dissolvidos em 150 µL

de DMSO e a absorvância foi medida em um espectrofotômetro (Spectramax M2, Molecular Devices, EUA) de placa usando comprimento de onda λ de 595 nm. Os resultados foram plotados como porcentagem de células viáveis em relação ao controle tratado com meio de cultivo, utilizando o software Origin 8.0.

5.4.3. Avaliação de Interiorização

Este procedimento foi realizado para verificar o perfil de interiorização de nanopartículas, por células 4T1. Para tal, células 4T1 foram plaqueadas na concentração de 6×10^4 células/poço em uma placa de 24 poços. Após 24 h, as células foram expostas a concentrações de 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de DOX e 6 nM de ALPHCN nos seguintes experimentos: 1) FDOX; 2) LSN; 3) LSNIRR e 4) PBS (controle). As células foram expostas aos tratamentos por 30, 60, 120 ou 180 minutos e foram analisados no citômetro de fluxo (FACSVerse, BD, EUA) em seguida. As fluorescências da DOX e ALPHCN foram analisadas nas linhas de λ igual a 575 nm e 660 nm respectivamente. Foram analisados 1×10^4 eventos por amostra em triplicata, e os dados foram analisados pelo software FlowJO vX 0.7.

5.4.4. Análise de morfologia celular

A fim de verificar a mudança na morfologia celular após as realizações dos tratamentos, células 4T1 foram semeadas em placas de 24 poços, em concentração de 6×10^4 células/poço. Os seguintes tratamentos foram realizados após 24 h: 1) FDOX; 2) NFTCIRR; 3) LSNIRR; 4) LSN; 5) Meio de cultivo. Todos os tratamentos a concentração de DOX e ALPHCN foram de 1,6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e 6,3 nM respectivamente. As células pertencentes aos grupos de experimentos 2 e 3 foram incubadas por um período de 1 h e então irradiadas por 15 minutos, LED 660 nm; potência de 202,91 mW/cm^2 ; distância de 5 cm; Fluência de 185,57 J/cm^2 . As demais células receberam apenas seus devidos tratamentos sem irradiação. Após 24 h, foram analisados 1×10^4 eventos por amostra em triplicata, e os dados foram analisados pelo software FlowJO vX 0.7.

5.4.5. Análise de potencial de membrana mitocondrial

Células 4T1 foram semeadas na concentração de 6×10^4 células/poço em uma placa de 24 poços, 24 h após o plaqueamento, as células foram expostas aos seguintes tratamentos: 1) LSN; 2) LSNIRR; 3) NFTCIRR; 4) FDOX; 5) controle H_2O_2 ; 6) meio de cultivo. As células dos grupos 2 e 4 receberam seus tratamentos por um período de 1 h e foram então irradiadas por 15 minutos, LED 660 nm; Potência de 202,91 mW/cm^2 ; distância de 5 cm; Fluência de 185,57 J/cm^2 . As demais células receberam seus devidos tratamentos sem serem irradiadas. Em todos os tratamentos a concentração de DOX e ALPHCN foram de 1,6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e 6,3 nM respectivamente. Vinte e quatro horas após o tratamento as células foram marcadas com Rodamina a 12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ por 15 minutos no

escuro e lavadas com PBS em seguida. A emissão de fluorescência de DOX e Rodamina 123 foram analisadas nos comprimentos de onda λ igual a 575 nm e 530 nm, respectivamente. Foram analisados 1×10^4 eventos por amostra em triplicata, e os dados foram analisados pelo software FlowJO vX 0.7.

5.4.6. Testes estatísticos

As correlações entre variáveis num gráfico XY foram analisadas por meio do teste de Spearman. O nível de significância (α) utilizado foi de 0,05 para todas as análises. Os testes estatísticos gráficos foram realizados com o programa Graphpad Prism® 6.

6. RESULTADOS E DISCUSSÕES

6.1. CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS

6.1.1. Avaliação das características coloidais e estabilidade das nanopartículas poliméricas

Na quimioterapia, muitas vezes, agentes antineoplásicos são administrados livres, tendo como consequência a necessidade aumentar a dosagem de fármaco, já que grande parte é perdida por interações inespecíficas dentro do sistema biológico. Nanossistemas carregadores já são bem aceitos e aplicados no carregamento de diversos fármacos, como a docetaxel e a DOX, os quais diminuem os efeitos adversos, como a cardiotoxicidade da DOX e aumentam o acúmulo do fármaco na região de interesse, atualmente já é autorizado o uso clínico no Brasil da forma lipossomada da DOX com o produto CAELYX, para câncer de mama, ovário e mieloma múltiplo.

A nova geração de nanossistemas apresentam a multifuncionalidade como característica principal, além de explorarem uma gama de mecanismos que estimulam a liberação de fármacos, podendo esses mecanismos ser por influência de pH⁹⁷, temperatura⁹⁸ e irradiação⁹⁹.

Neste trabalho foi utilizado o método ouzo de nanoprecipitação que consiste na dissolução do polímero PVM/MA em um solvente orgânico (acetonitrilo) seguido da adição de um solvente precipitante (água), o que forma enovelados de fitas poliméricas com sua decorrente precipitação. Já que os grupos funcionais majoritários no polímero são anidridos, isso o torna altamente hidrofóbico, gerando um núcleo sólido e bem estruturado quando exposto a altas concentrações de água, em sua forma primordial, o polímero possui baixa constante de solubilidade, favorecendo a precipitação.

Para determinar as características físico-químicas do sistema em um período de um ano, foram realizados testes de DLS na formulação LSN. Foi demonstrado que as nanopartículas possuem alta estabilidade de tamanho mantendo-se com diâmetro hidrodinâmico médio de 134 nm no primeiro dia e 169 nm no último, também apresentando sempre um índice de polidispersão (PDI)

baixo – menor que 0,14 – o que demonstra baixa dispersão do sistema. As amostras expostas a testes de temperatura, figura 12, (c)-(f) não perderam sua estabilidade, apresentando diâmetro hidrodinâmico médio de 134 nm para o dia inicial e 169,3 nm e 173,6 nm em 365 dias para os testes de geladeira (4 °C) e estufa (40 °C) respectivamente. Apresentaram também bom índice de polidispersão – 0,119 e 0,089 – e potencial zeta negativo em pH 5,5 para os testes de geladeira e estufa.

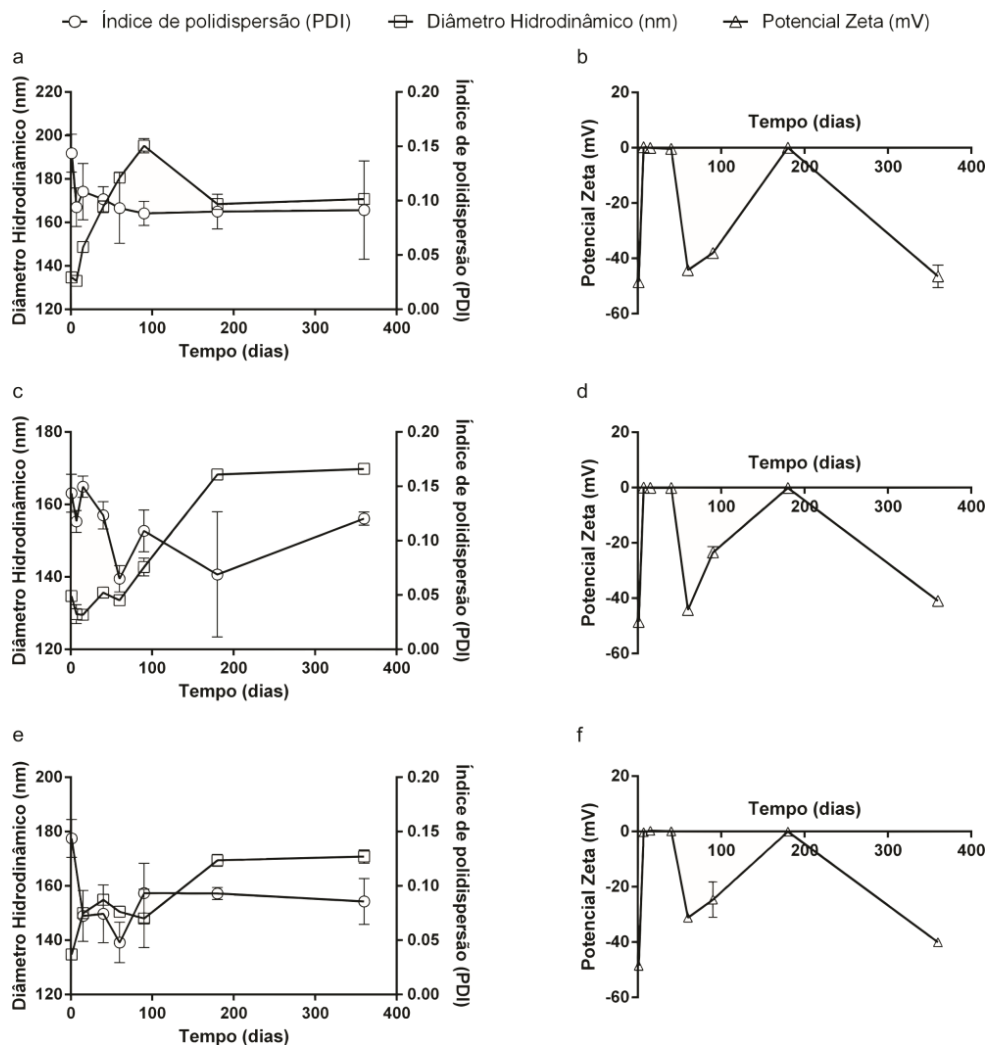


Figura 12. Representação gráfica da estabilidade hidrodinâmica das nanopartículas LSN no período de 365 dias em diferentes condições. (a)-(b). Análise de diâmetro hidrodinâmico e índice de polidispersão, a temperatura ambiente (20 °C - 30 °C); (c)-(d). Análise de diâmetro hidrodinâmico e índice de polidispersão, a temperatura ambiente (20 °C - 30 °C); (e)-(f). Análise de diâmetro hidrodinâmico e índice de polidispersão, realizados a 4°C (geladeira); (g)-(h). Análise de diâmetro hidrodinâmico e índice de polidispersão, realizados a 40 °C (estufa).

A provável explicação para a alta estabilidade das nanopartículas se encontra em seu baixo PDI, como demonstrado por Z. Zhou e colaboradores¹⁰⁰, tais estudos indicam que diversos efeitos influenciam o processo de floculação, tais como PDI, variação da rigidez de superfície, elasticidade e concentração. O baixo PDI trabalha contra o efeito chamado de maturação, que é o um processo

natural de aglomeração entre partículas grandes e pequenas, gerando separação de fases. Outro fator de suma importância é a carga superficial, já que a aglomeração entre as nanopartículas é evitada por efeito de repulsão eletrostática.

Um método alternativo aplicado para estimular a singularidade das nanopartículas é o uso de polímeros de alto peso molecular de caráter hidrofílicos, como demonstrado por K. Nejati-Koshki,¹⁰¹ onde nanopartículas são estabilizadas tanto por efeito repulsivo, quanto por efeito estérico causado por adoração de um derivados de polietileno glicol com o polímero PLGA para tratamento de câncer de pulmão, o efeito de impedimento estérico previne a maturação de Ostwald por impossibilitar a aproximação das partículas, já que os polímeros formam uma exoproteção à nanopartícula.

O potencial de superfície das nanopartículas favorece sua endocitose em sistemas biológicos por diversas vias^{102, 103} e fisicamente mantém o sistema estável por repulsão eletrostática, as nanopartículas produzidas apresentaram potencial Zeta negativos. O potencial de superfície das nanopartículas contendo PVM/MA pode ser atribuído a presença de grupamentos carboxilatos em sua superfície, já que o crosslinking entre as fitas de polímero e o 2SS não é estequiométrica, as porções de polímero que não foram funcionalizados, na presença de água sofre hidrólise dos grupamentos anidrido, como demonstrado na figura 13 e por I. Atodiresei,¹⁰⁴ que demonstra inúmeras reações de abertura de anéis anidridos, gerando extremidades carboxiladas, e decorrente disso, os grupamentos ácidos possuem pKa em torno de 4, sua forma majoritária no sistema biológico é desprotonada, levando em consideração que o meio de suspensão possui pH em torno de 5.5.

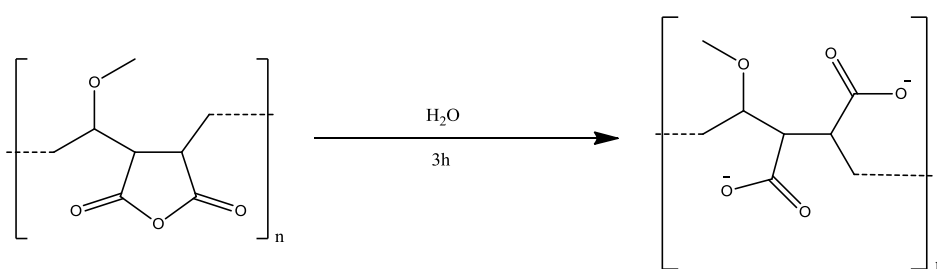


Figura 13. Representação esquemática da hidrólise dos grupamentos anidrido presentes no polímero PVM/MA.

6.1.2. Análise de morfologia por microscopia eletrônica

O polímero PVM/MA que em sua forma inicial é hidrofóbico devido a presença de seus grupos anídrido simétricos, que diminui a polaridade total da molécula, em poucas horas de exposição à água se torna hidrofílico pelo efeito de hidrólise. A aplicação do polímero PVM/MA como carregador nanoestruturado seria inviável em sua forma pura, devido a sua estabilidade. Porém, no sistema desenvolvido, os grupamentos anídridos são reagidos com 2SS, onde as aminas aromáticas do ligante 2SS realizam um processo semelhante ao da água, atacando os grupos anídridos, gerando uma extremidade amida e outra ácida, estabilizando as fitas poliméricas.¹⁰⁴ Tal processo é denominado *crosslinking*, pois mantém as fitas poliméricas unidas, como uma rede de pesca, de tal forma que a água não acessa o núcleo da nanopartícula, mantendo assim o polímero em sua forma inicial por tempo indefinido.

A avaliação de morfologia realizada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) demonstrou partículas esféricas de superfície rugosas. Também, como demonstrado na seção 6.1.1, pelo experimento de DLS, as partículas possuem baixo índice de polidispersão, o que foi comprovado na figura 14 (a), (b) e (c). De acordo com o gráfico de frequência de distribuição, há grande correlação com o prévio experimento demonstrado por DLS, que indica um sistema de alta estabilidade devido a seu baixo PDI, já que em um sistema homogêneo a taxa de aglomeração entre nanopartículas de diferentes tamanhos é diminuída fazendo com que o processo de floculação do sistema seja quase inexistente.

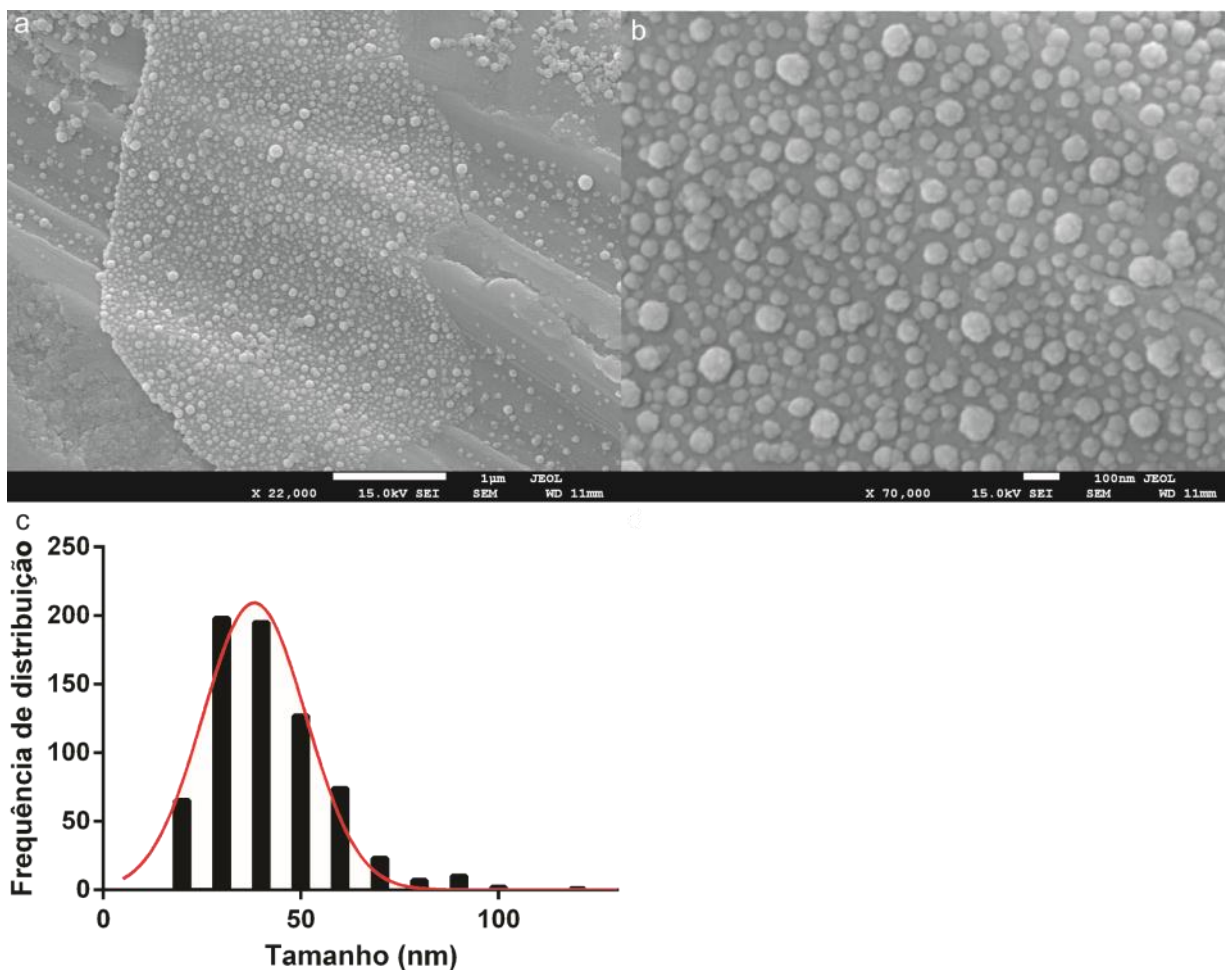


Figura 14. Avaliação da morfologia superficial das nanopartículas LSN por microscopia eletrônica de varredura (MEV), (a) e (b). Imagens com diferentes aproximações. (c) Frequência de distribuição em função dos tamanhos das nanopartículas LSN.

Além da análise de morfologia superficial, as nanopartículas LSN foram estudadas por microscopia eletrônica de transmissão (TEM), a fim de se verificar o aspecto de seus núcleos e sua distribuição de diâmetros (figura 15). De forma semelhante, foram obtidos resultados de PDI e diâmetro que corroboram os experimentos anteriores, apresentando baixa polidispersão e tamanhos próximos a 50 nm. A discrepância de tamanhos entre o experimento de microscopia e o experimento de DLS se dá por influência do meio, tal que as camadas de solvatação decorrentes da ordenação do solvente ao redor da nanopartícula em um sistema aquoso, influencia na difração da luz sobre a amostra, tendo como consequência um aumento no diâmetro estimado para a nanopartícula. Enquanto que através da microscopia, é visível apenas as nanopartículas secas, tendo seu diâmetro estimado através de medidas manuais utilizando o programa ImageJ.

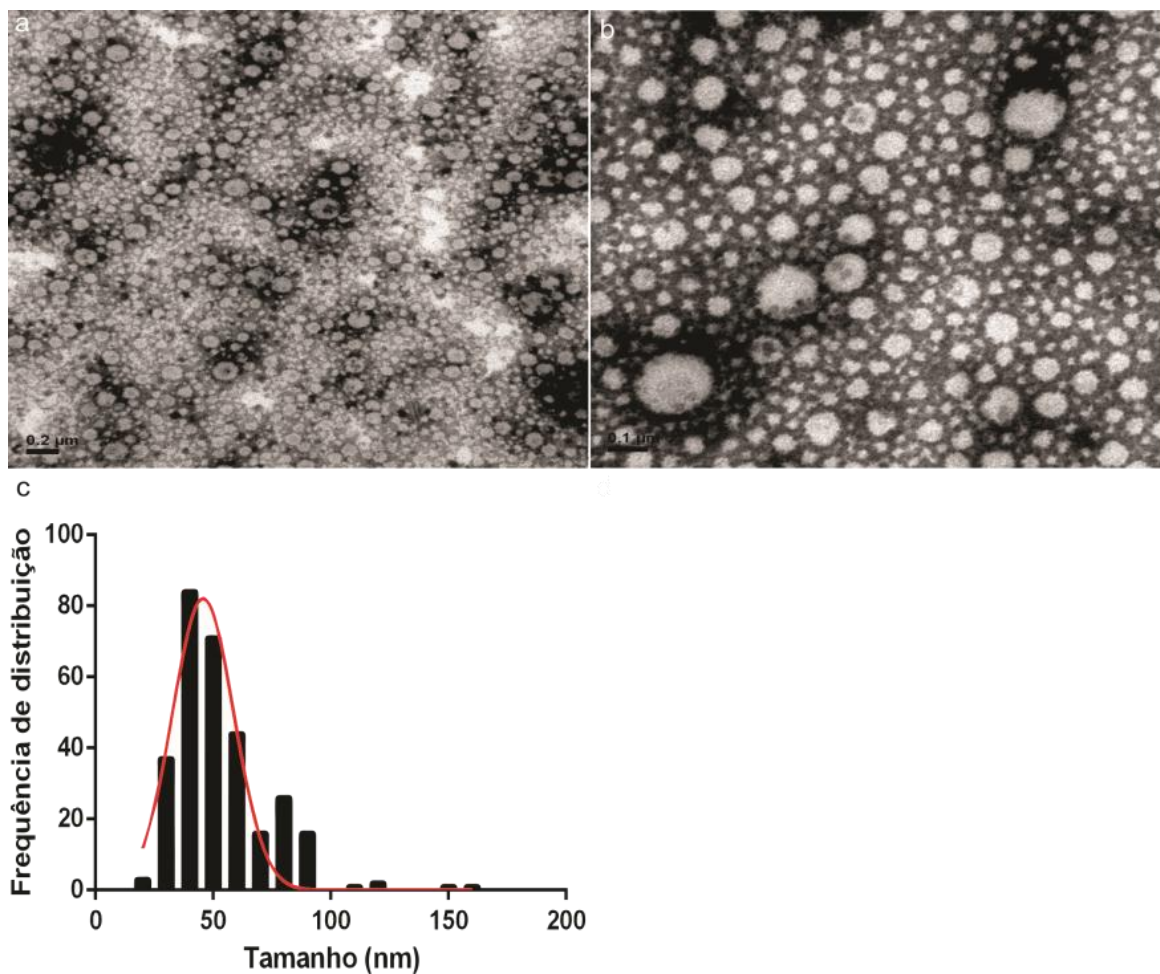


Figura 15. Avaliação da morfologia superficial das nanopartículas LSN por microscopia eletrônica de transmissão (MET), (a) e (b). Imagens com diferentes magnificações; (c). Frequência de distribuição em função dos tamanhos das nanopartículas LSN.

6.1.3. Espectroscopia de Infravermelho (FTIR).

O polímero PVM/MA possui características muito peculiares devido a presença dos grupamentos funcionais anídrido, conferindo assim ao polímero grande elasticidade química, podendo ser facilmente modificado. Através da análise de FTIR é possível inferir sobre algumas mudanças superficiais realizadas no polímero, como demonstrado na figura 16.

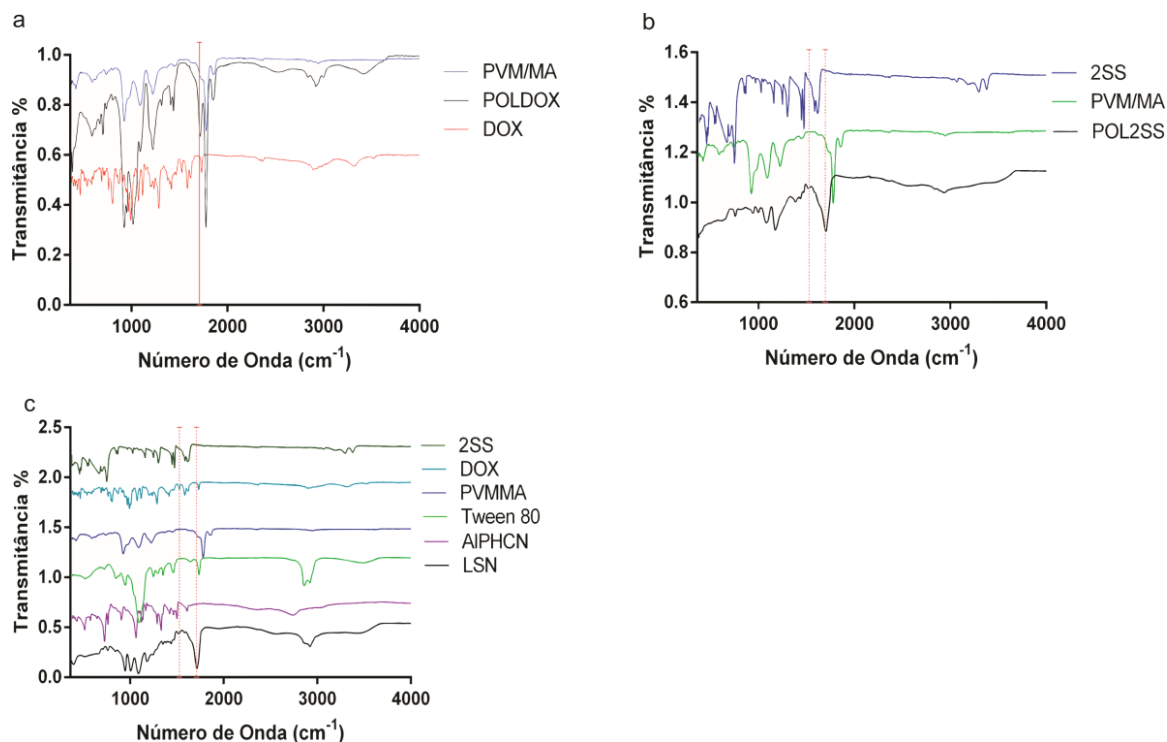


Figura 16. Espectro de transmitância no infravermelho (FTIR) dos componentes presentes na nanopartícula polimérica LSN. (a). Espectro dos controles e do produto de reação entre o polímero PVM/MA e a DOX (POLDOX); (b). Espectro dos controles e do produto de reação entre o polímero PVM/MA e 2-aminofenil disulfeto (POL2SS); (c) Espectro da nanopartícula (LSN) e controles.

A estrutura química das nanopartículas foi investigada por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR). No espectro de FTIR, figura 16 (a), pode-se notar um grande aumento da intensidade do pico presente em 3614 cm^{-1} , que ocorre após a reação entre o polímero PVM/MA e a DOX. Tal incremento pode ser atribuído aos grupamentos hidroxil (-OH) derivados da abertura dos anéis anidrido presentes no polímero, o que acontece devido ao ataque nucleofílico da DOX ao polímero, dando origem a dois novos grupos funcionais, um ácido carboxílico e uma amida. O que indica a formação desses grupamentos funcionais distintos é o pico presente no deslocamento de onda de 1713 cm^{-1} , representando pelo grid em vermelho, que é característico da flexão no plano do grupamento carbonila do grupo funcional amida, corroborando com o aumento do pico em 3614 cm^{-1} .

Após a reação de 2SS com o polímero PVM/MA, Figura 16 (b), pode ser observada uma elevação na linha de base em 3614 cm^{-1} , da mesma forma como ocorreu na figura 16 (a). O ataque nucleofílico do 2SS aos grupamentos anidridos do polímero PVM/MA dão origem a dois grupamentos funcionais distintos, uma amida e um ácido carboxílico, representado pela figura 17. Tal evidência fica clara ao observar o deslocamento de onda presente em 1700 cm^{-1} , associado ao grid em vermelho, sendo referente a uma flexão no plano do grupamento carbonila do grupo

funcional amida, confirmando que o *crosslinking* ocorreu no polímero, o que confere estabilidade às nanopartículas em meios aquosos. A Figura 16 (a) e (b) confirmam a competição entre DOX e 2SS nos ciclos anidridos presentes no polímero PVM/MA. Finalmente, o sistema completo (LSN) mostra uma união de espectros envolvendo os estudados previamente (Figura 16.c).

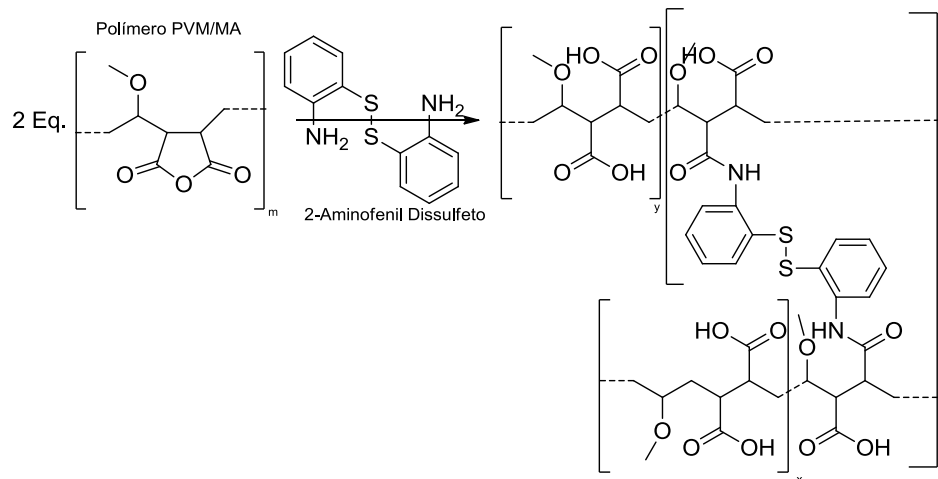


Figura 17. Representação da estrutura esperada para o cross linking entre o polímero PVM/MA e o 2-Aminofenil dissulfeto.

A presença da DOX pode ser um inconveniente ao sistema, já que ela também apresenta um grupamento amino livre, podendo se associar ao polímero como faz o 2SS, contudo, o efeito dos grupos amina presentes no 2SS se sobressaem em questão de reatividade, já que o anel aromático nesse sistema é um forte doador eletrônico, por sua alta densidade eletrônica que é intensificada por efeito do enxofre, podendo aumentar a disponibilidade do par de elétrons livres da amina, tornando-a mais reativa. Dessa forma, a representação hipotética mais aceita para essa superfície é expressa pela representação da4 figura 18.

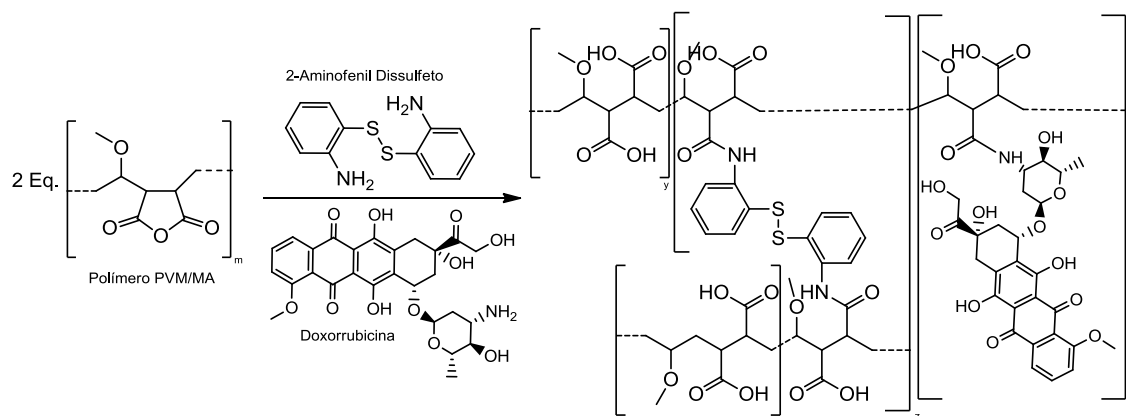


Figura 18. Representação da estrutura esperada para a mistura do polímero PVM/MA com o 2-Aminofenil dissulfeto e o fármaco Doxorubicina.

6.1.4. Prova de conceito; Avaliação da taxa de liberação do corante IR-780

Testes de eficácia de liberação foram realizadas a fim de se determinar a eficiência da fotoativação sobre o sistema. Para prova de conceito, realizou-se um ensaio substituindo a DOX por um corante, IR-780, já que não é possível atingir 100% de liberação da concentração teórica com o fármaco doxorrubicina, pois grande parte dele reage de forma covalente ao polímero, como averiguado pelo experimento de FTIR descrito na sessão 6.1.3. A ligação covalente entre o fármaco e o polímero é extremamente estável, dentre os grupos funcionais orgânicos, a ordem de energia decai de acordo com a figura 19, onde o grupamento cloreto de acila possui maior energia e o grupamento amida possui menor. Esse fato se dá pela alta disponibilidade do par de elétrons presentes nas aminas, que por ressonância estabiliza o carbono da carbonila, diminuindo sua necessidade eletrônica e conseqüentemente, evitando qualquer interação com as EROs formadas após a irradiação. Por essa razão, foi avaliado o perfil de liberação do corante das nanopartículas NPD (nanopartículas polimérica associada ao 2SS contendo a sonda corante IR-780) por diálise acompanhada por Espectrofotometria básica, UV-VIS, antes e após irradiação, utilizando o corante em sua forma livre como controle de diálise.

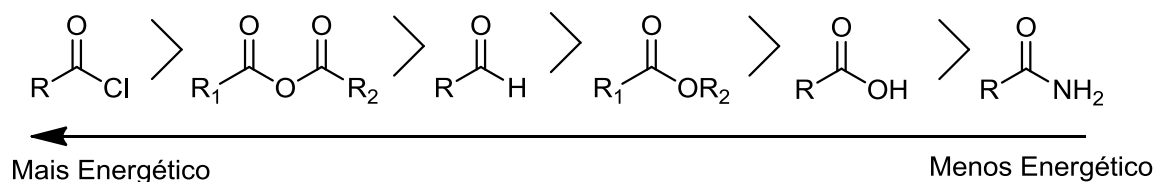


Figura 19. Representação energética de grupamentos carbonila.

A figura 20 demonstra a taxa de liberação por espectrofotometria de UV-VIS do corante na nanopartícula NPDIRR após a irradiação por 50 minutos, 5,0 cm de distância, comprimento de onda de 660 nm de excitação, potência de 198,23 mW/cm² e Fluência de 594,68 J/cm², comparado ao sistema não irradiado, NPD. O máximo foi atingido 24 horas após a irradiação do sistema. Após a irradiação houve um aumento considerável na taxa de liberação do corante, sendo esse aumento 1,5 vezes maior na taxa de liberação do sistema irradiado, em comparação com o não irradiado.

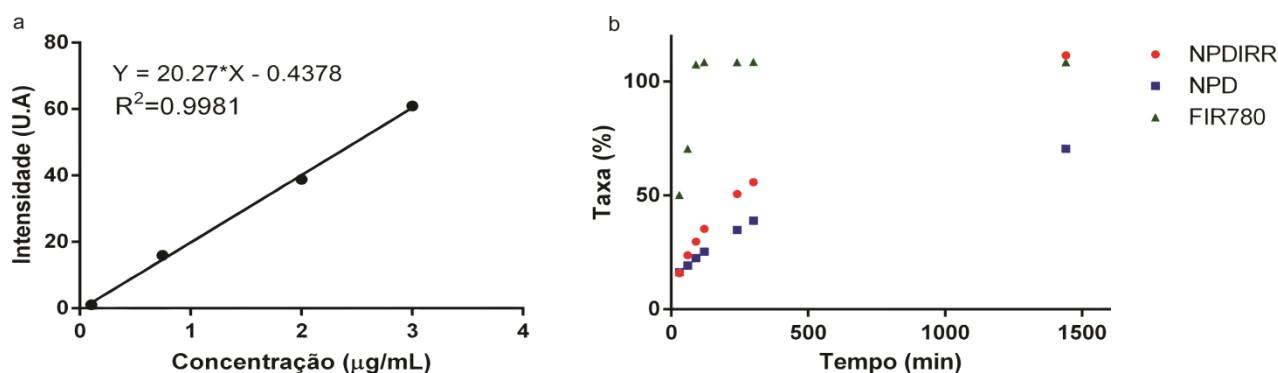


Figura 20. Espectrofotometria de UV-VIS para avaliação de taxa de liberação por diálise do corante IR-780 das nanopartículas; (a). Curva de calibração utilizando o padrão IR-780; (b). Perfil de liberação do controle, FIR780, puro; da nanopartícula não irradiada, NPD e da nanopartícula irradiada, NPDIRR, 5,0 cm de distância, comprimento de onda de 660 nm de excitação, Potência de 198,23 mW/cm² e Fluência de 594,68 J/cm².

6.1.5. Perfil de liberação da doxorubicina

A avaliação da liberação de DOX foi feita pelo método de HPLC tal que diversas condições foram avaliadas utilizando o sistema nanoestruturado LSN, como demonstrado na figura 21. Comparando os perfis de liberação da DOX livre (FDOX), figura 21 (b), e da DOX encapsulada (LSN), figura 21 (c), é evidente que a nanopartícula é capaz de reter a DOX por um tempo muito maior, tal que no tempo de 90 minutos, 100% da concentração teórica da DOX livre (FDOX) já foram liberados, enquanto no mesmo intervalo de tempo, o sistema LSN liberou apenas 8.3% de sua quantidade de DOX total.

Como esperado, grande parte da DOX se associou ao polímero, pois ao se analisar os perfis de liberação apenas 50% da concentração total de DOX é liberada tanto para o sistema controle, POLDOX, quanto para o sistema irradiado LSNIRR. Comparando os dois sistemas, há uma perda de 5% na concentração de DOX para o sistema irradiado, como demonstrado pela figura 21 (c), isso possivelmente se deve ao fato da sensibilidade da DOX às EROs, o que é expresso pela figura 21 (e), onde temos a taxa de decaimento da fluorescência da DOX na presença de EROs, possivelmente por efeito degradativo.

A diferença entre as concentrações de DOX pode ser atribuída a fração de DOX que não foi encapsulada, já que a nanopartícula protege o fármaco de qualquer efeito externo, como também explorado por S. Sahoo e colaboradores,¹⁰⁵ no caso do sistema descrito nesse projeto, uma vez que os anéis aromáticos que fazem parte do *crosslinking* são muito mais ativos contra as EROs que a própria DOX, a protegendo. Comparando os sistemas irradiado e não irradiado, no sistema não irradiado, houve a liberação de apenas 23,7% em 24 horas de diálise, enquanto no sistema irradiado houve a liberação de 42.3% da concentração total de DOX no mesmo intervalo

de tempo, tal resultado assemelha-se ao obtido na prova de conceito de liberação, figura 20 (b), contudo, em uma menor proporção devido a interação covalente da DOX com o polímero PVM/MA.

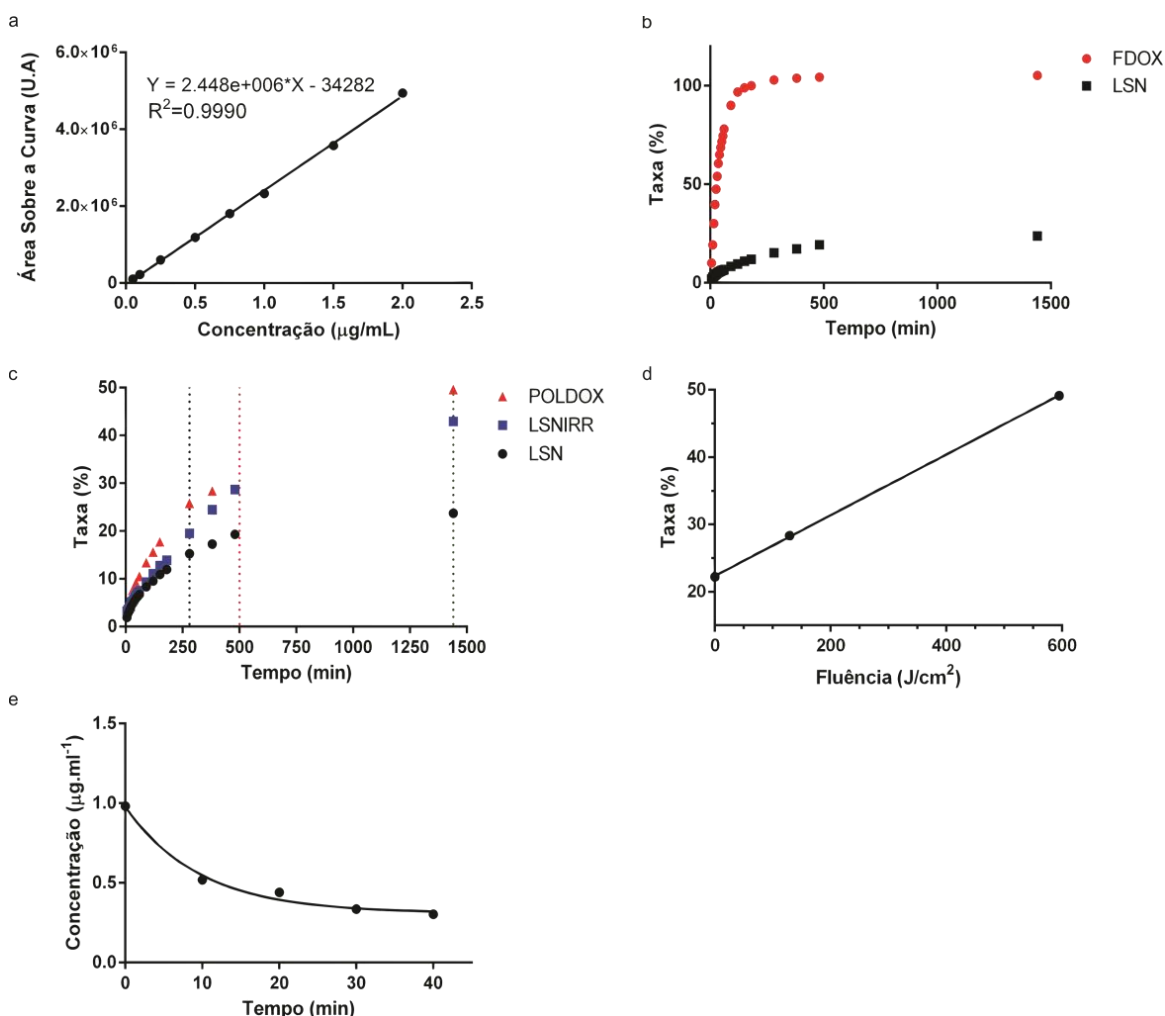


Figura 21. Avaliação da taxa de liberação da DOX por HPLC nas condições de (a). Curva padrão de calibração; (b). DOX livre comparado com a nanopartículas LSN na ausência de irradiação; (c). Comparação entre POLDOX, LSN sob irradiação (potência de 198,23 mW/cm^2 e fluência de 594,68 J/cm^2) e LSN não irradiada; (d). Relação entre fluência e taxa de liberação de DOX; (e). Taxa de degradação da DOX livre na presença de EROs.

Os parâmetros utilizados para avaliar a taxa de liberação não foram compatíveis com os estudos *in vitro* já que as células estão totalmente expostas, o que aumenta de forma extrema sua sensibilidade a EROs, então foi necessária a diminuição na concentração de AIPHEN e no tempo de irradiação, dessa forma o experimento representado pela figura 21 (d) demonstra a forma pela qual a taxa de liberação decai com a diminuição da fluência aplicada no sistema, pode-se concluir que o efeito sobre a taxa de liberação é imenso, contudo, ainda é possível relacionar um ponto aditivo entre a TFD e a liberação fotoativada de DOX *in vitro*, como foi visto pelos experimentos em duas linhagens de células cancerosas

Através dos dados obtidos pelo experimento de espectrometria de massas, comparados com a avaliação do perfil de liberação das estruturas, é possível propor um modelo de liberação para esse tipo de sistema. Inicialmente, a nanopartícula se comporta como uma massa sólida, impermeável, tal que em sua superfície são encontrados massas poliméricas trançadas e fixas, devido a ação do ligante 2SS junto ao agente FS. No momento da irradiação, possivelmente começam a ocorrer pequenas fraturas na matriz sólida, devido ao rompimento das pontes dissulfeto que compõe o *crosslinking* entre as fitas poliméricas. Tais rupturas permitem que a água acesse as camadas interiores do polímero, que até então eram formadas por grupamentos anidridos intactos. Com a aproximação das moléculas de água, ocorre hidrólise parcial do núcleo, o que causa aumento significativo na taxa de liberação do fármaco, que é demonstrado pelo experimento de HPLC. Como demonstrado por espectrometria de massas e estudos literários, descrito por E. Clennan ¹⁰⁶, nem todas as moléculas do agentes ligantes 2SS que está associadas as fitas poliméricas irão se comportar de modo semelhante perante as EROs, parte das moléculas sofrerão apenas oxidação do enxofre, como demonstrado também pela figura 10 e parte irá sofrer redução, como evidenciado por espectrometria de massas. Assim, as camadas que sofreram apenas oxidação, se mantêm intactas e ainda agem no crosslinking das fitas poliméricas. As rupturas fazem parte da porcentagem de ligantes 2SS que foram clivadas, aumentando a taxa de liberação do fármaco, como evidenciado por HPCL. Tal hipótese está representada pela figura 22.

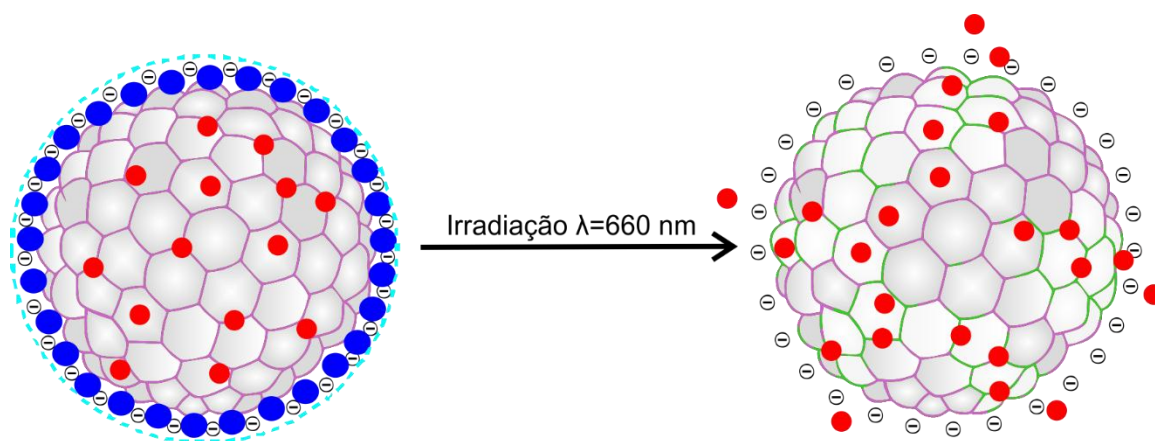


Figura 22. Hipótese de ruptura da superfície das nanopartículas após a irradiação em λ igual a 660 nm.

6.1.6. Análise de subprodutos de degradação por Ultra Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada ao Espectrômetro de Massas - UHPLC-MS/MS

Inicialmente, pensava-se sobre as espécies que são formadas no meio reacional, se o efeito de clivagem da nanopartícula ocorre de forma radicalar, envolvendo estados tensos de excitação do oxigênio, ou se tal efeito é devido a interação planar entre o oxigênio e os enxofres

de forma direta, através de espécies de oxigênio relaxadas, como demonstrado pela distribuição de elétrons nos orbitais moleculares de oxigênio molecular na figura 24. O processo mecânico começou a ser traçado, visando as possíveis espécies radiculares. Como demonstrado por J. Maccallum ¹⁰⁷, inúmeras espécies são possíveis de existir no meio reacional após irradiação na presença de um agente FS, tais como radicais oxigênio, oxigênio singlete e óxidos nítricos, nesse sentido, as investigações mecânicas foram melhor interpretadas através do experimento de espectrometria de massas.

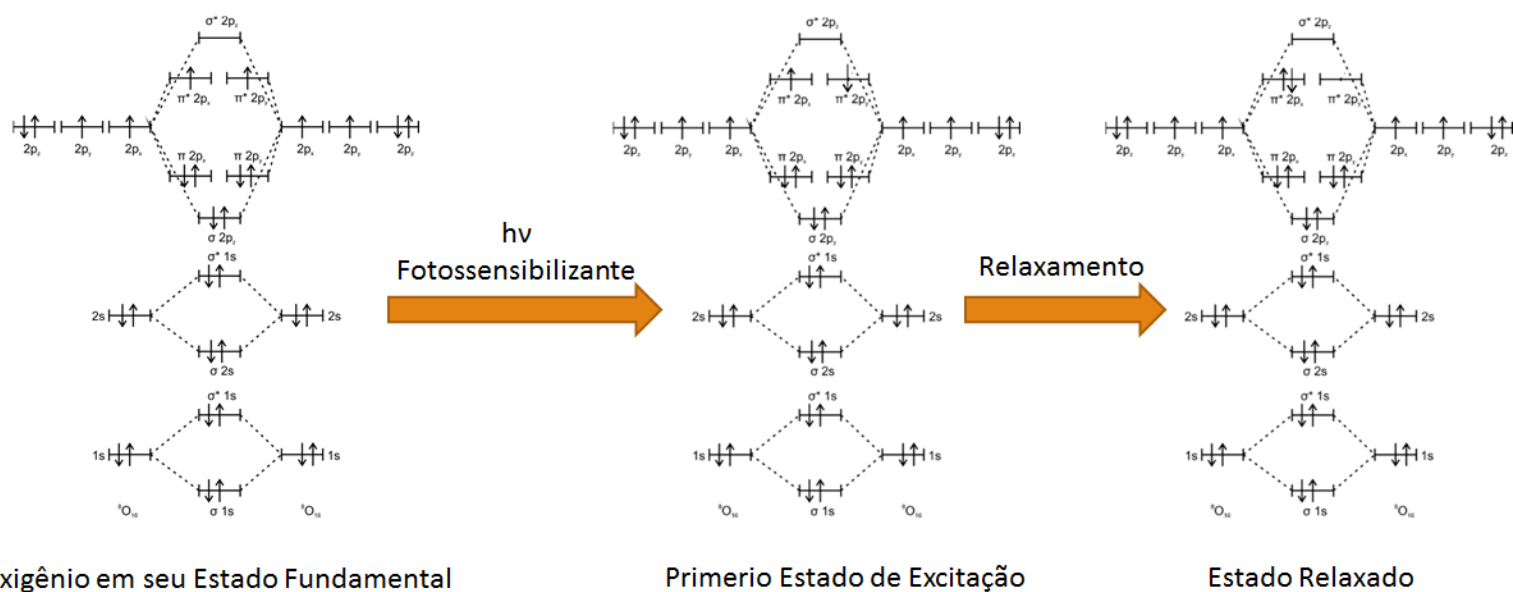


Figura 23. Estados de excitação do oxigênio molecular após a irradiação na presença de um agente fotossensibilizante.

É esperado uma clivagem redutiva no dissulfeto, já que quimicamente, o enxofre é um átomo muito volumoso e com alta densidade eletrônica, capaz receber elétrons em seus orbitais moleculares d vazios. No grupo funcional dissulfeto estão presentes um par de enxofres muito próximos, o que certamente gera uma tensão imensa por repulsão eletrônica, facilitando a clivagem específica nessa região.

A análise por espectrometria de massas demonstra um aumento na proporção entre alguns produtos. Na figura 24 (a) é mostrado o resultado obtido para o padrão 2SS não irradiado, com o íon molecular referente ao 2SS é observado em m/z de 249.0517 Da. Na figura 24 (b), chama a atenção a grande diminuição entre as proporções dos picos m/z 126.0375 Da e 124.0219 Da, o que demonstra que após a irradiação, uma maior concentração do produto m/z 126,0375 Da foi formado.

Para determinar a possível fórmula do produto formado, a técnica TOF-MSMS foi aplicada para essa massa, tendo como resultado o espectro da figura 24 (c) e que está interpretado na figura 25.

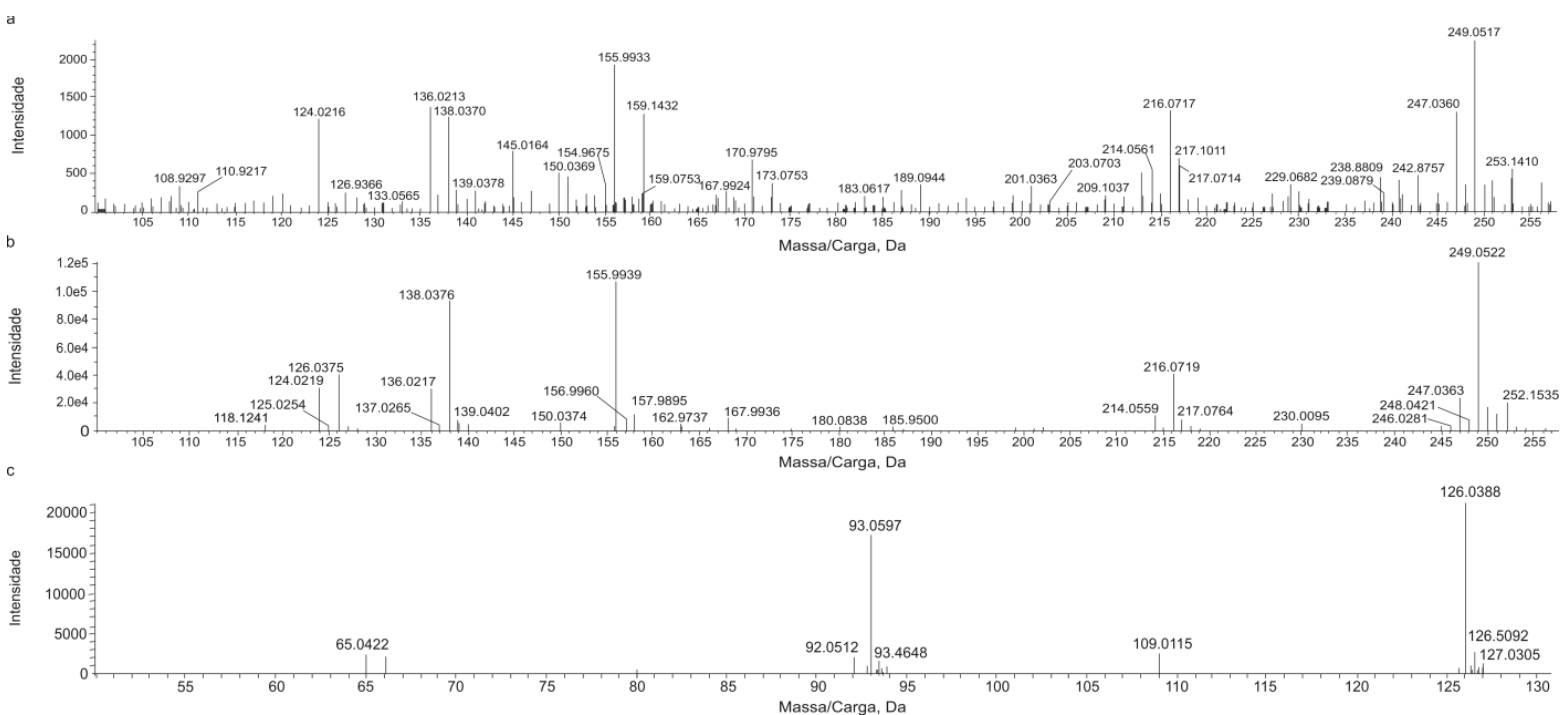


Figura 24. Espectro de massas por time of flight (TOF-MS) de (a) Padrão 2-aminofenil dissulfeto; (b) 2-aminofenil dissulfeto irradiado (potência de 198,23 mW/cm² e fluência de 594,68 J/cm²); (c) Espectro de fragmentação TOF-MSMS do pico m/z 126.0375 Da.

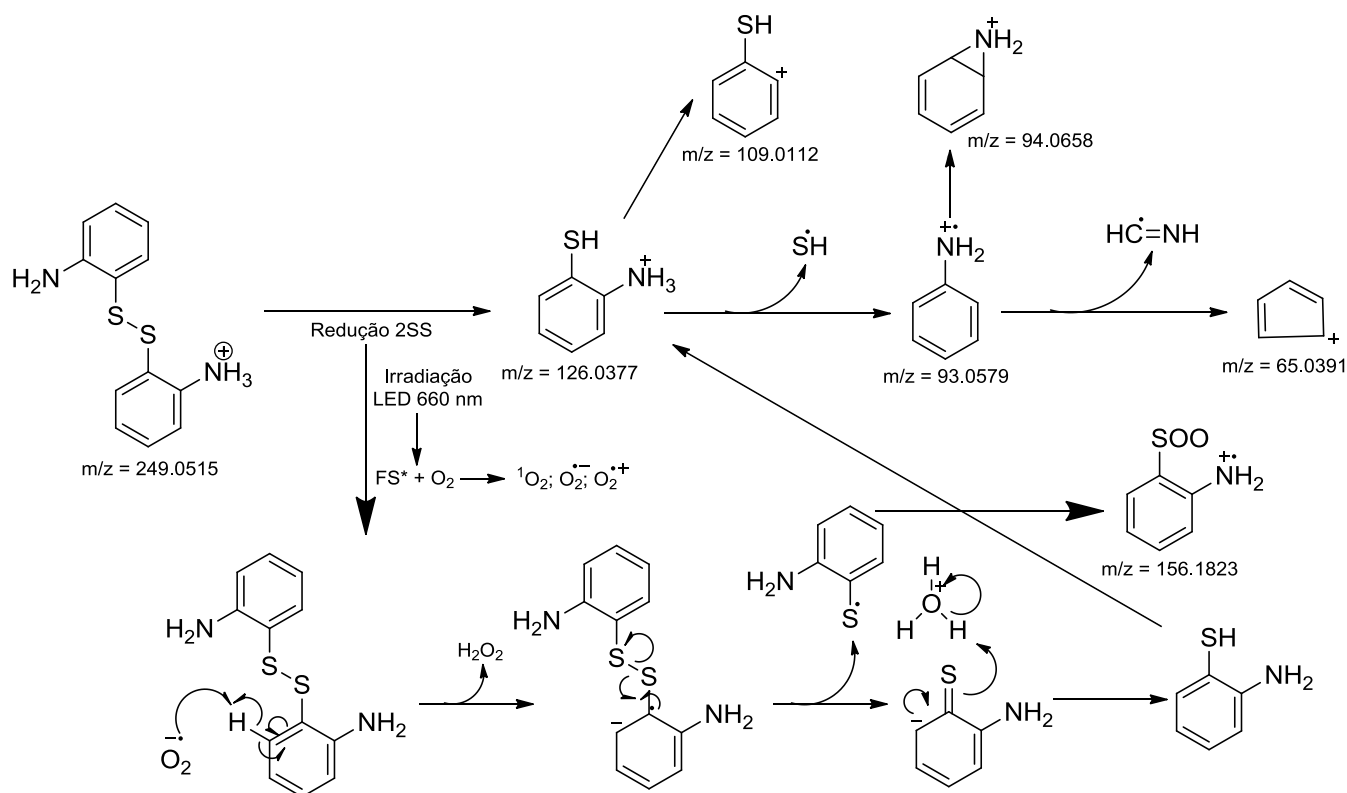


Figura 25. Proposta mecanística para degradação fotoativada do 2-aminofenil dissulfeto suportada pelo experimento de EPR e TOF-MSMS.

Na figura 25, está representada uma proposta mecanística para a formação de produtos de clivagem do 2SS, que demonstra a formação de espécies radiculares após a irradiação¹⁰⁸ O efeito redutivo pode se dar através da ressonância radicalar, tal que o radical aromático formado é doado para o orbital d do enxofre, gerando uma forma de alta energia, que rouba um elétron da ligação dissulfeto, eliminando a forma reduzida do agente 2SS. A hipótese de ressonância radicalar em sistemas aromáticos foi calculada e estudada através de estados energia por A. Arts,¹⁰⁹ corroborando a proposta mecanística apresentada na figura 25.

Após a eliminação, ocorre o restabelecimento da aromaticidade do anel. A proposta mecanística sugere uma eliminação de organo enxofre, formando assim o produto m/z de 126.0388, que tem sua proposta estrutural suportada pelo experimento de TOF-MSMS dando origem aos picos de m/z 109.0115 Da; 93.0597 Da e 65.0422 Da, podendo explicar a diminuição na proporção entre os picos m/z 126.0375 Da e 124.0219 Da demonstrado nas figuras 25 (a) e (b).

Outro pico característico observado no espectro de massas está localizado em m/z 138.0382 Da, figura 26, esse pico é interessante pois sua origem se assemelha a formação de óxido nítrico mediado pela enzima óxido nítrico sintase que oxida a L-arginina para L-citrolina.¹¹⁰

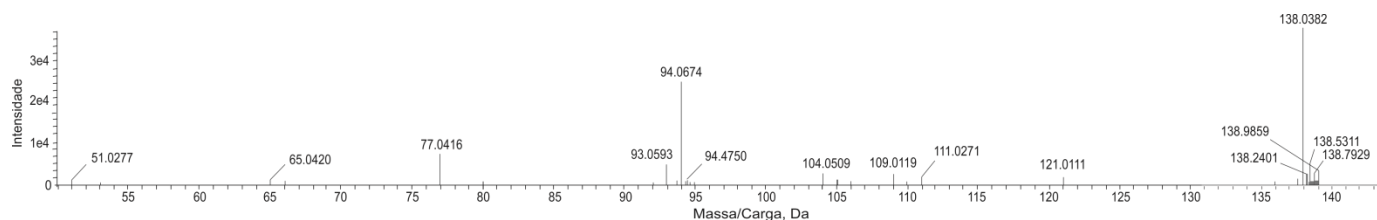


Figura 26. Espectro de fragmentação TOF-MSMS do pico m/z 138.0382 Da.

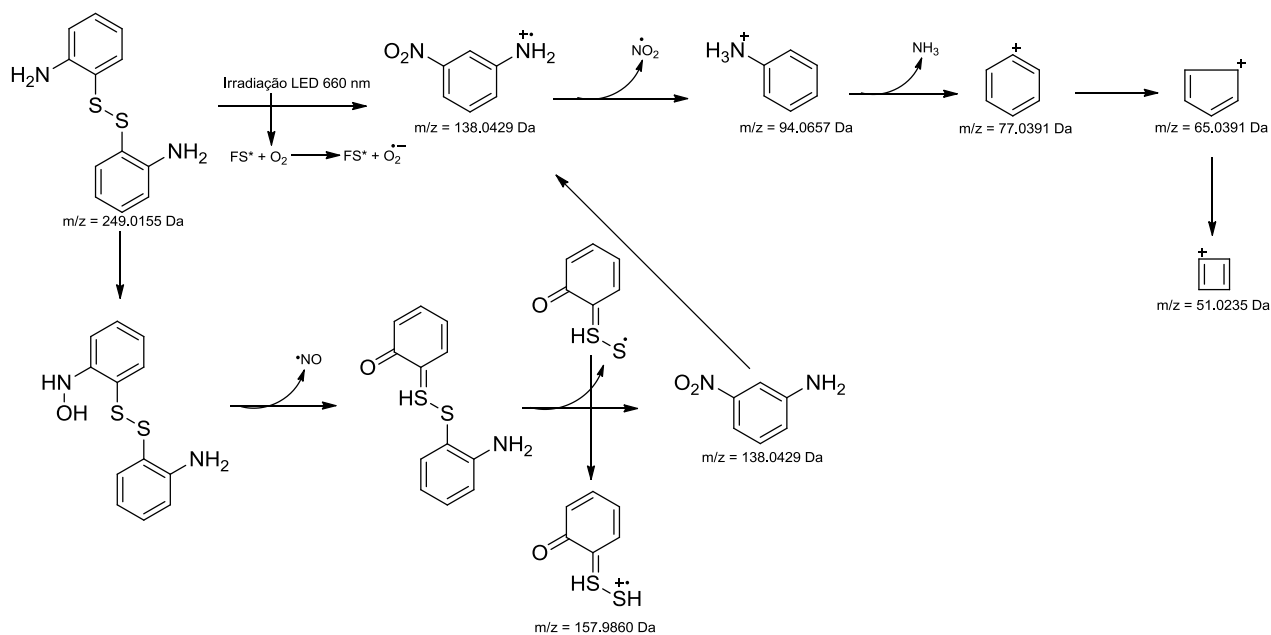


Figura 27. Proposta mecanística alternativa para formação de um segundo produto de degradação fotoativada do 2-aminofenil dissulfeto suportada pelo experimento de EPR e TOF-MSMS.

De forma semelhante, o oxianion radicalar formado por transferência de energia oxida o nitrogênio do 2SS liberando óxido nítrico radicalar e formando uma espécie oxidada do anel aromático. O óxido nítrico liberado ataca novamente o anel aromático não oxidado causando a eliminação radicalar do dissulfeto, tal mecanismo é evidenciado pela fragmentação do pico m/z 138.0382 Da, pois há uma perda do grupo dióxido de nitrogênio (NO_2) dando origem ao m/z 94.0674 Da seguido pela perda de amônia (NH_3) dando origem ao m/z 77.0416 Da, como representado esquematicamente pela figura 27. É possível inferir sobre a ocorrência de duas formas simultâneas de clivagem no sistema, sendo a representação da figura 25 possivelmente a via principal pela qual ocorre a clivagem, apesar que por comparação de proporção entre os picos m/z 126.0375 Da e 138.0382 Da, a maior taxa é representada por 138.0382 Da, ao reagir o 2SS com as fitas poliméricas, a porção amina do agente crosslinking é inativada, inibindo a via representada pela figura 27.

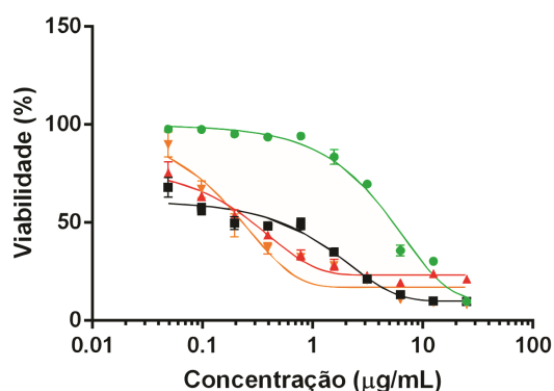
6.2. AVALIAÇÃO *IN VITRO*

6.2.1. Avaliação de viabilidade celular

Os estudos *In vitro* demonstraram alta toxicidade para a nanopartícula NFTCIRR, que continha concentração muito baixa de ALPHCN, pode-se especular que o motivo pelo grande aumento na citotoxicidade das nanopartículas irradiadas contendo apenas ALPHCN deve-se ao fato da produção de diversos tipos de radicais *in situ*, muitos deles desconhecidos pelos sistemas de defesa da célula, como os radicais de enxofre e aromáticos.

Na linhagem de células cancerosas 4T1, houve redução estatisticamente significativa da viabilidade celular 24 h após o tratamento com LSN ($p < 0,04$). Para as nanopartículas controle contendo DOX ($p < 0,02$) e para FDOX ($p < 0,0002$), figura 28 (a), foi observada redução significativa de viabilidade das células 4T1, em concentrações a partir de 50 ng/mL de DOX, em comparação com a nanopartícula controle, representado por Branca. Houve toxicidade, significativa para a nanopartícula branca em concentrações a partir de 1,0 $\mu\text{g/mL}$. Estudos demonstram que o polímero PVM/MA é biocompatível e não tóxico⁹⁴ e, dessa forma, é possível que a toxicidade seja relacionada à presença do 2SS. Para os tratamentos demonstrados na figura 28 (b), os controles positivos e negativos foram representados por NFTCIRR ($p < 0,0008$) e LSN ($p < 0,0001$) e NFTC ($p < 0,02$) respectivamente, tal que o efeito aditivo existente entre a DOX e o agente FS é evidenciado estatisticamente, sendo significativamente superior, causando maior redução na viabilidade celular pela nanopartícula LSNIRR, com o ápice de sinergismo em 1,7 $\mu\text{g/mL}$ de DOX e 0.6 nM de ALPHCN após irradiação por 15 minutos LED 660 nm. Os valores de IC50 para LSN, NFTCIRR e LSNIRR são respectivamente 0,456; 1.330 e 0.539 $\mu\text{g/mL}$ de DOX.

a



b

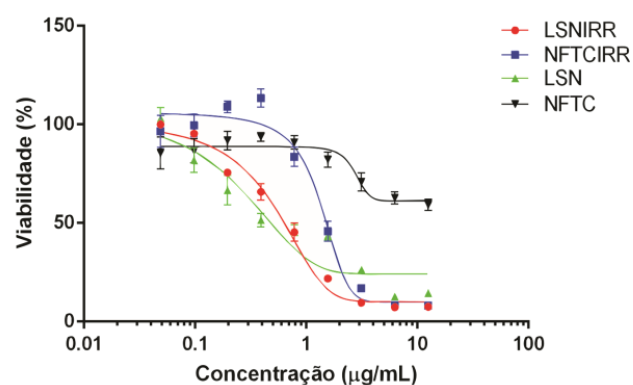
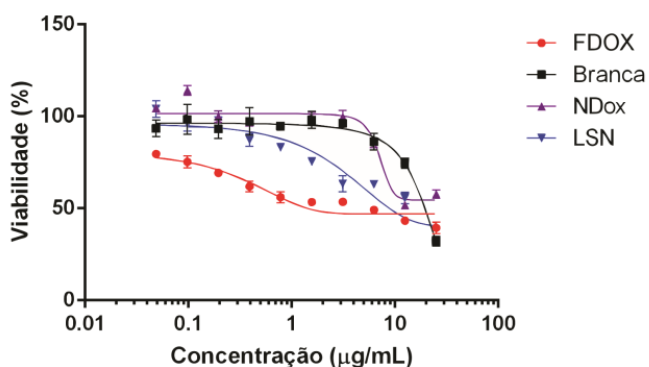


Figura 28. Viabilidade de células 4T1. (a) Viabilidade das células após tratamento com controles contendo apenas polímero PVM/MA conjugado a 2SS (Branca); DOX livre (FDOX); Nanopartículas de PVM/MA contendo apenas DOX (NDOX) e nanopartículas poliméricas contendo cloreto de alumínio ftalocianina e DOX (LSN); (b). Avaliação de viabilidade dos tratamentos não irradiados, nanopartículas poliméricas contendo DOX e cloreto de alumínio ftalocianina (LSN) e nanopartículas contendo apenas cloreto de alumínio ftalocianina (NFTC) e avaliação de

viabilidade de nanopartículas sob irradiação (15 minutos LED 660 nm; Potência de 202,91 mW/cm²; distância de 5 cm; Fluência de 185,57 J/cm²), das nanopartículas poliméricas contendo apenas cloreto de alumínio ftalocianina (NFTCIRR) e das nanopartículas poliméricas contendo DOX e AIPHCN (LSNIRR).

Para a linhagem MCF-7, figura 29 (a), os efeitos de redução da viabilidade celular pelos controles não foram tão drásticos em comparação com a linhagem 4T1. Tal que a DOX livre (FDOX) não houve significância estatística ($p < 0,06$). O controle de nanopartículas, representado por Branca, se mostrou menos tóxico ($p < 0,001$), apresentando redução na viabilidade celular apenas nas concentrações acima de 4,79 µg/mL. A nanopartícula LSN apresentou significativa redução na viabilidade celular ($p < 0,01$). Já nos tratamentos representados na figura 29 (b), o controle de AIPHCN não demonstrou toxicidade alguma na ausência de irradiação ($p < 0,06$), contudo, quando irradiada, NFTCIRR, o efeito citotóxico é bem evidente. Apesar de o tratamento com NFTCIRR ($p < 0,0001$) e LSN ($p < 0,0002$) serem citotóxicos, o efeito aditivo é estatisticamente superior após o tratamento representado por LSNIRR ($p < 0,0001$), tal que na concentração de 1,56 µg/mL de DOX e 0,6 nM de AIPHCN foi observado o ápice de citotoxicidade em células MCF-7. Os valores de IC50 para NFTCIRR, LSN e LSNIRR foram de 0,90 nM de AIPHCN), 8,84 µg DOX/mL e 0.950 µg DOX/mL, respectivamente.

a



b

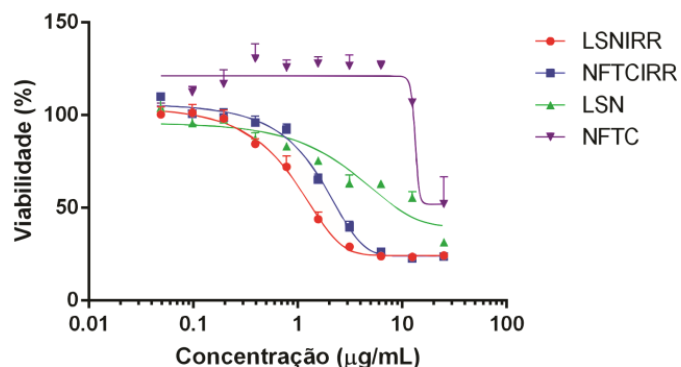


Figura 29. Viabilidade de células MCF-7. (a). Viabilidade das células tratadas com os controles contendo apenas DOX livre (FDOX), PVM/MA conjugado a 2SS (Branca), nanopartículas de PVM/MA contendo apenas DOX (NDOX), ou nanopartículas de PVM/MA contendo cloreto de alumínio ftalocianina e DOX (LSN); (b). Viabilidade das células tratadas com nanopartículas poliméricas contendo DOX e cloreto de alumínio ftalocianina (LSN) e avaliação de viabilidade de nanopartículas sob irradiação (15 minutos LED 660 nm; Potência de 202,91 mW/cm²; distância de 5 cm; Fluência de 185,57 J/cm²), das nanopartículas poliméricas contendo apenas cloreto de alumínio ftalocianina (NFTCIRR) e das nanopartículas poliméricas contendo DOX e cloreto de alumínio ftalocianina (LSNIRR).

Na linhagem NIH-3T3, foi observado que as nanopartículas controle exercem baixa citotoxicidade, conforme demonstrado na figura 30 (a), tal que apenas em concentrações mais altas, a partir de 2,76 µg/mL é evidenciado o efeito citotóxico. Contudo, estatisticamente as

nanopartículas LSN apresentaram $p < 0,07$ indicando irrelevância citotóxica, apenas a nanopartícula NDOX ($p < 0,0009$) apresentou significância em sua citotoxicidade. Ambos os casos foram testados na ausência de irradiação. Para os tratamentos mostrados na figura 30 (b), o efeito aditivo entre a irradiação e a liberação da DOX também foi significativo, para nanopartícula LSNIRR ($p < 0,0001$), tendo seu ápice em 2,48 $\mu\text{g/mL}$ de DOX, tal que em comparação com as outras linhagens, a linhagem NIH-3T3 não é tão sensível ao tratamento quanto as células 4T1. Para os tratamentos, foram calculados os valores de IC50 das nanopartículas NFTCIRR, LSN e LSNIRR de 1,293 $\mu\text{g/mL}$ (equivalente a 0,5 nM de ALPHCN), 2.345 $\mu\text{g/mL}$ e 0,747 $\mu\text{g/mL}$ de DOX.

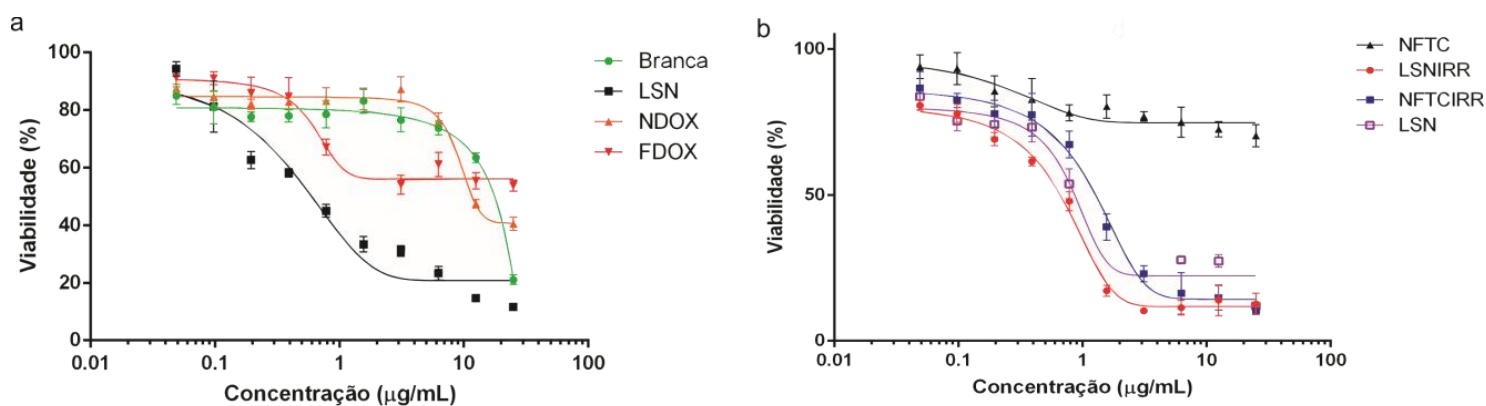


Figura 30. Avaliação de viabilidade celular por MTT da linhagem de células NIH-3T3; (a). Avaliação da viabilidade dos controles contendo apenas polímero PVM/MA conjugado a 2SS (Branca); nanopartículas poliméricas contendo cloreto de alumínio ftalocianina e DOX (LSN); Nanopartículas de PVM/MA contendo apenas DOX (NDOX) e DOX livre (FDOX); (b). Avaliação de viabilidade dos tratamentos não irradiados, nanopartículas poliméricas contendo DOX e cloreto de alumínio ftalocianina (LSN) e nanopartículas contendo apenas cloreto de alumínio ftalocianina (NFTC) e avaliação de viabilidade de nanopartículas sob irradiação (15 minutos LED 660 nm; Potência de 202,91 mW/cm^2 ; distância de 5 cm; Fluência de 185,57 J/cm^2), das nanopartículas poliméricas contendo apenas cloreto de alumínio ftalocianina (NFTCIRR) e das nanopartículas poliméricas contendo DOX e cloreto de alumínio ftalocianina (LSNIRR).

A tabela 2 expressa os valores de IC50 para os tratamentos irradiados. Pela análise de IC50 temos que a linhagem não cancerosa NIH-3T3 é mais sensível ao tratamento com DOX livre (FDOX), contudo, o sistema carregador LSN diminui a citotoxicidade da DOX para linhagem não cancerosa e aumenta consideravelmente a citotoxicidade para linhagem 4T1. A linhagem MCF-7 se apresenta mais resistente às nanopartículas e mais sensível a FDOX. Analisando os sistemas sob irradiação, todas as linhagens se comportam de maneira semelhante quando expostas a NFTCIRR, sendo que a dose de ALPHCN utilizada foi baixa o suficiente para não causar alta inviabilidade celular, contudo, no sistema fotossensível, LSNIRR, após a irradiação houve um alto potencial citotóxico, indicando que há ação aditiva entre os fármacos, e o aumento da difusão da

DOX na nanopartícula tem efeito drástico sobre as linhagens celulares, sendo esse efeito mais evidente sobre a linhagem 4T1.

Tabela 2. IC50 dos tratamentos realizados em células de linhagem cancerosa 4T1 e MCF-7 e célula normal de linhagem NIH-3T3 para o fármaco Doxorubicina livre (FDOX) e nanopartículas LSN; NFTCIRR e LSNIRR contendo DOX e ALPHCN em sistemas irradiados e não irradiados.

Tratamentos	IC50 Linhagens de Células		
	4T1 (µg/mL)	MCF-7 (µg/mL)	NIH-3T3 (µg/mL)
FDOX	1.520	1.540	0.629
LSN	0.456	2.345	2.345
NFTCIRR	1.330	1.683	1.293
LSNIRR	0.539	0.950	0.747

6.2.2. Cinética de interiorização de DOX por citometria de fluxo em células de linhagem cancerosa 4T1

A citometria de fluxo é uma técnica poderosa para avaliação de endocitose celular, e determinação de sua cinética. Foi avaliado o alto poder de endocitose das nanopartículas em comparação com a FDOX, de tal forma que em 30 minutos, 100% das células já apresentam nanopartículas em seu interior, enquanto no mesmo período de tempo, ainda há muitas células que não interiorizaram a FDOX.

Células 4T1 foram submetidas a um experimento de cinética de interiorização, onde as células foram tratadas com as nanopartículas LSN, LSNIRR e FDOX, pelo período de 3 h, 2 h, 1 h, 30 min, 15 min. Os ensaios foram avaliados por citometria de fluxo observando-se a fluorescência da DOX em 575 nm e da ALPHCN em 660 nm. Espera-se que um sistema nanoestruturado, a internalização seja favorecida, já que há interação de cargas entre a nanopartícula e a superfície da célula que favorecem sua internalização, além de que a DOX livre é polar em meio aquoso, já que seu pKa favorece a protonação da molécula, dificultado assim sua difusão pela membrana celular, que é composta essencialmente por fosfolípidos, contendo uma cabeça extremamente polar e caudas hidrofóbicas.

Comparando os histogramas de concentração, fica evidente que a nanopartícula LSN é interiorizada com maior significância que FDOX ($p < 0,02$), representadas pela figura 31 (B) e (A) respectivamente, esse fato pode ser atribuído à carga de superfície da nanopartícula, o que a torna mais suscetível à endocitose. Um teste foi realizado irradiando as nanopartículas antes da exposição *in vitro*, o resultado obtido foi uma diminuição da taxa de internalização, como

demonstrado na figura 32 (E), onde está expresso um gráfico da média geométrica dos histogramas expressos pela figura 32 (A), (B) e (C).

Para determinar a presença da AIPHCN nas células, foi também mensurada a fluorescência da AIPHCN, sendo este experimento representado pela figura 32 (D), de tal forma que é possível ver um aumento gradual de emissão da AIPHCN junto a DOX, comprovando assim a presença de ambos fármacos na célula.

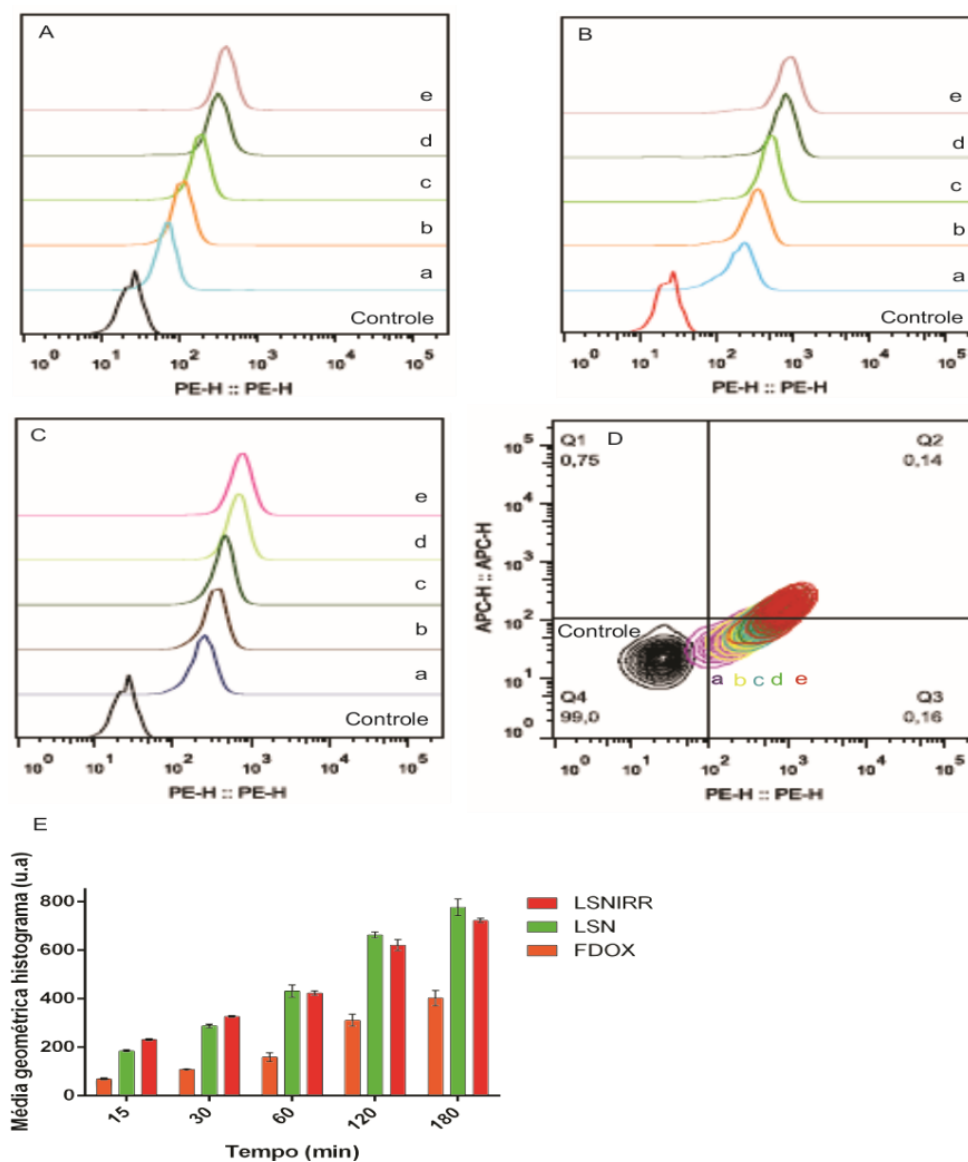


Figura 31. Avaliação de interiorização por citometria de fluxo em células de linhagem 4T1 nos períodos de a) 15 min; b) 30 min; c) 1 h; d) 2 h e e) 3 h; A. Interiorização de DOX livre (FDOX). B. Cinética de interiorização das nanopartículas poliméricas contendo cloreto de alumínio ftalocianina e DOX (LSN) avaliando a fluorescência da DOX. C. Avaliação da interiorização no sistema irradiado (15 minutos LED 660 nm; Potência de 202,91 mW/cm²; distância de 5 cm; Fluência de 185,57 J/cm²) nanopartículas poliméricas contendo DOX e cloreto de alumínio ftalocianina (LSNIRR) avaliando a fluorescência da DOX; D. Relação de fluorescência entre DOX e cloreto de alumínio ftalocianina na cinética de interiorização e E. Média geométrica dos

histogramas de internalização para a DOX livre (FDOX) e nanopartículas antes e após irradiação, LSN e LSNIRR respectivamente.

6.2.3. Avaliação de alteração na morfologia celular por citometria de fluxo após o tratamento em células de linhagem cancerosa 4T1

Estudos mais profundos de alterações morfológicas também foram realizados através da técnica de citometria de fluxo, demonstrando grande deformação celular no tratamento irradiado, LSNIRR, quando comparado aos controles LSN, FDOX e NFTCIRR. A resposta deformativa se deu pela formação de fragmentos celulares pequenos e rugosos.

Após os tratamentos: 1) FDOX; 2) LSN; 3) NFTCIRR; 4) LSNIRR e 5) Controle, a morfologia celular foi avaliada por citometria de fluxo, representado pela figura 33, o controle apresenta-se em uma região de rugosidade e tamanho expressos quase que inteiramente sobre o quadrante Q4, na figura 32 (a). Após a exposição aos tratamentos, é possível ver uma alteração morfológica das células em direção ao quadrante Q1, tanto para o tratamento FDOX quanto para ao tratamento LSN, figuras 32 (b) e (c), o que é esperado, já que não houve irradiação, dessa forma, apenas a DOX tem ação sobre as células.

Já avaliando os sistemas irradiados, figura 32 (d) e (e), temos a ação da NFTCIRR, o qual demonstra um espalhamento no tamanho celular, em direção à origem do gráfico de morfologia, enquanto o tratamento LSNIRR demonstra um espalhamento seguindo os perfis dos controles FDOX e NFTCIRR.

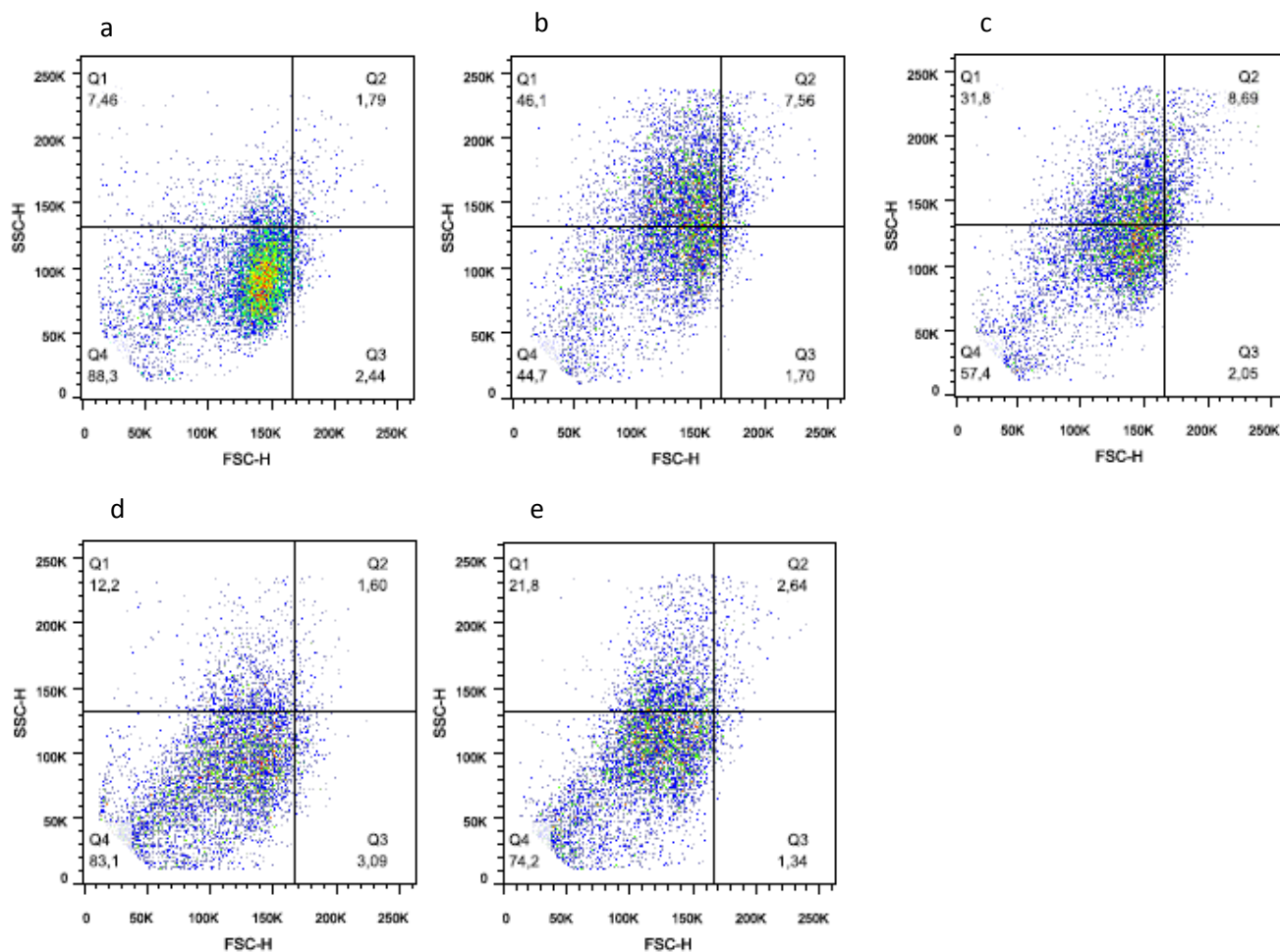


Figura 32. Padrão de alterações morfológicas em células de linhagem 4T1, 24 h após os tratamentos: b) DOX livre (FDOX); c) Nanopartículas poliméricas contendo cloreto de alumínio ftalocianina e DOX (LSN); d) Nanopartículas sob irradiação (15 minutos LED 660 nm; Potência de 202,91 mW/cm²; distância de 5 cm; Fluência de 185,57 J/cm²), das nanopartículas poliméricas contendo apenas cloreto de alumínio ftalocianina (NFTCIRR); e) Nanopartículas sob irradiação contendo cloreto de alumínio ftalocianina e DOX (LSNIRR) e a) Controle. Células que apresentaram diminuição de tamanho e aumento de granulosidade Q1; Células que apresentaram aumento tamanho e granulosidade Q2; Células que apresentaram aumento de tamanho e diminuição de granulosidade Q3 e Células que apresentaram diminuição de tamanho e granulosidade Q4.

6.2.4. Avaliação do potencial de membrana mitocondrial por citometria de fluxo em células cancerosas de linhagem 4T1

O potencial de membrana mitocondrial tem relação direta com a morte celular apoptótica, danos nessa membrana levam a ativação da via das caspases resultando na morte celular programada, que tem por característica a perda da integridade da membrana mitocondrial, como demonstrado pela revisão bibliográfica realizada por J. Tschopp.¹¹¹ Pela avaliação do potencial de membrana mitocondrial, os resultados demonstram efeito de despolarização da membrana mitocondrial, pelo deslocamento do histograma do potencial de célula normal para esquerda, figura 33 (B). O tratamento LSNIRR se sobressai quanto a esse deslocamento em comparação com o tratamento FDOX, demonstrado pela figura 33 (A), confirmando o efeito da DOX sobre a

membrana mitocondrial, já que foi evidenciado em estudos prévios sua ação geradora de EROs, causando morte apoptótica, como estudado por S. Kim.¹¹² Para o tratamento irradiado, LSNIRR, houve uma menor despolarização da membrana, podendo atribuir este fato a capacidade da nanopartícula em captar EROs.

A quantificação das áreas dos histogramas demonstra um ápice na despolarização do potencial mitocondrial interno no tratamento LSN, representado pela figura 34, seguido por um decaimento dessa despolarização nos tratamentos NFTCIRR e LSNIRR, pode-se especular que esse efeito é devido a neutralização das EROS pela nanopartícula e DOX, o que diminuiu o efeito oxidativo sobre a membrana mitocondrial.

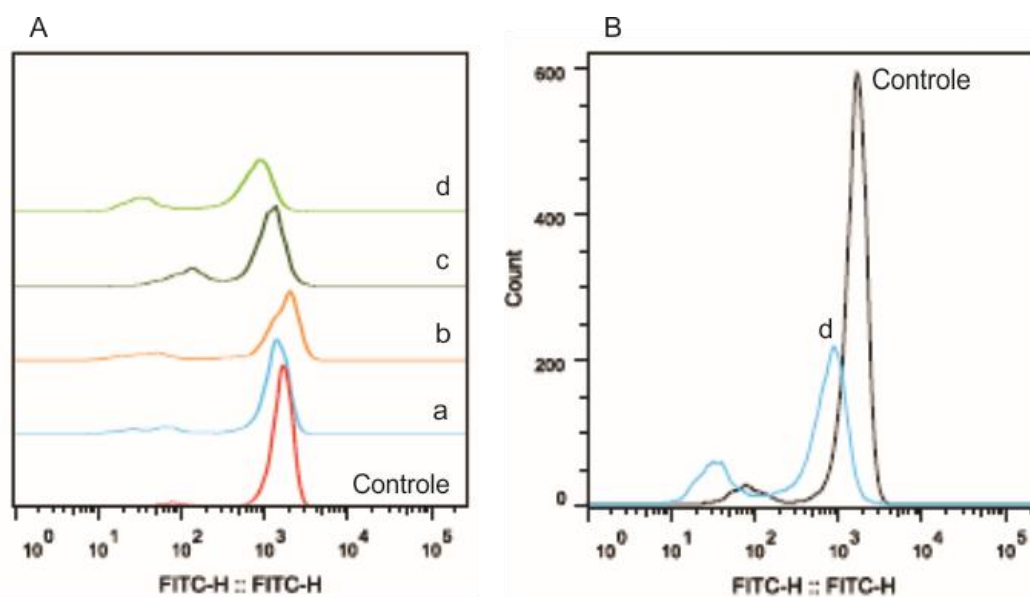


Figura 33. Histogramas do potencial de membrana mitocondrial de células de linhagem 4T1 24 h após os tratamentos: a) DOX livre (FDOX); b) Nanopartículas poliméricas contendo cloreto de alumínio ftalocianina e DOX (LSN); c) Nanopartículas sob irradiação (15 minutos LED 660 nm; Potência de 202,91 mW/cm²; distância de 5 cm; Fluência de 185,57 J/cm²), das nanopartículas poliméricas contendo apenas cloreto de alumínio ftalocianina (NFTCIRR); d) Nanopartículas sob irradiação contendo cloreto de alumínio ftalocianina e DOX (LSNIRR) e Controle que representa o potencial normal de membrana mitocondrial. Na figura A está expressa o efeito de despolarização da membrana mitocondrial após os tratamentos e controles e na figura B está representado o efeito do tratamento principal, LSN (d) despolarizando de forma considerável a membrana mitocondrial.

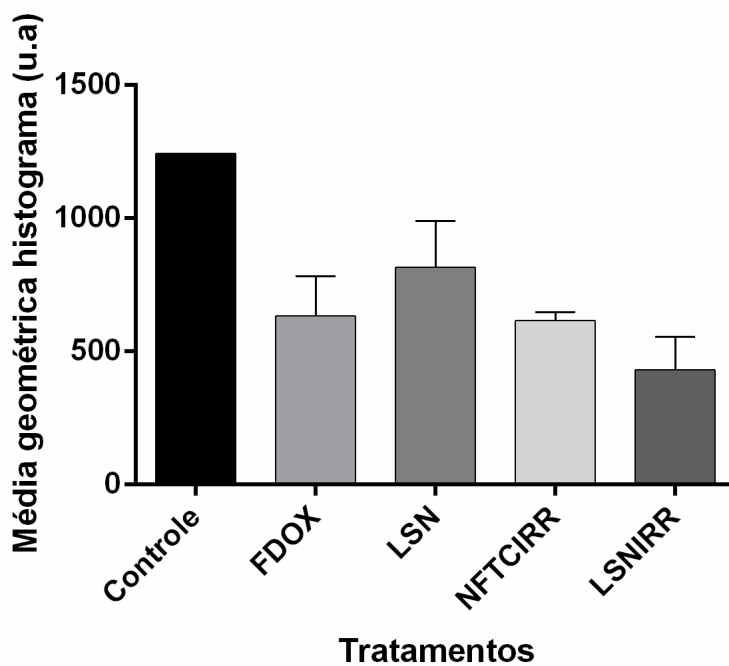


Figura 34. Avaliação quantitativa por média geométrica dos histogramas obtidos para o potencial mitocondrial 24 h após os tratamentos: DOX livre (FDOX); Nanopartículas poliméricas contendo cloreto de alumínio ftalocianina e DOX (LSN); Nanopartículas sob irradiação (15 minutos LED 660 nm; Potência de 202,91 mW/cm²; distância de 5 cm; Fluência de 185,57 J/cm²), das nanopartículas poliméricas contendo apenas cloreto de alumínio ftalocianina (NFTCIRR) e Nanopartículas sob irradiação contendo cloreto de alumínio ftalocianina e DOX (LSNIRR) em função do potencial mitocondrial normal representado pelo controle.

7. CONCLUSÕES

Após as avaliações realizadas neste trabalho, é possível concluir a efetividade das nanopartículas quanto ao seu potencial de liberação, sendo essa taxa até 2 vezes maior em comparação com o sistema não irradiado, respondendo de forma positiva a hipótese do trabalho, assim, através da irradiação é possível estimular a liberação de fármacos de forma a orientar o tratamento de modo mais efetivo à região tumoral, diminuindo os efeitos do tratamento em outras regiões do organismo. Após a irradiação, o poder de liberação do fármaco é aumentado direcionando uma super dosagem de fármaco sobre a região afetada, como demonstrado por experimentos *in vitro*, ocorre um efeito aditivo entre o agente FS e o fármaco quimioterápico. As nanopartículas também são produzidas de forma simples e reprodutível, possibilitando o escalonamento para a produção desse sistema, os resultados obtidos foram conclusivos para determinação da morfologia, estrutura química e estabilidade da nanopartícula.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Finsen, N. R. *Photherapy*; Arnold: London, 1901 English Translation: J. H. Sequeira.
2. Auler, H.; Banzer, G. Z. *Krebsforschung* **1942**, 53, 65 – 68.
3. Zhang, M., Shao, C., Guo, Z., Zhang, Z., Mu, J., Zhang, P., Liu, Y. *ACS Applied Materials & Interfaces*, **2011**, 3(7), 2573–8.
4. Bonnett, R. **1987**. E I 4NS, U. K.
5. DeRosa, M. C., Crutchley, R. J. *Coordination Chemistry Reviews*, (**2002**).233-234, 351–371.
6. Robertson, C. A.; Evans, D. H.; Abrahamse, H. *Photochem. Photobiol. B Biol.* **2009**, 96, 1–8.
7. Gill, S. S.; Tuteja, N. *Plant Physiol. Biochem.* **2010**, 48, 909–930.
8. Koide, Y.; Urano, Y.; Kenmoku, S.; Kojima, H.; Nagano, T. *Journal of American Chemical Society*, **2007**, 2, 10324–10325,
9. Rwei, A. Y., Wang, W., & Kohane, D. S. *Nano Today* **2015**.
10. Lu, Z., Prouty, M. D., Quo, Z., Golub, V. O., Kumar, C. S. S. R., Lvov, Y. M. *Langmuir*, **2005**, 21(5), 2042–2050.
11. Du, J., Du, X., Mao, C., & Wang, J. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, (133), 17560–175633.
12. Henderson, B. W.; Dougherty, T. J. *Photochem. Photobiol.* **1992**, 55, 145–157.
13. Kim, S., Ohulchanskyy, T. Y., Pudavar, H. E., Pandey, R. K., & Prasad, P. N. *Journal of the American Chemical Society*, **2007**, 129(9), 2669–2675.
14. Moore, C. M., Pendse, D., & Emberton, M. *Nature Clinical Practice Urology*, **2009**, 6(1), 18–30.
15. Kim, J.; Santos, O. A.; Park, J. H. *J. Control. Release* **2014**, 191, 98–104.
16. Peng, Q.; Moan, J.; Nesland, J. M. *Ultrastruct. Pathol.* **1996**, 20, 109–129.
17. Fingar, V. H.; Kik, P. K.; Haydon, P. S.; Cerrito, P. B.; Tseng, M.; Abang, E.; Wieman, T. J. *Br. J. Cancer* **1999**, 79, 1702–1708.
18. Xiang, L.; Xing, D.; Gu, H.; Yang, D.; Yang, S.; Zeng, L.; Chen, W. R. *J. Biomed. Opt.* **2013**, 12, 14001.
19. Miaden Korbelik, Gorazd Krosi and David J. Chaplin British Columbia Cancer Research Centre Vancouver, B.C., Canada V5Z 1L3. **1991**, 1616, 192–198.
20. Korbelik, M.; Dougherty, G. J. *Cancer Res.* **1999**, 59, 1941–1946.
21. Zheng, Y.; Yin, G.; Le, V.; Zhang, A.; Chen, S. Y.; Liang, X.; Liu, J. W. *Int. J. Biol. Sci.* **2016**, 12, 120–132.
22. Bonnett, R., & Martínez, G. *Tetrahedron*, **2001**, 57(47), 9513–9547.
23. Foster, T.; Murrant, R.; Bryant, R. *Radiat. ...* **1991**, 303, 296–303.

24. Pinto, A., Mace, Y., Drouet, F., Bony, E., Boidot, R., Draoui, N., ...Feron, O. *Oncogene*, **2015**, October, 1–10.
25. Ohulchanskyy TY, Roy I, Goswami LN, et al. *Nano Lett.* **2007** .7(9), 2835–2842.
26. Wang D, Wang T, Liu J, et al. *Nano Lett.* **2016**, 16(9), 5503–5513.
27. Weissleder R. *Nano Lett.* **2005**, 5(li), 2552–2556.
28. Tinkov S, Coester C, Serba S, et al. **2010**, 148(3), 368–372.
29. Arruebo M, Fernández-pacheco R, Ibarra MR, Santamaría J. *RevLitArtsAm.* **2007**, 2(3), 22–32.
30. Zhen, Z., Tang, W., Chuang, Y. J., Todd, T., Zhang, W., Lin, X., ...Xie, J. *ACS Nano*, **2014**, 8(6), 6004–6013.
31. Gong, H., Chao, Y., Xiang, J., Han, X., Song, G., Feng, L., ...Yang, G. (2016). *Nano letters*, **2016**, 16(4), 2512–2521.
32. Bertin, P. A.; Gibbs, J. M.; Shen, C. K. F.; Thaxton, C. S.; Russin, W. A.; Mirkin, C. A.; Nguyen, S. T. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 4168–4169.
33. Shi, M.; Wosnick, J. H.; Ho, K.; Keating, A.; Shoichet, M. S. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2007**, 46, 6126–6131.
34. Cosnier, S.; Holzinger, M. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, 40, 2146–2156.
35. Zayats, M.; Baron, R.; Popov, I.; Willner, I.; Zayats, M.; Baron, R.; Popov, I.; Willner, I. *Nano Letters.* **2005**, 4–8.
36. Kim, W. L., Cho, H., Li, L., Kang, H. C., & Huh, K. M. *Biomacromolecules*, **2014**, 15(6), 2224–2234.
37. Usacheva, M., Swaminathan, S. K., Kirtane, A. R., & Panyam, J. *Molecular Pharmaceutics*, **2014**, 11, 3186–3195.
38. Kim, S., Ohulchanskyy, T. Y., Pudavar, H. E., Pandey, R. K., & Prasad, P. N. *Journal of the American Chemical Society*, **2007**, 129(9), 2669–2675.
39. Muhamad, I. I.; Selvakumaran, S. *Nanomedicine* **2014**, 287–313.
40. Ramalho, M. J.; Pereira, M. C. *J. Chem. Educ.* **2016**, 93, 1446–1451.
41. Shi, R., Liu, G., Liang, H., Huang, Y., Tao, Y., & Zhang, J. *Inorganic Chemistry*, *acs.inorgchem*, **2016**.
42. Hang, J.; Ghorai, P.; Finkenstaedt-Quinn, S. a; Findik, I.; Sliz, E.; Kuwata, K. T.; Dussault, P. *H. J. Org. Chem.* **2012**, 77, 1233–1243.
43. Pennica, D.; Nedwin, G. E.; Hayflick, J. S.; Seeburg, P. H.; Derynck, R.; Palladino, M. a; Kohr, W. J.; Aggarwal, B. B.; Goeddel, D. V. *Nature* **1984**, 312, 724–729.

44. Trachootham, D.; Lu, W.; Ogasawara, M. A.; Valle, N. R.; Huang, P. *Antioxid. Redox Signal.* **2007**, *9*, 49–89.
45. Simon, H. U.; Haj-Yehia, A.; Levi-Schaffer, F. *Apoptosis* **2000**, *5*, 415–418.
46. Ly, J. D.; Grubb, D. R.; Lawen, A. *Apoptosis* **2003**, *8*, 115–128.
47. Garber, K. *Nat. Biotechnol.* **2005**, *23*, 409–411.
48. Zong, W. X.; Thompson, C. B. *Genes Dev.* **2006**, *20*, 1–15.
49. Pass, H. I. *J. Natl. Cancer Inst.* **1993**, *85*, 443–456.
50. Furuse, K.; Fukuoka, M.; Kato, H.; Horai, T.; Kubota, K.; Kodama, N.; Kusunoki, Y.; Takifuji, N.; Okunaka, T.; Konaka, C. *J. Clin. Oncol.* **1993**, *11*, 1852–1857.
51. Gomer, C. J. *Photochem. Photobiol.* **1991**, *54*, 1093–1107.
52. U, S.-E.; Diddens, H.; Birngruber, R.; Hasan, T.; Schmidt-Erfurth, U.; Diddens, H.; Birngruber, R.; Hasan, *Br. J. Cancer* **1997**, *75*, 54–61.
53. Barth, B. M.; Altinoğlu, E. I.; Shanmugavelandy, S. S.; Kaiser, J. M.; Crespo-Gonzalez, D.; Divittore, N. A.; McGovern, C.; Goff, T. M.; Keasey, N. R.; Adair, J. H.; *et al.* *ACS Nano* **2011**, *5*, 5325–5337.
54. Simon, H. U.; Haj-Yehia, A. *Apoptosis* **2000**, *5*, 415–418.
55. Sinha, P.; Clements, V. K.; Fulton, A. M.; Ostrand-Rosenberg, S. *Cancer Res.* **2007**, *67*, 4507–4513.
56. Kalinski, P. *J. Immunol. (Baltimore, Md 1950)* **2012**, *188*, 21–28.
57. Blay, J.; White, T.; Hoskin, D. *Cancer Res.* **1997**, *57*, 2602–2605.
58. Shirota, H.; Klinman, D. M.; Ito, S.; Ito, H.; Kubo, M.; Ishioka. *Cancer Immunol. Res.* **2017**, *5*, 61–71.
59. Hoskin, D. W.; Mader, J. S.; Furlong, S. J.; Conrad, D. M.; Blay, J. *Int. J. Oncol.* **2008**, *32*, 527–535.
60. Mitry, M. A.; Edwards, J. G. *IJC Hear. Vasc.* **2016**, *10*, 17–24.
61. Octavia, Y.; Tocchetti, C. G.; Gabrielson, K. L.; Janssens, S.; Crijns, H. J.; Moens, A. L. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **2012**, *52*, 1213–1225.
62. Souza, L. R.; Muehlmann, L. A.; dos Santos, M. S. C.; Ganassin, R.; Simón-Vázquez, R.; Joanitti, G. A.; Mosiniewicz-Szablewska, E.; Suchocki, P.; Morais, P. C.; González-Fernández, Á.; *et al.* *J. Nanobiotechnology* **2014**, *12*, 32.
63. Allison, R. R., Downie, G. H., Cuenca, R., Hu, X. H., Childs, C. J. H., & Sibata, C. H. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, **2004**, *1*(1), 27–42.
64. Josefsen, L. B., & Boyle, R. W. *Metal-Based Drugs*, **2008**.
65. Tsubone, T. M.; Braga, G.; Vilsinski, B. H.; Gerola, A. P.; Hioka, N.; Tessaro, A. L.; Caetano, W. *J. Braz. Chem. Soc.* **2014**, *25*, 890–897.

66. Van Keuren, E.; Bone, A.; Ma, C. *Langmuir* , **2008**, *24*, 6079–6084.
67. Schwarz T, Luger TA. *J PhotochemPhotobiol B*. **1989**, *4*(1), 1–13.
68. Maltzman W, Czyzyk L. *Mol Cell Biol*. **1984**, *4*(9), 1689–94.
69. Boyle RW, Dolphin D. *PhotochemPhotobiol*. **1996**, *64*(3), 469–485.
70. Hammer, R. P.; Owens, C. V.; Hwang, S. H.; Sayes, C. M.; Soper, S. A. *Bioconjug. Chem.* **2002**, *13*, 1244–1252.
71. Brasseur, N.; Ouellet, R.; La Madeleine, C.; van Lier, J. E. *Br. J. Cancer* **1999**, *80*, 1533–1541.
72. Mark Wainwright. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*. **2008**, *8*(3), 280-91.
73. Camerin, M.; Magaraggia, M.; Soncin, M.; Jori, G.; Moreno, M.; Chambrier, I.; Cook, M. J.; Russell, D. A. *Eur. J. Cancer*, **2010**, *46*, 1910–1918.
74. Asem, H.; El-Fattah, A. A.; Nafee, N.; Zhao, Y.; Khalil, L.; Muhammed, M.; Hassan, M.; Kandil, S. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **2016**, *13*, 48–57.
75. Schweitzer, C.; Schmidt, R. *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 1685–1757.
76. Mitsunaga, M.; Ogawa, M.; Kosaka, N.; Rosenblum, L. T.; Choyke, P. L.; Kobayashi, H. *Nat. Med.* **2011**, *17*, 1685–1691.
77. Wilkinson, F.; Helman, W. P.; Ross, A. B. *J. Phys. Chem. Ref. Data* **1993**, *22*, 113–262.
78. Kochevar, I. E.; Redmond, R. W. *Methods Enzymol.* **2000**, *319*, 20–28.
79. Bang, O.; Peyrard, M. *Phys. Rev. E* **1996**, *53*, 4143–4152.
80. Merkel, P. B.; Kearns, D. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94*, 7244–7253.
81. Alfano, R. R.; Shapiro, S. L. *Phys. Rev. Lett.* **1972**, *29*, 1655–1658.
82. Finsen, N. R. *Phototherapy*; Arnold: London, **1901** English Translation: J. H. Sequeira
83. Ogilby, P. R. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 3181–3209.
84. Catir, M.; Kilic, H.; Nardello-Rataj, V.; Aubry, J.; Kazaz, C. *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 4560–4564.
85. Massari, J.; Tokikawa, R.; Medinas, D. B.; Angeli, J. P. F.; Di Mascio, P.; Assunção, N. a; Bechara, E. J. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 20761–20768.
86. Lambert, C. R.; Kochevar, I. E. *Photochem. Photobiol.* **1997**, *66*, 15–25.
87. Wallentin, C. J.; Nguyen, J. D.; Finkbeiner, P.; Stephenson, C. R. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 8875–8884.
88. Ischay, M.; Lu, Z.; Yoon, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 8572–8574.
89. Baciocchi, E., Del Giacco, T., Elisei, F., Gerini, M. F., Guerra, M., Lapi, A., & Liberali, P. *Journal of the American Chemical Society*, **2003**, *125*(52), 16444–54.
90. Lacombe, S.; Cardy, H.; Simon, M.; Khoukh, a; Soumillion, J. P.; Ayadim, M. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2002**, *1*, 347–354.

91. Dumont, E.; Grüber, R.; Bignon, E.; Morell, C.; Moreau, Y.; Monari, A.; Ravanat, J. L. *Nucleic Acids Res.* **2016**, *44*, 56–62.
92. Davies, M. J.; Truscott, R. J. W. *J. Photochem. Photobiol. B* **2001**, *63*, 114–125.
93. Lacombe, S.; Cardy, H.; Simon, M.; Khoukh, a, Soumillion, J. P., Ayadim, M. *Official Journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology*, **2002**, *1*(5), 347–354.
94. Muehlmann, L. A.; Ma, B. C.; Azevedo, R. B. *International Journal of Nanomedicine* **2014**, 1199–1213.
95. Journal, A. I.; Ganassin, R.; Merker, C.; Rodrigues, M. C.; Felipe, N.; Sampaio, C.; Sodré, C.; Ferreira, S.; William, S.; Ombredane, A. S.; *et al.* *Artif. Cells, Nanomedicine, Biotechnol.* **2017**, *0*, 1–11.
96. Mosmann, T. *J. Immunol. Methods* **65**, 55–63 (1983).
97. Bae, Y.; Jang, W.-D.; Nishiyama, N.; Fukushima, S.; Kataoka, K. *Mol. Biosyst.* **2005**, *1*, 242–250.
98. Chilkoti, A.; Dreher, M. R.; Meyer, D. E.; Raucher, D. T. *Advanced Drug Delivery Reviews.* **2002**, *54*, 613–630.
99. Analysis, E.; Hall, M. V. R. *Polymer.* **1984**, *26*, 591–594.
100. Zhou, Z.; Solomon, M. J.; Scales, P. J.; Boger, D. V. *Journal of Rheology.* **1999**, *43*(3) 651.
101. Nejati-koshki, K.; Mesgari, M.; Ebrahimi, E.; Abbasalizadeh, F.; Fekri, S. *J. Microencapsul.* **2014**, *31*(8), 815–823.
102. Fröhlich, E. *Int. J. Nanomedicine* **2012**, *7*, 5577–5591.
103. Harush-Frenkel, O.; Rozentur, E.; Benita, S.; Altschuler, Y. *Biomacromolecules* **2008**, *9*, 435–443.
104. Atodiresei, I.; Schiffers, I.; Bolm, C. *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 5683–5712.
105. Sahoo, S. K.; Dilnawaz, F.; Krishnakumar, S. *Drug Discov. Today* **2008**, *13*, 144–151.
106. Clennan, E. L.; Pace, A. *Tetrahedron* **2005**, *61*, 6665–6691.
107. Maccallum, J. R.; Rankin, C. T. *Macromol. Chem. Phys.* **1974**, *175*, 2477–2482.
108. Dikalov, S.; Griendling, K. K.; Harrison, D. G. *Hypertension* **2007**, *49*, 717–727.
109. Arts, L. *JACS* **1941**, *474*, 5–7.
110. Natanson, C.; Suffredini, A. F.; Eichacker, P. Q.; Danner, R. L. *Ann. Intern. Med.* **1994**, *120*, 771–783.
111. Tschopp, J.; Schroder, K. *Nat. Rev. Immunol.* **2010**, *10*, 210–215.
112. Kim, S.-Y.; Kim, S.-J.; Kim, B.-J.; Rah, S.-Y.; Chung, S. M.; Im, M.-J.; Kim, U.-H. *Exp. Mol. Med.* **2006**, *38*, 535–545.

113. Dougherty, T.; Schwartz, S. *Nature reviews*. **2003**, *3*, 380–387.
114. Photofrin-pdt, A. I. *Cell cycle***2006**, 729–734.