



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NANOCIÊNCIA E NANOBIOTECNOLOGIA

**NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICO-MAGNÉTICAS CONTENDO ALUMÍNIO
CLORO FTALOCIANINA CONTRA CÉLULAS DE CÂNCER DE MAMA**

ALAN KELBIS OLIVEIRA LIMA

BRASÍLIA/DF



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NANOCIÊNCIA E NANOBIOTECNOLOGIA
MARÇO DE 2019

**NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICO-MAGNÉTICAS CONTENDO ALUMÍNIO
CLORO FTALOCIANINA CONTRA CÉLULAS DE CÂNCER DE MAMA**

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.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Mônica Pereira Garcia

BRASÍLIA/DF



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NANOCIÊNCIA E NANOBIOTECNOLOGIA
MARÇO DE 2019

ALAN KELBIS OLIVEIRA LIMA

**NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICO-MAGNÉTICAS CONTENDO ALUMÍNIO
CLORO FTALOCIANINA CONTRA CÉLULAS DE CÂNCER DE MAMA**

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^ª. Dra. Mônica Pereira Garcia – Orientadora
UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA – UnB

Prof. Dr. Márcilio Sérgio Soares da Cunha Filho
UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA – UnB

Prof^ª. Dra. Maria de Fátima Menezes Almeida Santos
UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA – UnB

“Revolucionário é todo aquele que quer mudar o mundo e tem a coragem de começar por si mesmo.”

(Sérgio Vaz).

Dedico este trabalho à minha mãe, Cimar, por todo o amor e carinho demonstrados da sua maneira desde sempre. Pela confiança e por não me deixar sozinho em outra cidade, mesmo nunca estando nela. Amo a senhora!

AGRADECIMENTOS

Sair de casa, da minha vida, daquele meu lugar que vivi por mais de duas décadas não foi uma decisão fácil, porém necessária para ir em busca do melhor. E eu não chegaria até aqui sem ter a quem agradecer...

A Deus pelo dom da vida, por toda força, coragem e por nunca me abandonar!

A todos os meus familiares e vizinhos de rua, de bairro, que sempre torceram por mim e tiveram uma palavra de incentivo e confiança. Em especial ao meu pai Antônio, meu tio Miguel, minha tia Selma e à minha irmã Aretha, por estarem sempre comigo acreditando e ajudando.

Ao meu amigo Thiago Caetano (*in memoriam*) que está sempre em meus pensamentos, me trazendo boas lembranças do tempo de escola.

À professora Dra. Mônica por aceitar ser minha orientadora durante essa fase do mestrado e por todo o carinho, os ensinamentos, o cuidado e entendimento ao longo dos dois últimos anos. Muito obrigado por confiar em mim.

Ao professor Dr. Ricardo Bentes que desde o primeiro contato aceitou me receber no laboratório como estudante de pós-graduação.

Aos professores do Departamento de Genética e Morfologia da UnB, por toda troca de experiências durante as disciplinas e também pelos corredores do bloco, muito obrigado. Em especial, ao professor Dr. Luís Alexandre Muehlmann pelas ótimas aulas de biologia do câncer, à professora Dra. Patrícia Bento pelas conversas e ajuda nos resultados de FTIR e à professora Dra. Jaqueline Silva por todas as ajudas e por me acompanhar nos diversos experimentos realizados.

Aos técnicos do Laboratório de Nanobiotecnologia do IB, Diogo Magnabosco e Karen Rapp, por todo o auxílio durante os experimentos. Em especial falo da Karen que, principalmente nesse último ano, me ajudou demais nos experimentos *in vitro* com paciência e zelo, mas também me ouviu nos momentos de desabafo e ensinou demais. Obrigado!

Aos colegas e amigos que fiz no Laboratório de Nanobiotecnologia e que desde o início me acolheram. Em especial à Débora, Marina, Luiza, Dani e Fernanda... Obrigado pelas conversas, risadas, papos sérios, marmitas juntos. Compartilhar disso com vocês me ajudou a superar dias difíceis e de experimentos intermináveis.

Aos técnicos e professores responsáveis pelos laboratórios da UnB por onde peregrinei em busca de realizar a caracterização dos nanossistemas. Muito obrigado pelas ajudas, paciência em me ensinar e pela disposição em contribuir. Em especial ao técnico Hermano do Instituto de Física e ao professor Dr. Antonio Coaquira do mesmo instituto. Ao professor Dr. Marcelo Rodrigues e ao professor Dr. Elon Ferreira do Instituto de Química.

Aos membros da banca avaliadora dessa dissertação, pelas contribuições prestadas.

Aos Charles Gomes que desde sempre esteve comigo em Brasília me ajudando a entender, andar e me virar na capital do país. Obrigado pelas batatas rústicas, pelos sanduíches e por me ensinar tanto, tanto da vida. Obrigado por tudo! É um grande amigo que vou levar pra vida toda, onde nós estivermos.

Ao Hermes Oliveira, grande companhia, grande amigo... “Hermesssss”, mesmo sem você falar tanto, obrigado pelo carinho e admiração demonstrados desde o primeiro dia, por ter mudado a minha forma de ver a vida, ver o mundo, de me entender e por me fazer evoluir a cada dia como pessoa. Agradeço também por ter conhecido a Nina e o Spike. Poder compartilhar contigo de tudo isso e da nossa vida me deixa muito grato e feliz!

Aos amigos de Santarém que não vejo há muito ou nem tanto tempo assim, mas sei que torcem por mim e nunca deixam nossa amizade de lado: Cristiano, Ellen, Aysla, Adeliane, Chico, Caio, Taís, Celianderson, Ketty, Amanda, muito obrigado pelas conversas descontraídas e todos os momentos já vividos juntos... ainda vem mais!

Aos amigos de fora de Santarém, Marcos Venícius e Leonardo La Farina, muito obrigado também por toda a força e amizade que são igualmente importantes na minha caminhada como pessoa. Mesmo mais distantes vocês são amigos de verdade!

À CAPES pela bolsa de mestrado concedida e à FAPDF pelos auxílios financeiros nos projetos.

Ao PPG/Nano e à Universidade de Brasília pela oportunidade de estudo e crescimento científico.

A todos aqueles também que já me colocaram em situações difíceis e aos que em algum momento duvidaram da minha capacidade. Vencer mais essa fase da minha vida torna-se ainda mais gratificante.

Gratidão!

RESUMO

A nanotecnologia atua como uma estratégia inovadora no estudo do câncer a partir da produção de nanossistemas biocompatíveis e biodegradáveis que possam carrear e liberar fármacos na região tumoral eliminando problemas de hidrofobicidade e toxicidade às células saudáveis. A terapia fotodinâmica (TFD) é um tratamento que envolve a combinação de um fotossensibilizante (FS) com a luz em comprimentos de onda específicos. Ela pode atuar destruindo tecidos tumorais por meio, principalmente, da geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) e, dentre os FS mais utilizados, destaca-se a alumínio cloro ftalocianina (AlClFt). Diante disso, o objetivo desse estudo foi desenvolver um nanossistema polimérico-magnético contendo a AlClFt (NPPMagFt) e avaliar sua aplicação na TFD contra células tumorais de câncer de mama humano (MCF-7), murino (4T1) e fibroblasto murino (NIH-3T3) *in vitro*, além de nanossistemas “controles”: NPPs (nanopartículas de PLGA), NPPMag (nanopartículas de PLGA com nanopartículas de óxido de ferro) e NPPFt (nanopartículas de PLGA com a AlClFt). A caracterização foi realizada por meio de análises de estabilidade ao longo do tempo (DLS e potencial Zeta) sob diferentes temperaturas de armazenamento (4-8 °C, 18-25 °C, 37 °C), propriedades fotofísicas de fluorescência, físico-químicas (FTIR), magnéticas, morfológicas (MEV e MET), além da capacidade na geração de ERO. Os ensaios *in vitro* avaliaram o perfil de internalização das NPPMagFt nas linhagens celulares e, posteriormente, foram conduzidos estudos de citotoxicidade dos nanossistemas através do método colorimétrico MTT com e sem a aplicação da TFD com uma fluência de 23 J/cm², variando as concentrações dos nanossistemas, assim como o tempo de incubação com as linhagens celulares. Os resultados obtidos mostraram que houve a interação das nanopartículas magnéticas e de moléculas do FS na superfície das nanopartículas poliméricas, formando as NPPMagFt com formato esférico e estabilidade física por até 105 dias na temperatura de 4-8 °C. Os espectros de fluorescência demonstram picos dentro da faixa terapêutica da TFD (680-685 nm), boa produção de ERO por meio do teste de decaimento da absorbância do isobenzofurano (DBF) e uma resposta dos nanossistemas polimérico-magnéticos quando expostos a um campo magnético externo. Em relação aos ensaios *in vitro*, observou-se que a internalização das NPPMagFt foi mais rápida nas células tumorais em relação aos fibroblastos e os ensaios de citotoxicidade na ausência de irradiação comprovam que o perfil de viabilidade celular de MCF-7 quando tratadas com os grupos experimentais não foi estatisticamente diferente do controle em nenhuma concentração, no entanto, a linhagem 4T1 foi mais sensível aos tratamentos com os nanossistemas NPPMag, NPPMagFt e NPPFt independente da concentração testada, enquanto que a linhagem não tumoral murina NIH-3T3 apresentou maior redução de células viáveis quando a concentração do FS era de 2 e 5 µM. Após aplicação da TFD, foi constatada que a incubação das células com os nanossistemas por quatro horas e na maior concentração dos constituintes causou maior citotoxicidade, principalmente para a linhagem MCF-7 exposta às NPPMagFt e NPPFt, com valores de viabilidade chegando a 41% e 42%, respectivamente. Para as linhagens murinas, tumorais ou não, o efeito citotóxico causado após irradiação foi menor, mesmo assim, as NPPMagFt e NPPFt quando em contato com essas células nos dois tempos de incubação causaram maior redução do número de células viáveis em relação aos outros nanossistemas. Portanto, com esse trabalho foi possível desenvolver um nanossistema estável e com características promissoras que pode servir como alternativa ao tratamento do câncer de mama utilizando a TFD e, se combinada à magnetohipertermia, pode aumentar a capacidade citotóxica em células cancerosas sensíveis à altas temperaturas.

Palavras-chave: Neoplasia. Nanobiotecnologia. Terapia fotodinâmica. Fotossensibilizante. Nanossistemas polimérico-magnéticos.

ABSTRACT

Nanotechnology acts as an innovative strategy in the study of cancer from the production of biocompatible and biodegradable nanosystems that can carry and release drugs in the tumor region eliminating problems of hydrophobicity and toxicity to healthy cells. Photodynamic therapy (PDT) is a treatment that involves combining a photosensitizer (FS) with light at specific wavelengths. It can act by destroying tumor tissues through mainly the generation of reactive oxygen species (ROS), and among the most commonly used SF, aluminum chloro phthalocyanine (AlClFt) stands out. Therefore, the objective of this study was to develop a polymer-magnetic nanosystem containing AlClFt (NPPMagFt) and to evaluate its application in PDT against human breast cancer cells (MCF-7), murine (4T1) and murine fibroblast (NIH- 3T3) in vitro, in addition to "control" nanosystems: NPPs (PLGA nanoparticles), NPPMag (PLGA nanoparticles with iron oxide nanoparticles) and NPPFt (PLGA nanoparticles with AlClFt). The characterization was carried out by means of stability analyzes over time (DLS and Zeta potential) under different storage temperatures (4-8 °C, 18-25 °C, 37 °C), photophysical properties of fluorescence, physicochemical properties (FTIR), magnetic, morphological (MEV and MET), besides the capacity in the production of ROS. The in vitro assays evaluated the internalization profile of NPPMagFt in cell lines and, later, nano-system cytotoxicity studies were conducted through the MTT colorimetric method with and without the application of PDT at a flow rate of 23 J/cm², varying the concentrations of nanosystems, as well as the incubation time with the cell lines. The results showed that there was interaction of the magnetic nanoparticles and FS molecules on the surface of the polymer nanoparticles, thus forming the spherical shape NPPMagFt and physical stability for up to 105 days at a temperature of 4-8 °C. Fluorescence spectra show peaks within the therapeutic range of PDT (680-685 nm), good ROS production through the isobenzofuran (DBF) decay test and a response of the polymer-magnetic nanosystems when exposed to a magnetic field external. In relation to the in vitro assays, it was observed that the internalization of NPPMagFt was faster in the tumor cells in relation to the fibroblast and the cytotoxicity tests in the absence of irradiation prove that the cell viability profile of MCF-7 when treated with the groups was not statistically different from the control at any concentration, however, the 4T1 lineage was more sensitive to the NPPMag, NPPMagFt and NPPFt nanosystem treatments independent of the concentration tested, whereas the NIH-3T3 murine non-tumor cell line presented greater cell reduction viable when the FS concentration was 2 and 5 μM. After PDT application, it was observed that the incubation of the cells with the nanosystems for four hours and in the higher concentration of the constituents caused higher cytotoxicity, especially for MCF-7 line exposed to NPPMagFt and NPPFt, with viability values reaching 41% and 42%, respectively. For the murine or non-tumor cell lines, the cytotoxic effect after irradiation was lower, even though the NPPMagFt and NPPFt when in contact with these cells in the two incubation times caused a greater reduction in the number of viable cells in relation to the other nanosystems. Therefore, it was possible to develop a stable and promising nanosystem that could serve as an alternative to the treatment of breast cancer using PDT and, if combined with magnetohyperthermia, may increase cytotoxic capacity in cancer cells sensitive to high temperatures.

Keywords: Neoplasm. Nanobiotechnology. Photodynamic therapy. Photosensitizer. Polymeric-magnetic nanosystems.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação dos principais marcadores celulares tumorais.....	3
Figura 2. Distribuição dos 10 tipos de câncer mais incidentes no Brasil estimados para o ano de 2018, excluindo o câncer de pele não melanoma.....	4
Figura 3. Esquema representativo de nanocarreadores para sistema de <i>drug delivery</i>	9
Figura 4. Principais tipos de nanocarreadores utilizados em <i>drug delivery system</i>	10
Figura 5. Tipos de nanopartículas poliméricas de acordo com a estrutura organizacional.....	11
Figura 6. Hidrólise do PLGA a partir dos monômeros de ácido lático e ácido glicólico.....	12
Figura 7. Representação esquemática do método de emulsificação- <i>evaporação</i> de solventes para a produção de nanopartículas poliméricas.....	13
Figura 8. Alinhamento da ordenação dos <i>spins</i> dos átomos em diferentes materiais.....	16
Figura 9. Magnetização (M) em função de um campo magnético externo (H) aplicado.....	16
Figura 10. Esquema representativo do diagrama de Jablonski (alterado) mostrando as trocas energéticas durante reações na terapia fotodinâmica.....	19
Figura 11. Representação da técnica de magnetohipertermia.....	20
Figura 12. Molécula de alumínio cloro ftalocianina.....	23
Figura 13. Representação esquemática do nanossistema preparado.....	29
Figura 14. Esquema representativo das análises de estabilidade dos nanossistemas nas três condições de temperatura de armazenamento (4-8, 18-25 e 37 °C)	30
Figura 15. Equipamento emissor de luz LED.....	32
Figura 16. Esquema da câmara de Neubauer mostrando os quadrantes contados para determinar o cálculo do número final de células em cada ensaio.....	35
Figura 17. Metabolização do MTT em sal de formazan reduzido por enzimas mitocondriais de células viáveis.....	37
Figura 18. Disposição dos grupos experimentais, em duas concentrações, nas placas para o ensaio de TFD.....	38

Figura 19. Registro dos nanossistemas logo após suas preparações.....	39
Figura 20. Análise de estabilidade ao longo de 105 dias do DH (acima) e PdI (abaixo) dos nanossistemas nas três condições de temperatura de armazenamento.....	41
Figura 21. Análise de estabilidade do PtZ dos nanossistemas nas três condições de temperatura de armazenamento.....	44
Figura 22. Espectro de fluorescência dos nanossistemas. (A) AlClFt em H ₂ O; (B) AlClFt em EtOH; (C) NPPMagFt; (D) NPPFt.....	50
Figura 23. Espectro de fluorescência dos nanossistemas. (A) NPPs; (B) NPPMag.....	51
Figura 24. Espectros vibracionais na região do infravermelho do BSA, PLGA e das NPPs.....	53
Figura 25. Espectros vibracionais na região do infravermelho da NPFeO, NPPs e NPPMag.....	54
Figura 26. Espectros vibracionais na região do infravermelho da AlClFt dispersa em EtOH, NPPs, NPPFt e NPPMagFt.....	56
Figura 27. Produção de ERO com diferentes concentrações dos nanossistemas pelo método de degradação do DBF sob diferentes fluências do laser a 660 nm.....	57-58
Figura 28. Curva de magnetização (M) dos nanossistemas após aplicação de campo magnético externo (H) à temperatura de 300 K.....	61
Figura 29. Eletromicrografias de varredura dos nanossistemas.....	64
Figura 30. Eletromicrografias de transmissão das NPPs.....	65
Figura 31. Eletromicrografias de transmissão das NPPMag.....	66
Figura 32. Eletromicrografias de transmissão das NPPMagFt.....	66
Figura 33. Eletromicrografias de transmissão das NPPFt.....	67
Figura 34. Intensidade de fluorescência da AlClFt em células 4T1 (A) e NIH-3T3 (B) expostas às NPPMagFt	68
Figura 35. Ensaio de viabilidade celular pelo método de MTT em células MCF-7 submetidas a diferentes concentrações e distintos nanossistemas.....	71
Figura 36. Ensaio de viabilidade celular pelo método de MTT em células 4T1 submetidas a	

diferentes concentrações e distintos nanossistemas.....	72
Figura 37. Ensaio de viabilidade celular pelo método de MTT em células de fibroblastos NIH-3T3 submetidas a diferentes concentrações e distintos nanossistemas.....	74
Figura 38. Viabilidade de células MCF-7 pelo método de MTT após exposição por 15 minutos (A) ou quatro horas (B) aos nanossistemas e aplicação de TFD (10 minutos; comprimento de onda de 660 nm; 10 cm de distância da fonte luminosa; fluência de 23 J/cm ²).....	78
Figura 39. Viabilidade de células 4T1 pelo método de MTT após exposição por 15 minutos ou quatro horas aos nanossistemas e aplicação de TFD (10 minutos; comprimento de onda de 660 nm; 10 cm de distância da fonte luminosa; fluência de 23 J/cm ²).....	81
Figura 40. Viabilidade de células NIH-3T3 pelo método de MTT após exposição por 15 minutos ou quatro horas aos nanossistemas e aplicação de TFD (10 minutos; comprimento de onda de 660 nm; 10 cm de distância da fonte luminosa; fluência de 23 J/cm ²).....	84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Exemplos da literatura de nanossistemas constituídos de nanopartículas poliméricas a base de PLGA com seus principais resultados antitumorais <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	14
Tabela 2: Lista dos materiais utilizados nesse estudo.....	26
Tabela 3. Lista dos reagentes utilizados nesse estudo.....	26
Tabela 4. Lista dos equipamentos utilizados nesse estudo.....	27
Tabela 5. Descrição dos componentes presentes nos nanossistemas desenvolvidos e suas concentrações finais.....	29
Tabela 6. Diferentes concentrações de PLGA, BSA e AICIFt dos nanossistemas utilizadas nos ensaios de geração de ERO.....	32
Tabela 7. Linhagens celulares utilizadas nesse estudo.....	34
Tabela 8. Valor médio das propriedades coloidais dos nanossistemas logo após sua preparação (T0).....	39

LISTA DE SIGLAS

$^1\text{O}_2$	Oxigênio singleto
4T1	Carcinoma mamário murino
AlClFt	Alumínio cloro ftalocianina
BSA	Albumina sérica bovina
CMA	Campo magnético alternado
DBF	1,3-difenil-isobenzofurano
DCM	Diclorometano
DH	Diâmetro hidrodinâmico
DLS	Espalhamento dinâmico de luz
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
EMA	<i>European Medicines Agency</i>
ERO	Espécies reativas de oxigênio
EtOH	Etanol
FDA	<i>Food and drug administration</i>
FS	Fotossensibilizante
FTIR	Espectrofotômetro de infravermelho por transformada de Fourier
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
INCA	Instituto Nacional do Câncer
ISO	<i>International Organization for Standardization</i>
HER2	<i>Human Epidermal Receptor type 2</i>
MCF-7	Carcinoma mamário humano
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
mL	Mililitros
M_s	Magnetização de saturação
MTT	Brometo de 3-(4,5 dimetiltiazol-2-il)-2-5-difenil-tetrazólio
NIH-3T3	Fibroblasto murino
NPs	Nanopartículas
NPF _o	Nanopartículas de óxido de ferro
NPMs	Nanopartículas magnéticas
NPPs	Nanopartículas poliméricas

NPPFt	Nanopartículas poliméricas contendo alumínio cloro ftalocianina
NPPMag	Nanopartículas polimérico-magnéticas
NPPMagFt	Nanopartículas polimérico-magnéticas com alumínio cloro ftalocianina
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Tampão fosfato-salino
PdI	Índice de polidispersão
PLGA	Poli(ácido lático-co-ácido glicólico)
PtZ	Potencial Zeta de superfície
PVA	Acetato de polivinila
TFD	Terapia fotodinâmica
SFB	Soro fetal bovino
UV/Vis	Ultravioleta visível

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 Câncer	3
2.2 Câncer de mama	4
2.3 Nanotecnologia	8
2.4 Nanopartículas poliméricas	10
2.5 Nanopartículas magnéticas	14
2.6 Terapia fotodinâmica (TFD) combinada com Magnetohipertermia (MHT)	17
2.7 Fotossensibilizantes (FS) e Alumínio cloro ftalocianina (AlClFt)	21
3. OBJETIVO GERAL	25
3.1 Etapas	25
4. MATERIAL E MÉTODOS	26
4.1 Equipamentos, materiais e reagentes	26
4.2 Preparo dos nanossistemas	28
4.3 Caracterização dos nanossistemas	29
4.3.1 <i>Propriedades coloidais</i>	29
4.3.2 <i>Propriedades fotofísicas</i>	31
4.3.3 <i>Propriedades físico-químicas</i>	31
4.3.4 <i>Propriedades magnéticas</i>	33
4.3.5 <i>Propriedades morfológicas</i>	33
4.4 Estudos biológicos <i>in vitro</i>	34
4.4.1 <i>Linhagens celulares</i>	34
4.4.2 <i>Meio de cultivo</i>	34
4.4.3 <i>Manutenção das linhagens celulares</i>	34
4.4.4 <i>Subcultivos celulares</i>	35
4.4.5 <i>Plaqueamento das células</i>	35
4.4.6 <i>Incorporação dos nanossistemas nas células</i>	36
4.4.7 <i>Citotoxicidade dos nanossistemas</i>	36
4.4.8 <i>Citotoxicidade mediada pela TFD com os nanossistemas</i>	37
4.5 Análises estatísticas	38

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
5.1 Avaliação das propriedades coloidais	39
5.2 Avaliação das propriedades fotofísicas	49
5.3 Avaliação das propriedades físico-químicas	52
5.3.1 <i>FTIR</i>	52
5.3.2 <i>Geração de ERO</i>	57
5.4 Avaliação das propriedades magnéticas	60
5.5 Avaliação das propriedades morfológicas	63
5.5.1 <i>Microscopia eletrônica de varredura (MEV)</i>	63
5.5.2 <i>Microscopia eletrônica de transmissão (MET)</i>	65
5.6 Avaliação biológica <i>in vitro</i>	67
5.6.1 <i>Incorporação de AlClFt nas células</i>	67
5.6.2 <i>Avaliação da citotoxicidade dos nanossistemas</i>	71
5.6.3 <i>Avaliação da citotoxicidade mediada pela TFD com os nanossistemas</i>	77
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	91
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	93

1. INTRODUÇÃO

Câncer é um conjunto de doenças caracterizado pela proliferação desordenada de células ocasionada por alterações genéticas induzidas por agentes de natureza química, física e/ou biológica, que podem espalhar-se para outras regiões do corpo (metástase) (INCAa, 2018). De acordo com dados da *International Agency for Research on Cancer* (IARC) da Organização Mundial da Saúde (OMS), o câncer é atualmente um problema de saúde pública principalmente nos países em desenvolvimento e o câncer de mama ocupa a terceira posição entre as neoplasias que mais matam no mundo, perdendo apenas para o câncer de pele não-melanoma e de pulmão. No Brasil, a estimativa era de 59.700 mil novos casos de câncer de mama, para o ano de 2018. Quando se estima os casos de câncer de mama para 2030 no mundo, a incidência é em torno de 27 milhões de novos casos, com 62% desses levando a óbitos (OMS, 2018).

Dentre as escolhas terapêuticas para o tratamento do câncer de mama estão a cirurgia, radioterapia e os tratamentos sistêmicos: quimioterapia, imunoterapia e terapia hormonal, sendo que o emprego pode ser feito individualmente ou a partir da combinação de delas (CRICH et al., 2016). Os efeitos adversos, a inespecificidade de alguns tipos de tratamento e os altos índices de recidiva, são alguns exemplos que fazem com que a comunidade científica continue na busca de novas formas de tratamento de modo a atingir a vitória nessa luta contra as neoplasias. Nesse sentido, a nanotecnologia entra no cenário como uma plataforma tecnológica moderna, com resultados promissores tanto no desenvolvimento de processos para diagnóstico quanto terapêuticos contra diversas doenças, entre elas o câncer (GMEINER & GHOSH, 2014).

Um dos desafios da nanotecnologia aplicada à saúde está na síntese de nanossistemas biocompatíveis e biodegradáveis que sejam capazes de encapsular agentes terapêuticos e moléculas de interesse auxiliando na sua liberação de forma controlada, melhorando eficácia e direcionamento aos tumores (YU et al., 2012). Este trabalho teve como objetivo desenvolver uma estratégia nanotecnológica baseada na síntese de um nanossistema polimérico-magnético composto de PLGA e nanopartículas de óxido de ferro (NPFeO) que pudesse carrear um fotossensibilizante (FS), a alumínio cloro ftalocianina (AlClFt), já empregado na terapia fotodinâmica (TFD). Essa terapia pouco invasiva consiste na combinação de um FS e de luz em comprimento de onda específico, ambos atuando como componentes atóxicos que juntos induzem efeito tóxicos às células-alvo, por meio da formação de espécies reativas de oxigênio (ERO), levando à morte celular (MAJUMDAR et

al., 2014). O caráter magnético presente no nanossistema aqui desenvolvido possibilitará o estudo de sua utilização em combinação à TFD no intuito de elucidar possíveis alterações no perfil de viabilidade celular de modo que o nanossistema, em resposta a este campo, possa gerar calor que causará danos às células tumorais, tratamento esse conhecido como magnetohipertermia (BAÑOBRE-LÓPEZ et al., 2013).

Assim, buscando conhecer os efeitos biológicos e terapêuticos relacionados à utilização da TFD e magnetohipertermia no tratamento do câncer, em especial, o mamário, foram sintetizadas nanopartículas polimérico-magnéticas contendo AIClFt. A combinação destas duas terapias vai de encontro às tendências atuais utilizadas na clínica médica e pode, por meio de mecanismos que formam e liberam as ERO e também por uma vetorização específica das nanopartículas ao microambiente tumoral a partir do aumento de temperatura, promover a redução do número de células cancerosas. Até este estudo, os nanossistemas predominantemente desenvolvidos para esses fins eram do tipo nanoemulsões e devido a isso é necessário verificar a eficácia de outros tipos de nanossistemas com concentração dos constituintes, métodos de preparação e caracterização, bem como tempos distintos de exposição dos nanossistemas às células. Dessa forma, as características coloidais e fotofísicas foram avaliadas, assim como a sua estabilidade sob diferentes condições de armazenamento e em seguida, foi testada a eficácia e segurança destes nanossistemas em ensaios citotóxicos com a aplicação da TFD contra células tumorais de mama, de origem humana e murina.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Câncer

Câncer é um conjunto de mais de 100 doenças caracterizado pela proliferação desordenada de células ocasionada por alterações genéticas induzidas por fatores de natureza química, física e/ou biológica que invadem tecidos adjacentes e órgãos distantes (metástase), por meio de sistemas sanguíneo e linfático (RUDDON, 2007; WEINBERG, 2014; INCAa, 2018). Além disso, existem alguns marcadores tumorais chamados de “*Hallmarks of cancer*” (FIGURA 1) que conferem às células neoplásicas algumas características a mais que as diferem de células saudáveis (HANAHAN et al., 2017).

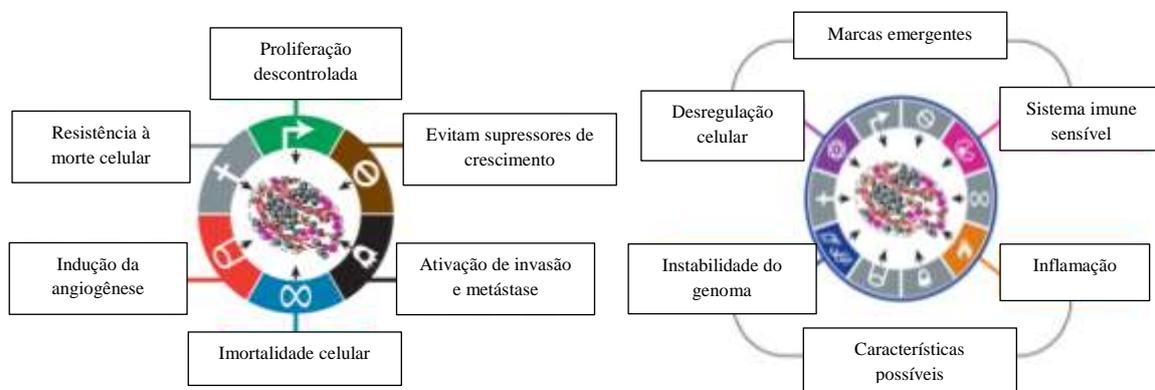
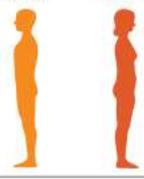


Figura 1. Representação dos principais marcadores celulares tumorais. Adaptado de Hanahan et al. (2017).

O surgimento dessa patologia está fortemente relacionado a fatores ambientais, alterações genéticas (HANAHAN et al., 2017; INCAa, 2018) e o risco é aumentado através das mutações genéticas, as quais podem ser hereditárias ou adquiridas durante a vida do indivíduo decorrentes de erros durante a divisão celular (VECCHIO et al., 2018). O desenvolvimento e progressão dos diversos tipos de neoplasias são influenciados pela intensidade, duração da exposição, e associação de entre diferentes fatores, tais como: agentes que impedem sua proliferação, capacidade de escape à apoptose e ao sistema imune, formação de novos vasos sanguíneos (angiogênese) e a incorporação destes leva à invasão tecidual e metástase (RUDDON, 2007; CHAMMAS et al., 2013; MONGE-FUENTES, 2014).

De acordo com dados da *International Agency for Research on Cancer* (IARC) da Organização Mundial da Saúde (OMS), o câncer é atualmente um problema de saúde pública principalmente nos países em desenvolvimento e, a partir de uma estimativa de 2012, comprovou-se a incidência de 14,1 milhões de novos casos da doença, com 8,2 milhões de mortes no mundo para 2018. Pela ordem desse estudo, excluindo o câncer de pele não

melanoma, as neoplasias com maiores índices registrados foram de pulmão com 1,8 milhões de casos novos, seguida do câncer de mama com 1,7 milhões e logo depois a próstata com 1,1 milhões (IARC, 2018). Mais recentemente, dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA) (INCAb, 2018) mostram que no ano de 2018 foram estimados cerca de 600 mil novos casos de câncer no Brasil e que, excluindo o mais comum que é o câncer de pele não melanoma, os mais esperados para os homens foram próstata (68.220 mil), traqueia, brônquio e pulmão (18.740 mil) e cólon e reto (17.380 mil); já para o sexo feminino mama (59.700 mil), cólon e reto (18.980 mil) e colo do útero (16.370 mil) (FIGURA 2).

Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%
Próstata	68.220	31,7%			Mama Feminina	59.700	29,5%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	18.740	8,7%			Cólon e Reto	18.980	9,4%
Cólon e Reto	17.380	8,1%			Colo do Útero	16.370	8,1%
Estômago	13.540	6,3%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	12.530	6,2%
Cavidade Oral	11.200	5,2%			Glândula Tireoide	8.040	4,0%
Esôfago	8.240	3,8%			Estômago	7.750	3,8%
Bexiga	6.690	3,1%			Corpo do Útero	6.600	3,3%
Laringe	6.390	3,0%			Ovário	6.150	3,0%
Leucemias	5.940	2,8%			Sistema Nervoso Central	5.510	2,7%
Sistema Nervoso Central	5.810	2,7%			Leucemias	4.860	2,4%

*Números arredondados para múltiplos de 10.

Figura 2. Distribuição dos 10 tipos de câncer mais incidentes no Brasil estimados para o ano de 2018, excluindo o câncer de pele não melanoma, de acordo com o Instituto Nacional de Câncer (INCA). Adaptado de <<http://www1.inca.gov.br/estimativa/2018/estimativa-2018.pdf>>. Acesso em: 17 de jan. 2019.

2.2 Câncer de mama

De acordo com dados do INCA (INCAc, 2018) o câncer de mama é uma doença altamente heterogênea, por isso detém a capacidade de evoluir de diferentes formas uma vez que algumas crescem de maneira rápida e outras têm o desenvolvimento mais lento (INCAc, 2018). Na história, esse tipo de câncer é uma das formas mais recorrentes em humanos, por exemplo, desde o século XVIII existem teorias sobre sua origem e a mais conhecida é a que liga os nódulos linfáticos ao aparecimento dessa neoplasia. Achados sobre essa ser uma doença localizada fez surgir uma abordagem de tratamento baseada na retirada do tecido mamário, nódulos linfáticos e músculos do peito (mastectomia) que foi inicialmente descrita por William Halstead em 1882 e que se tornou padrão por um período de 100 anos (LEOPOLD, 2000; OLSON & TARBOX, 2004).

O câncer de mama pode ser classificado em triplo negativo, HER2 positivo, luminal A e luminal B considerando aspectos moleculares das células neoplásicas. Os cânceres triplo-negativo não expressam receptores de estrogênios nem de progesterona e não superexpressam o HER2; nos tipos HER2 positivos, as células não superexpressam receptores de estrogênios nem de progesterona, mas superexpressam o HER2; células cancerosas do tipo luminal A expressam receptores hormonais de estrogênios e progesterona, porém não têm

elevadas expressões de HER2, enquanto células luminal B expressam receptores de estrogênios e progesterona e também superexpressam HER2. Desses, o primeiro é o mais agressivo e metastático dificultando terapias hormonais ou a inibição de HER2 uma vez que não expressam receptores de células conhecidos, como o estrógeno e progesterona (FERTIG et al., 2015; WINSLOW et al., 2015). A partir do crescimento de um tumor primário, ocorre o processo de angiogênese que facilita o metabolismo do tumor e constitui um local de fuga para as células tumorais que entram no sistema circulatório do organismo podendo atingir outros órgãos (HUNTER et al., 2008; LIZOTTE et al., 2016). De acordo com Scully et al. (2012) essa migração é regulada por moléculas de quimiocinas e citocinas que, no câncer de mama, desempenham papel na motilidade das células tumorais e quando secretadas agem na adesão, manutenção e na proliferação celular.

Segundo o INCAAd (INCAAd, 2018), os sintomas do câncer de mama são característicos a partir do aparecimento de um nódulo indolor e firme nas mamas e/ou axilas, inchaço parcial nas mamas, retração cutânea, inversão do mamilo, edema ou descamação da mama, dor, hiperemia e secreção papilar. Todos esses indícios aparentes advêm de um conjunto de fatores de riscos, entre eles a idade que mostra uma chance elevada até os 50 anos; a hereditariedade na qual mutações nos genes BRCA1, BRCA2 e p53 aumentam bastante o risco; os fatores sociais como excesso de peso, sedentarismo, consumo de tabaco, álcool; os fatores ambientais como exposição à radiação ionizante e os fatores reprodutivos da própria mulher que podem estar relacionados a uma menarca precoce, a menopausa tardia, a primeira gravidez após 30 anos, a nuliparidade e o uso de hormônios exógenos (SILVA et al., 2010; TORRE et al., 2015; OMS, 2018).

O câncer de mama é o com maior incidência em mulheres em todo o mundo (OMS, 2018). No Brasil, em 2018, foram estimados cerca de 59.700 casos novos de câncer de mama; essa patologia também acomete o sexo masculino, no entanto, representando apenas 1% do total de casos da doença no país. Quando se estima os casos de câncer de mama para 2030 no mundo, a incidência é em torno de 27 milhões de novos casos, com 62% desses levando a óbitos (OMS, 2018).

Liang et al. (2014) falam que a prevenção correta e descoberta em estágio recente do câncer são os fatores com maior relevância para a redução do índice de mortalidade dos pacientes. A escolha do tratamento a ser aplicado depende da fase em que se encontra a doença, do histórico do paciente, da localização e tamanho do tumor sendo que essa escolha vem sendo realizada com o objetivo de não retirada por completo da mama, nem mutilação aparente do local acometido buscando melhora na qualidade de vida dos pacientes (ACS,

2013; INCAe, 2018). Nesse aspecto, em 1988 a *Food and Drug Administration* (FDA) aprovou o trastuzumab – um anticorpo monoclonal – para tratamento de um tipo de câncer de mama, o HER2 positivo que teve um alto impacto na sobrevivência de pacientes com tais tumores (SHEPARD et al., 2008). HER2 é uma proteína pertencente a uma família de quatro tirosina-quinases receptoras transmembranares que medeiam o crescimento, diferenciação e sobrevivência de células e sua superexpressão. Ao ligar-se no HER2, o trastuzumab ativa células do sistema imune, detendo as células tumorais e também impede que a proteína transmita sinais que estimulam o crescimento de células que o superexpressa (SOLIMAN, 2013).

Outras abordagens terapêuticas a serem aplicadas para tratamento do câncer de mama são a cirurgia, radioterapia e os tratamentos sistêmicos: quimioterapia, imunoterapia e terapia hormonal, sendo que o emprego pode ser feito individualmente ou a partir da combinação de mais de uma (CRICH et al., 2016). A cirurgia é normalmente a primeira técnica adotada e consiste na retirada do tumor com remoção parcial ou total da mama (mastectomia), além de retirada dos linfonodos adjacentes (GIULIANO et al., 2011). Nesse procedimento podem existir falhas devido à permanência de células tumorais não removidas ou à presença de micrometástases não detectáveis (POHLMANN & SCHWARTSMANN, 2004). A radioterapia baseia-se no uso de feixes de radiação ionizante de raios X ou gama com o objetivo de induzir a morte das células tumorais e geralmente é aplicada após uma lumpectomia (retirada do tumor com uma mínima quantidade de tecido circundante normal) a fim de eliminar células de câncer que permaneceram no local mesmo após a retirada da massa tumoral (RANG et al., 2004; FERENC et al., 2011). Alguns efeitos adversos são observados com o uso dessa técnica, como por exemplo, a dificuldade de penetrar em tumores nas regiões de baixa oxigenação devido à resistência das células hipóxicas à radiação ionizante e a incidência dos feixes em células saudáveis vizinhas aos locais dos tumores (MAVROGENIS et al., 2011; NILSSON et al., 2011).

Entre os tratamentos sistêmicos está a quimioterapia que emprega o uso de medicamentos antineoplásicos para promover a destruição das células com elevada taxa de proliferação impedindo a duplicação do DNA e, nesse caso, mesmo as células saudáveis do organismo que apresentam alta taxa de mitose podem ser afetadas (WEINBERG, 2014). A adoção dessa medida de tratamento dar-se principalmente após a cirurgia onde a massa tumoral apresenta um volume exacerbado característico de metástase (CORTAZAR et al., 2014; INCAe, 2018). Alguns dos pontos negativos desse tratamento são a administração de fármacos quimioterápicos (docetaxel, paclitaxel, doxorrubicina, entre outros) em doses muito

altas resultando em toxicidade inclusive às células não tumorais, preço oneroso desses medicamentos, perda de apetite, alopecia, infertilidade, alterações cardíacas, renais e gastrointestinais (ECKSTEIN, 2011; MINKO et al., 2013; STAN et al., 2013; KAISER et al., 2014; NG et al., 2014). Vale ressaltar ainda que um dos grandes problemas desse uso medicamentoso em pacientes com câncer de mama é a falha na terapia quimioterápica que gera resistência das células às drogas por meio de alterações genéticas temporais, fenômeno conhecido como resistência a múltiplas drogas (MISRA et al., 2010; EBLEN, 2012; QIU et al., 2014; YHEE et al., 2015). Em longo prazo, tal resistência pode desencadear a recidiva dos tumores mamários em até 30% e favorecer a probabilidade do desenvolvimento de metástases (LOBBEZOO et al., 2015), além de gerar cânceres secundários (MINKO et al., 2013; STAN et al., 2013; NG et al., 2014).

A imunoterapia consiste no uso de moduladores que tornam o câncer mais vulnerável agindo na estimulação do sistema imunitário natural do organismo dos pacientes para que este combata as células tumorais, evitando o escape das mesmas (MELLMAN et al., 2011; SOLIMAN, 2013). Este tipo de terapia é emergente no estudo do câncer e, devido alterações genéticas e epigenéticas comuns às células tumorais, permite que elas sejam distinguidas das células saudáveis, trazendo assim maior especificidade ao tratamento (PARDOLL, 2012). Mesmo representando todos esses avanços na prática clínica do tratamento oncológico, a falta de especificidade, resistência aos fármacos utilizados e outros efeitos adversos como náuseas, diarreia, febre, disfunções da tireóide, fadiga e vômitos ainda são entraves a serem superados (HAMNVIK et al., 2012). Por sua vez, a terapia hormonal busca a redução ou bloqueio da ação de hormônios envolvidos no crescimento tumoral (NIH, 2009). As células tumorais do câncer de mama apresentam receptores específicos para o estrogênio e este possui um papel crítico na progressão desse tipo de câncer, por isso, os medicamentos utilizados para bloqueio hormonal são relacionados à regulação da expressão e/ou síntese do estrogênio (WEINBERG, 2014).

A partir do exposto acima, todos os métodos, apesar de apresentarem bons prognósticos aos pacientes submetidos, oferecem riscos de dano a tecidos e células saudáveis, além da possibilidade de erradicação incompleta da doença (PAUTLER & BRENNER, 2010) e de problemas sociais e psíquicos recorrentes aos pacientes (MAKLUF et al., 2005; MONTEIRO et al., 2011). Devido a isso, essas terapias muitas vezes conduzem à procura por novas formas de tratamento para o câncer e nesse sentido os avanços na área de Nanotecnologia são oferecidos como proposta de desenvolvimento de inovação contribuindo para minimizar ou até superar os riscos dos tratamentos convencionais (PANKHURST et al.,

2003) e as nanopartículas, atuando como instrumento na biomedicina do câncer para entrega específica de fármaco, têm sido promissoras (MANDAL & CHAUDHURI, 2016).

2.3 Nanotecnologia

O prefixo “nano” vem do grego “*nanos*” que, entre outros significados, representa os termos “anão” e “extremamente pequeno” fazendo referência a sua escala de tamanho que está na faixa de 10^{-9} m (NARAYANAN & SAKTHIVEL, 2010; KORBKANDI *et al.*, 2012; EUROPEAN COMMISSION, 2015). De acordo com Zhao *et al.* (2007), a primeira síntese coloidal de estruturas em nanoescala é documentada por Faraday em 1857, já o termo “nanotecnologia” foi criado por Norio Taniguchi no Japão em 1974. No entanto, o conceito e as ideias em torno dessa ciência iniciaram em 1959 pelo físico norte-americano Richard Feynman durante uma palestra intitulada “*There’s Plenty of Room at the Bottom*” (“Há muito espaço lá embaixo”) no encerramento do encontro da Sociedade Americana de Física propondo a manipulação dos átomos de forma individualizada em nanoescala com propriedades novas e diferentes das estruturas em tamanho convencional e seguindo com esses experimentos ele ganhou o Nobel de Física em 1965 (FEYNMAN, 1961; LEARY, 2010; ROZ *et al.*, 2015).

A nanotecnologia é uma área que se refere à aplicação da nanociência, o estudo dos fenômenos e da manipulação em nível atômico, molecular e macromolecular de nanomateriais com funções aprimoradas (JIMENEZ-RUIZ *et al.*, 2015; DAHMAN, 2017). O termo “nanomaterial” pode ser dito como “material com alguma dimensão externa ou interna em nanoescala ou com superfície em nanoescala” pela Organização Internacional de Normalização (GOLBAMAKI *et al.*, 2015). A nanotecnologia foi definida recentemente pela ISO 2010 como “A aplicação do conhecimento científico para manipular e controlar a matéria em escala nanoscópica fazendo uso de propriedades dependentes do tamanho e da estrutura e fenômenos distintos daqueles em ou escalas maiores” (ISO, 2010). Ela faz parte da ciência moderna e é uma das áreas de maior perspectiva tecnológica que tem como finalidade o estudo de moléculas, átomos ou demais materiais na escala de 1-100 nm modificando propriedades físicas, químicas e biológicas dos materiais quando comparados aos na escala macroscópica (MIGNANI *et al.*, 2014; MOREIRA, 2014; DAHMAN, 2017) e devido a grande área de superfície em relação ao volume, podem sofrer funcionalização, aumentando sua possibilidade de utilização na biologia (SINGH *et al.*, 2010; OSUWA & ANUSIONWU, 2011; KARIMI *et al.*, 2013) (FIGURA 3).

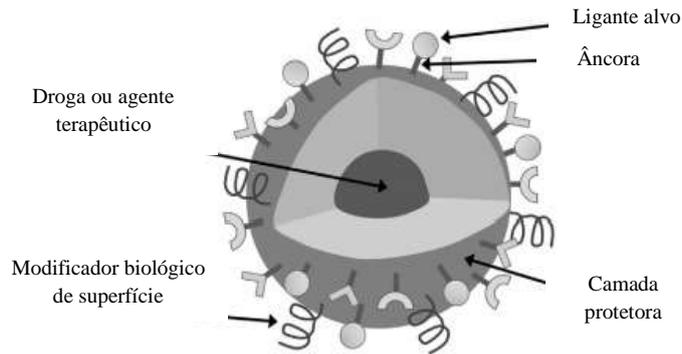


Figura 3. Esquema representativo de nanocarreadores para sistema de *drug delivery*. Adaptado de Sousa et al. (2019).

Na área médica, mais precisamente, em nanomedicina, o emprego da nanotecnologia se mostra promissor no desenvolvimento de processos para diagnóstico e/ou terapias contra diversas doenças, entre elas o câncer. Ela oferece perspectivas, principalmente, em sistemas de carregamento e liberação controlada de drogas para melhorar a terapêutica de fármacos administrados usualmente e com o emprego das nanopartículas (nanovetores) essa utilização é cada vez maior já que as chances de entrega intracelular são controladas atingindo especificamente as células tumorais, reduzindo efeitos tóxicos sistêmicos e evitando o contato e dano dos tecidos saudáveis (GAO et al., 2014; GMEINER & GHOSH, 2014; KEY & LEARY, 2014; SRIRAMAN et al., 2014). Isso se justifica, de acordo com Tatar et al. (2016), porque muitas moléculas que estão dentro das células não são atingidas pelos tratamentos propostos devido às barreiras biológicas, e por estarem em escala nanométrica muitos materiais são até 100 mil vezes menores que as células de câncer e conseguem superar essas barreiras, interagir com as células e direcionar os fármacos diretamente aos tumores de modo a terem a ação desejada (MOREIRA, 2013; SUGANYA et al., 2015). Além disso, a nanoencapsulação de um determinado composto aumenta sua permeabilidade e efeito de retenção na célula alvo ainda mais se tratando de um tecido canceroso que por si só apresenta vascularização deficiente com seu sistema linfático prejudicado (SRIRAMAN et al., 2014). Outras vantagens também são interessantes e permitem que nanopartículas tenham sua utilização favorecida em organismos vivos, entre elas, a possibilidade de ser biodegradáveis, ter suas superfícies modificadas com grupos funcionais de diversas naturezas, não sofrerem ação de enzimas que façam modificações aos compostos encapsulados, além de aumentarem o tempo de meia vida dele e os tornarem eficazes contra a resistência aos fármacos (GUO et al., 2014). Nesse sentido, vários tipos de nanoestruturas são sintetizadas e podem ser utilizadas (FIGURA 4).

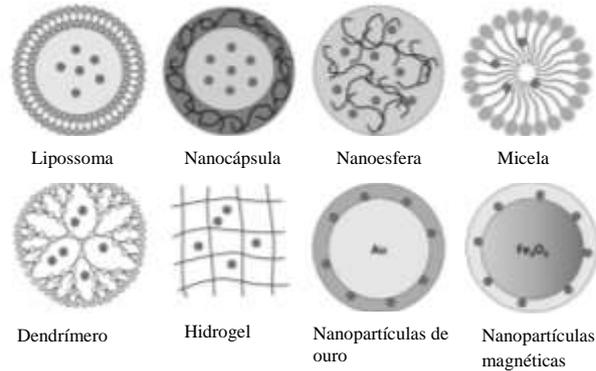


Figura 4. Principais tipos de nanocarreadores utilizados em *drug delivery system*. As esferas mostradas em alguns exemplos representam drogas e outras moléculas que podem ser encapsuladas ou ligadas covalentemente aos nanocarreadores. Adaptado de Sousa et al. (2019).

Noorlander et al. (2015) mostram que em 2015, 175 nanossistemas com aplicações em clínica médica tinham sido identificados e estavam em uso sendo que 71 foram aprovados pela agência reguladora da Europa (*European Medicines Agency* - EMA) e 40 pela americana (*Food and drug administration* - FDA). Além disso, no mesmo ano citado acima, o inventário de consumo de nanomateriais listou 622 empresas em todo o mundo que produziam até 1.814 produtos contendo formulações “nano” (VANCE et al., 2015). A interface da nanotecnologia com a biotecnologia, a nanobiotecnologia, quando aplicada às ciências da vida representa alternativa de criação, utilização, aplicação e aprimoramento de nanoestruturas em processos biotecnológicos com o intuito de transformar os sistemas biológicos, gerando novas metodologias que sejam capazes de liberar drogas em alvos específicos, além de melhorar terapias-alvo, diagnóstico, tratamento e monitoramento de doenças (PAUTLER & BRENNER, 2010; FAKRUDDIN et al., 2012). Por estar ligada em interações do ramo biológico, estudos toxicológicos visando diminuir os impactos negativos sobre os organismos são importante (SANTOS, 2014) e de acordo com Banerjee et al. (2014) ela encontra-se em fase de desenvolvimento requerendo técnicas inovadoras em grande escala que baseiam-se em abordagens econômicas, viáveis e sustentáveis.

2.4 Nanopartículas poliméricas

Um dos desafios da área da nanobiotecnologia aplicada à saúde está na síntese de nanossistemas biocompatíveis e biodegradáveis que sejam capazes de encapsular agentes terapêuticos e moléculas de interesse auxiliando na sua liberação de forma controlada, melhorando eficácia e direcionamento aos tumores (PEER et al., 2007; YU et al., 2012). Nesse sentido, o aprisionamento seletivo de drogas em polímeros é uma abordagem fundamental para a pesquisa nessa área que iniciou quando Langer e Folkman mostraram a

liberação controlada de macromoléculas via polímeros, sendo este considerado um avanço no campo de distribuição de medicamentos para o tratamento de diversas doenças, como o câncer (LANGER & FOLKMAN, 1976).

Os polímeros empregados nas formulações desses nanossistemas podem ser de duas classes: polímeros naturais e polímeros sintéticos. Dentre os naturais estão a hidroxiapatita e açúcares diversos como quitosana, hialurano, gelatina, albumina, no entanto, sua utilização em estudos ligados à área biológica ainda é restrita em comparação aos polímeros sintéticos já que esses permitem maior manipulação de suas propriedades físico-químicas que podem ser modificadas quanto ao controle da organização monomérica resultando em maior degradabilidade e compatibilidade em meio biológico, além de terem alta pureza (NAIR & LAURENCIN, 2007; MORA-HUERTAS et al., 2010). Entre os polímeros sintéticos mais utilizados estão o ácido poli (lático) (PLA), ácido poli (lático-co-glicólico) (PLGA), poli (ϵ -caprolactona) (PCL) e outros menos explorados como: etilcelulose (EC), poli (β -hidroxibutirato) (PHB), acetato de celulose, poli (acrilato) e poli (metacrilato) (NAIR & LAURENCIN, 2007; ESSA et al., 2010).

As nanopartículas poliméricas são sistemas coloidais que podem ser classificadas de duas formas: nanocápsulas e nanoesferas (FIGURA 5). As nanocápsulas são constituídas por um núcleo oleoso ou aquoso que é envolvido por partes poliméricas e as moléculas e/ou substâncias de interesse podem estar no centro desse núcleo ou adsorvida na parede polimérica; por sua vez, as nanoesferas são formadas por matrizes sólidas poliméricas que carregam os compostos dispersos nessas matrizes ou adsorvidos nela (KUMARI et al., 2010; RAO & GECKELER, 2011).

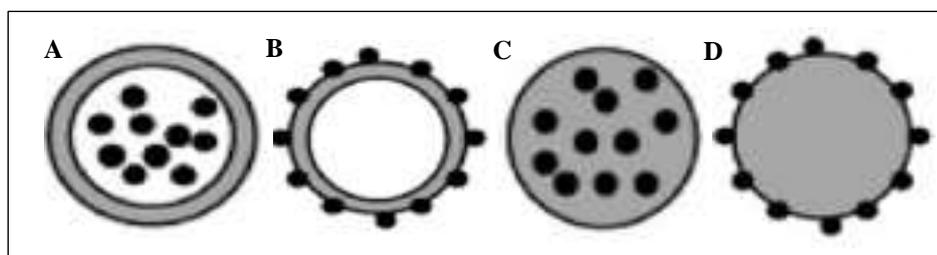


Figura 5. Tipos de nanopartículas poliméricas de acordo com a estrutura organizacional. A= drogas no centro da nanocápsula; B= drogas adsorvidas na superfície polimérica da nanocápsula; C= drogas dispersas na matriz polimérica da nanoesfera; D= drogas adsorvidas na matriz polimérica da nanoesfera. Adaptado de Kumari et al. (2010).

Dentre as principais características desses nanossistemas baseados em polímeros estão sua capacidade em transportar moléculas de diversas naturezas, inclusive hidrofóbicas (quimioterápicos, proteínas, DNA, RNA, antígenos, peptídeos, genes), favorecida

químicas e possíveis interações das moléculas e/ou medicamentos que estarão sendo carregados com os polímeros, os solventes e surfactante, destacando-se as técnicas de dispersão de polímeros pré-formados e a polimerização a partir de monômeros de polímeros (RAO & GECKELER, 2011). No entanto, esta última pode formar moléculas residuais tóxicas (REIS et al., 2017). Dessa forma, as técnicas que utilizam polímeros pré-formados são bem aceitas e entre os métodos está o que se baseia na emulsificação-evaporação do solvente sendo essa a primeira metodologia descrita para obter nanossistemas poliméricos (VANDERHOFF et al., 1979; ALIMOHAMMADI & JOO, 2014).

Nessa técnica, há inicialmente a dissolução do polímero em um solvente orgânico volátil imiscível em água, sendo essa a fase oleosa do preparo. Em seguida, para converter essa fase orgânica em uma fase aquosa normalmente utiliza-se um agente emulsionante ou estabilizador da emulsão e logo depois aplica-se alta energia no sistema (muitas vezes por meio de sonicação) para homogeneizar a solução, formando por fim a emulsão que pode ser tanto água em óleo (A/O), como óleo em água (O/A) ou ainda emulsão dupla água-óleo-água (A/O/A). Essa emulsão é levada a um evaporador de solventes que em condições de agitação constante, pressão e temperatura controlada consegue evaporar todos os solventes, realizando ainda a precipitação do polímero e formando uma suspensão de nanopartículas (VAUTHIER & BOUCHEMAL, 2009; MAKADIA & SIEGEL, 2011; REIS et al., 2017) (FIGURA 7). Após a preparação, as NPs são recolhidas da suspensão por meio de centrifugação com lavagens com água para retirada de possíveis contaminantes e com o intuito de armazenamento a longo prazo elas podem ainda serem submetidas ao processo de secagem por liofilização (ABDELWAHED et al., 2006).

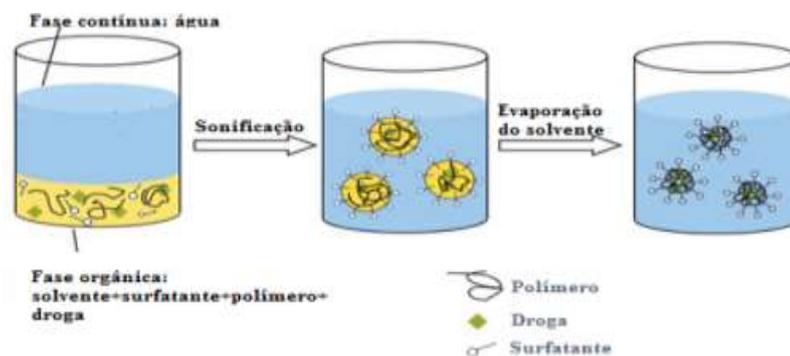


Figura 7. Representação esquemática do método de emulsificação-evaporação de solventes para a produção de nanopartículas poliméricas. Adaptado de Maia (2014).

As vantagens dessa técnica consistem na possibilidade destes nanossistemas carregarem moléculas hidrofílicas ou hidrofóbicas devido à formação de emulsões com diferentes características; na eficiência de encapsulamento; na alta reprodutibilidade; no fácil

escalonamento; no controle do tamanho das partículas e no controle da taxa de liberação (MORA-HUERTAS et al., 2010; PATEL et al., 2014; SHARMA et al., 2016). Por outro lado, problemas de escape de fármacos solúveis em água e instabilidade das biomoléculas podem ser algumas das falhas observadas na adoção desse método de preparação (VAN DE WEERT et al., 2000; PATEL et al., 2014; SHARMA et al., 2016).

Na terapia do câncer, nanossistemas poliméricos baseados em PLGA têm sido extensivamente explorados para levar, de maneira direcionada, drogas anticâncer que podem tanto ser carregadas neles, como podem estar ligadas em suas superfícies, reduzindo a toxicidade em células normais e mantendo uma liberação sítio-específica por dias ou até semanas (CHAUDHARY et al., 2018). Alguns estudos que mostram essa utilização estão resumidos na Tabela 1.

Tabela 1. Exemplos da literatura de nanossistemas constituídos de nanopartículas poliméricas a base de PLGA com seus principais resultados antitumorais *in vitro* e *in vivo*.

Nanossistema	Resultados	Referência
NPs de PLGA-PEG encapsulando NPFeO e DOX	Entrega de quimioterápicos para câncer de pulmão	Ebrahimi et al. (2016)
NPs de PLGA encapsulando garcinol	Citotoxicidade aumentada em células de melanoma e câncer de fígado em comparação	Gaonkar et al. (2017)
NPs de PLGA-PEG carreando DTX e anticorpos anti-HER2	Efeito de necrose sobre esferoides tumorais e às células de câncer que expressam HER2	Le et al. (2016)
Micelas poliméricas de PLGA-PEG e porfirina carreando drogas anticâncer	Melhor acúmulo nos tumores de câncer de mama e após irradiação houve regressão tumoral	Su et al. (2016)
Micelas de glicina-PLGA carreando MTX	Biodisponibilidade 4x maior do fármaco e efeito citotóxico de 100% em células de câncer	Kumar et al. (2017)

2.5 Nanopartículas magnéticas

As nanopartículas magnéticas (NPMs) tiveram seu primeiro relato de utilização nos anos 2000 e desde então pesquisas envolvendo esse tipo de NPs vêm sendo desenvolvidos, representando um campo de interesse. As NPMs podem ser sintetizadas em dimensões comparadas com organismos como vírus e bactérias e possuem propriedades como alta relação superfície/volume, capacidade de responder a um campo magnético, não mantendo seu magnetismo após a retirada desse campo e serem transportadas e mantidas num

local específico, funcionam efetivamente a nível celular e molecular por meio de interações biológicas sendo úteis para utilização como agentes de contraste para ressonância magnética (MRI) e como agente de entrega de fármacos (AKBARZADEH et al., 2012; ISSA et al., 2013; SALUNKHE et al., 2014; BAI et al., 2015). Dentre os materiais mais utilizados na produção de NPMs, os óxidos de ferro (FeO) são os mais comuns por apresentarem comportamento superparamagnético à temperatura ambiente e responderem a um campo magnético (WU et al., 2015; MEDRANO, 2018). Essa característica dos óxidos de ferro significa a ausência de forças coercitivas ou remanescentes que evitam interações magnéticas entre as partículas que podem levá-las à agregação (BAÑOBRE-LÓPEZ et al., 2013). Os FeO são compostos formados essencialmente pelo ferro (Fe), oxigênio (O) e grupos hidroxilas (OH) bem distribuídos na natureza em formas distintas, destacando-se a maguemita (Fe_2O_3) e a magnetita (Fe_3O_4). Além da sua fácil produção em laboratório, excelentes propriedades físicas e químicas, bem como possibilidade de manipulação dessas propriedades, o que os tornam bastantes úteis em aplicações nanobiotecnológicas (FIGUEROLA et al., 2010; ALI et al., 2014; RAMIMOGHADAM et al., 2014).

As propriedades magnéticas de um material estão relacionadas ao movimento dos elétrons dos átomos e na ausência de um campo magnético esses elétrons possuem *spins* desordenados. Do contrário, a presença de um campo magnético externo é capaz de fazer com que os *spins* se orientem, tornando as NPs magnetizadas na mesma intensidade do campo magnético aplicado (CORNELL & SCHWERTMANN, 2003; KACHKACHI, 2007; MENG LIN et al., 2010). Os materiais com características magnéticas podem apresentar diferentes estados magnéticos quando submetidos ao campo magnético externo devido às interações entre seus momentos magnéticos e podem ser divididos em magnetismo forte e fraco. Enquanto os materiais com magnetismo forte têm seus momentos magnéticos alinhando-se na direção do campo magnético aplicado e possuem um valor de magnetização resultante, os com magnetismo fraco têm seus átomos alinhados de maneira aleatória resultando em momento magnético nulo. Os materiais são então divididos em ferrimagnéticos, ferromagnéticos e antiferromagnéticos (magnetismo forte) e diamagnéticos e paramagnéticos (magnetismo fraco) (FIGURA 8) (DA SILVA, 2015; HEDAYATNASAB et al., 2017).

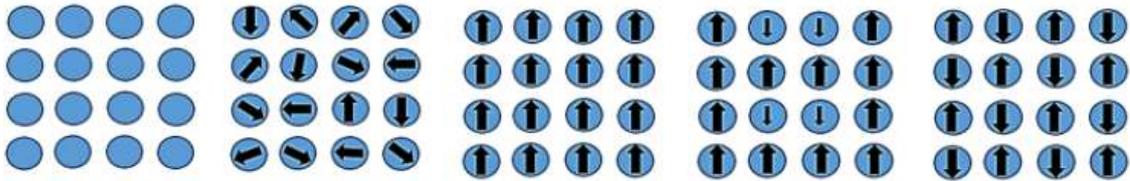


Figura 8. Alinhamento da ordenação dos *spins* dos átomos em diferentes materiais. Da esquerda para a direita: Diamagnetismo, paramagnetismo, ferromagnetismo, ferrimagnetismo e antiferromagnetismo. Adaptado de Medrano (2018).

Materiais com magnetização resultante, ao serem submetidos a um campo magnético (H) geram uma curva de magnetização (M) mostrando a variação de M quando se aumenta o valor de H até que a magnetização de saturação (M_s) seja alcançada. A curva de magnetização (FIGURA 9) apresenta histerese quando H diminui depois de haver perda de intensidade da corrente aplicada e o sistema começar a manter suas propriedades, ou seja, após atingir a M_s (FARAUDO & CAMACHO, 2010; FURLANI, 2010; MEDRANO, 2018).

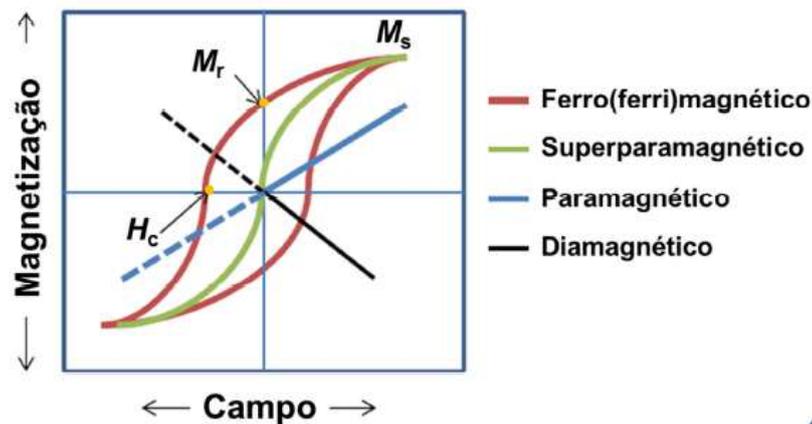


Figura 9. Magnetização (M) em função de um campo magnético externo (H) aplicado. Adaptado de Da Silva (2015). (M_s = magnetização de saturação; M_r = magnetização remanente; H_c = coercitividade).

Um aspecto importante para as aplicações biológicas das NPMs é a cobertura e funcionalização de sua superfície. Estas técnicas incluem a adição de camadas protetoras orgânicas e/ou inorgânicas e são feitas com o intuito de torná-las mais biocompatíveis e estáveis no meio biológico tornando-as assim mais específicas para determinados alvos, determinando as rotas pelos diferentes órgãos e a forma de remoção delas do organismo (AGGARWAL et al., 2009; NIEMIROWICZ et al., 2017). Porém, entre os possíveis efeitos citotóxicos das NPF₂O está a capacidade de geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) por meio da reação de Fenton que podem prejudicar a membrana plasmática, as mitocôndrias e o material genético das células (MENG LIN et al., 2010). Se administradas no organismo por via intravenosa, ao atingirem a corrente sanguínea as NPMs podem ser recobertas por componentes do sangue, como proteínas plasmáticas que formam uma camada complexa de ser desfeita. Alguns desses componentes, chamados de opsoninas, podem aumentar a

internalização do material no sangue e levar ao reconhecimento dessas partículas por células especializadas do sistema imune que podem fagocitá-las (AGGARWAL et al., 2009).

2.6 Terapia fotodinâmica (TFD) combinada com Magnetohipertermia (MHT)

A TFD é um tratamento inovador e pouco invasivo que envolve a combinação de um fotossensibilizante (FS) e de luz em comprimento de onda específico, ambos atuando como componentes atóxicos que juntos, a partir da aplicação sistêmica ou localizada do FS e excitação pela luz, induzem efeitos tóxicos a tecidos e células-alvo. Os efeitos ocorrem por meio da formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) que promovem estresse oxidativo sítio-específico e causam danos às células tumorais e a vasos sanguíneos que irrigam os tumores podendo levar à morte celular por diferentes mecanismos (MACDONALD & DOUGHERTY, 2001; MOORE et al., 2009; ROBERTSON et al., 2009; MAJUMDAR et al., 2014).

A utilização da luz na área biomédica data de mais de 3.000 anos quando antigas populações da Europa e Ásia aproveitavam da luz do sol para tratar doenças como vitiligo, raquitismo e desse período até o mundo moderno, essa exploração da fototerapia foi redescoberta no início do século XX (DOLMANS et al., 2003). Alguns fatos demonstram a importância da combinação da luz com agentes químicos entre eles, (1) em 1900, Oscar Raab observou efeitos citotóxicos do corante laranja de acridina em culturas do protozoário *Paramecium* ao serem irradiados com luz (ACKROYD et al., 2001) e posteriormente, (2) Niels Finsen ganhou o prêmio Nobel em Medicina por seus estudos com TFD utilizando luz ultravioleta (UV) no tratamento de tuberculose cutânea (PHILLIPS, 2010). A partir de então a aplicação dessa terapia que utiliza a luz aumentou na medicina e (3) o termo “fotodinâmico” foi introduzido em 1907 depois dos trabalhos de Herman Von Tappeiner e Albert Jesionek que trataram tumores de pele com uma aplicação tópica de eosina irradiada com luz branca e esses pesquisadores descreveram um fenômeno denominado de “ação fotodinâmica” (DOLMANS et al., 2003). Mais tarde, (4) em 1942, Auler e Banzer observaram o efeito de luz UV sobre o câncer (BONNETT & MARTINEZ, 2001) e a partir disso diversos achados relacionando os efeitos terapêuticos da luz em tratamento de patologias como o câncer foram descritos, como por exemplo, (5) em 1972 foi demonstrado que a combinação de propriedades de localização e fototoxicidade de porfirinas poderiam matar células de câncer, segundo estudos de Diamond e outros pesquisadores; (6) já em 1976 Kelly Snell iniciaram estudos com pacientes humanos portadores de câncer de bexiga e (7) em 1978 Dougherty e colaboradores desenvolveram outros estudos clínicos envolvendo a aplicação de TFD em

humanos (BONNETT & MARTINEZ, 2001; DOLMANS et al., 2003). Por Isso, (8) ela foi a primeira técnica aprovada pela Associação Americana de Drogas e Alimentos (*Food and Drug Administration* - FDA) que utiliza em sinergia a luz e fototerápicos para tratamento clínico de neoplasias em diferentes partes do corpo (ARUMAINAYAGEM et al., 2010; BARNES et al., 2009; NCI, 2011) e devido sua especificidade e seletividade, além de não oferecer riscos aos tecidos saudáveis adjacentes aos tumores tem sido alvo de várias pesquisas (ROBERTSON et al., 2009; VITTAR et al., 2010).

No estudo de TFD existem três componentes básicos necessários: o FS, a luz visível e o oxigênio molecular. As reações começam a ocorrer quando o FS entra em contato com as células por meio da membrana plasmática por meio de via tópica, oral, intravascular ou intratumoral, interagindo a nível intracelular através de permeação por difusão, osmose e ainda por endocitose e aguardado um tempo para sua distribuição e acúmulo no local de interesse, aplica-se irradiação com luz em comprimento de onda na faixa em torno de 600 a 900 nm e ele tem suas moléculas absorvendo fótons de luz que saem do estado fundamental para um estado singleto excitado (estado de energia maior e de vida mais curta). Quando neste estado excitado, o FS pode voltar ao estado fundamental ou então passar rapidamente para o estado tripleto (*spin* dos elétrons excitados se invertem para formar estado de vida longa) que pode reagir diretamente com uma célula ou membrana celular ou com moléculas de oxigênio singleto (1O_2) por dois mecanismos fotoquímicos diferentes dependendo do tipo de FS e das concentrações de oxigênio molecular e dos substratos (MROZ et al., 2011; GARG & AGOSTINIS, 2014).

No mecanismo tipo I, há transferência de prótons do FS para substratos orgânicos celulares (lipídeos, proteínas, ácidos nucleicos) formando radicais livres que ao interagirem com o oxigênio molecular geram as ERO como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ânion superóxido (O_2^-) e radical hidroxil (OH^-). O mecanismo tipo II está relacionado à transferência de energia do FS no estado tripleto para o 3O_2 no estado fundamental formando 1O_2 altamente reativo e considerado o responsável pelos efeitos oxidantes da TFD uma vez que, por meio de ligações covalentes fortes, oxida biomoléculas próximas ao FS acumulado que são suficientes para promover a morte celular (CASTANO et al., 2004; REGINATO et al., 2013) (FIGURA 10). A ação antitumoral mediada por TFD baseia-se na morte de células de câncer por meio da formação direta de ERO, pelo ataque da vascularização do tumor causando morte por falta de nutriente e/ou oxigênio na região dos tumores e ainda pelo reforço ou ativação do sistema imune adaptativo contra as células defeituosas (XIANG et al., 2007; ZHENG et al., 2016).

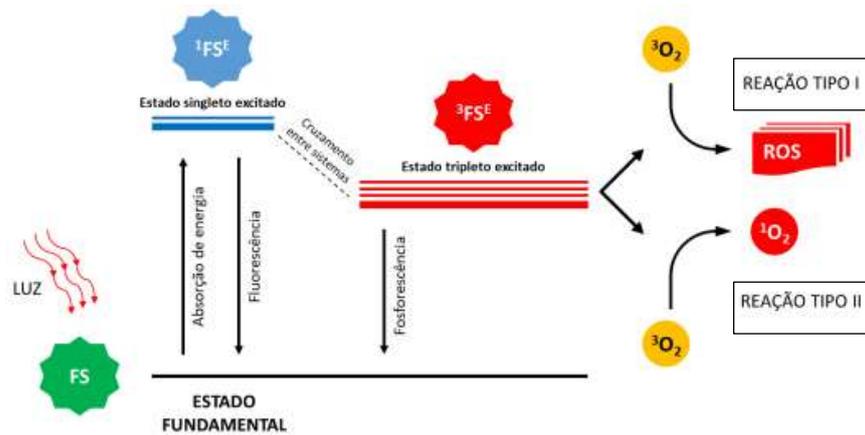


Figura 10. Esquema representativo do diagrama de Jablonski (alterado) mostrando as trocas energéticas durante reações na terapia fotodinâmica. (FS= fotossensibilizador; $^1\text{FS}^{\text{E}}$ = estado singlete do FS; $^3\text{FS}^{\text{E}}$ = estado tripleto do FS; $^3\text{O}_2$ = estado tripleto do oxigênio; $^1\text{O}_2$ = estado singlete do oxigênio; ERO= espécies reativas de oxigênio). Adaptado de Santos (2018).

Tendo em vista todos esses procedimentos e reações, aliando as nanopartículas como carreadoras de fármacos fotossensíveis, são encontrados avanços no direcionamento específico deles para regiões desejadas, o aumento da disponibilidade desses fármacos e também na sua capacidade anfifílica que permite seu transporte por meio de corrente sanguínea e em tecidos sem que haja degradação. Além deles, o efeito de permeabilidade e retenção aumentados (EPR) que é causado por má drenagem linfática e vascularização anormal nos vasos tumorais é minimizado com a utilização de nanossistemas contendo FS e tem como resultado uma maior retenção deles nos tecidos tumorais. (LUCKY et al., 2015).

Na terapia do câncer, quando NPMs são guiadas e retidas na região tumoral, aplica-se um campo magnético alternado (CMA) de intensidade e frequência alternada que promoverá a transferência da energia eletromagnética e magnetização invertida das partículas gerando um aumento da temperatura no microambiente tumoral para algo em torno de $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ – $46\text{ }^{\circ}\text{C}$ e pode eliminar células defeituosas uma vez que elas são menos resistentes ao calor, mantendo intactas as células saudáveis e por isso sendo uma técnica promissora para o tratamento de diversos cânceres. Esse processo foi relatado pela primeira vez por Jordan et al. (2009) e é chamado magnetohipertermia (BAÑOBRE-LÓPEZ et al., 2013; DEATSCH & EVANS, 2014; SINGH e SAHOO, 2014) (FIGURA 11) que provêm de duas palavras gregas: “*hyper*” e “*therme*” que significam “subir” e “calor”, respectivamente (GAS, 2017). Essa modalidade terapêutica pode ser explicada uma vez que tumores sólidos tem seu sistema vascular desorganizado, resultando em perfusão sanguínea insuficiente, principalmente em regiões de hipóxia e baixo pH, tornando citotóxica a exposição em temperaturas elevadas por meio da desnaturação de proteínas envolvidas na síntese e reparo de DNA, além de modificações no citoesqueleto e rompimento das membranas celulares (ISSELS, 2008).

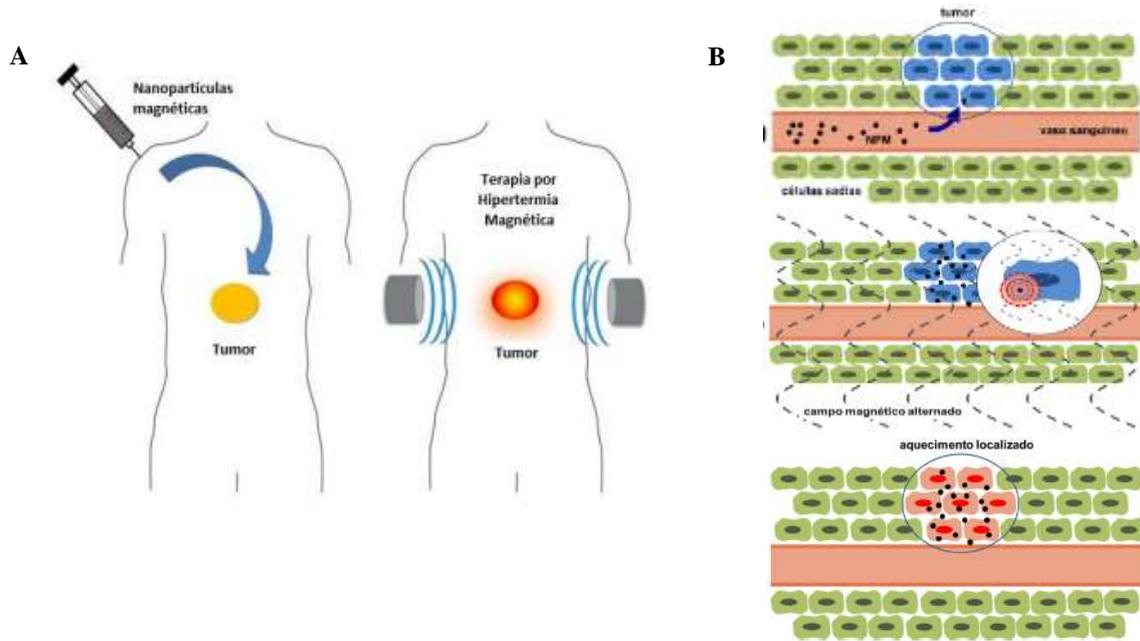


Figura 11. Representação da técnica de magnetohipertermia. A= Nanopartículas são aplicadas por via intravenosa com aplicação de um campo magnético alternado (CMA) na região tumoral com aumento da temperatura; B= A nível celular, as nanopartículas transportadas pelos vasos sanguíneos acumulam-se próximo à região tumoral e com a aplicação do campo magnético e geração de calor elas destroem o tumor. Adaptado de Percin (2016) e Da Silva (2015).

Além disso, a TFD em conjunto à MHT representam terapias promissoras no combate ao câncer, principalmente por apresentarem efeitos colaterais reduzidos em relação às terapias convencionais. (WUST et al., 2002; TEDESCO et al., 2003; PORTILHO, 2011). Essa combinação visa superar os mecanismos de resistência, a diminuição da dose de medicamentos e aumentar o efeito sinérgico produzido (SHEN et al., 2017). Vale ressaltar que a ação individual dessas duas técnicas com outras terapias oncológicas, como a quimioterapia e radioterapia, também tem sido pesquisada (GOFRIT et al., 2004; LEE et al., 2018).

No geral, células tumorais são consideradas mais resistentes à radiação do que a aumentos bruscos de temperatura (VASATHAN et al., 2005) devido à desorganização dos vasos sanguíneos da massa tumoral que não permitem a circulação do calor produzido nessa região (JORDAN et al., 1999) fazendo com que as células com menor captação de oxigênio sofram maior destruição após o aquecimento do que unicamente submetidas à radiação (AKTAS et al., 2006). De acordo com Portilho (2011), a associação da TFD com a MHT é útil no tratamento de tumores internos utilizando o acoplamento do FS a um nanossistema polimérico-magnético fazendo com que o fármaco atinja mais facilmente, por via endovenosa, o microambiente tumoral. Ainda de acordo com este estudo, ao ser entregue ao alvo intracelular, o calor gerado pode ser utilizado para romper a barreira polimérica e liberar o

fármaco fotossensibilizante, utilizando simultaneamente propriedades inerentes das duas terapias. Reforçando o exposto acima, Dereski et al. (1995) demonstraram que a MHT inibe o reparo a nível celular, tornando as células tumorais mais sensíveis à aplicação de TFD.

Diversos estudos foram desenvolvidos associando diversos tipos de nanossistemas carreando componentes magnéticos, bem como diferentes tipos de FS para atuarem em conjunto no tratamento de neoplasias. Nanossistemas polimérico-magnéticos encapsulando ftalocianina de zinco foram preparados por Feuser et al. (2015) e permaneceram em contato por três horas com as células de fibroblastos murinos L929; após 24 horas, as células foram irradiadas (3 J/cm^2) e submetidas a um campo magnético alternado (1 MHz e 40 Oe) por seis minutos. Os resultados de citotoxicidade mostram que quando tratadas apenas com TFD ou com MHT, a viabilidade celular é cerca de 70% e, quando as terapias são combinadas esse valor cai para 48%. Di Corato et al. (2015) desenvolveram magnetolipossomas contendo a temoporfina como FS e após 12 horas de aplicação da MHT (1 MHz) e da TFD com fluências de 5 e 10 J/cm^2 , a viabilidade de células de adenocarcinoma humano SKOV-3 caiu para 1%. Nos estudos *in vivo*, os autores observaram que o tratamento combinado levou à erradicação completa do tumor após nove dias de tratamento. De Paula et al. (2015) incubaram por três horas nanoemulsão magnética contendo a AICIFt com células estromais de medula óssea. Após esse período, as células foram submetidas à TFD (700 mJ/cm^2) e MHT (1 MHz e 40 Oe) com o sinergismo entre as duas terapias resultando em perda de até 70% do número de células viáveis. Neste estudo, os autores enfatizam que os resultados dependeram, em maior parte, ao efeito da luz ocasionando menor atividade mitocondrial, com consequente morte celular.

2.7 Fotossensibilizantes (FS) e Alumínio cloro ftalocianina (AICIFt)

Um grande número de FS tem sido testado visando aplicações em TFD, no entanto, de acordo com Robertson et al. (2009) são poucos os que apresentaram propriedades interessantes para essa finalidade. Para serem utilizados nesse tipo de terapia é necessário que eles apresentem algumas características, como por exemplo, o alto grau de pureza, a atoxicidade na ausência de luz em células sadias e uma boa seletividade para células tumorais, a solubilidade em meios fisiológicos, a rápida eliminação do organismo, a boa penetração nos tecidos biológicos, além de viabilidade de custo e boa produção em larga escala (PLAETZER et al., 2009; ROBERTSON et al., 2009; YANO et al., 2011).

Além destas características, o perfil de interação luminosa dos FS com os tecidos biológicos alvo é importante de se conhecer. Ao ser incidida luz nesses tecidos, ocorrem os processos de refração, reflexão, absorção e difração que são importantes no momento de avaliar a distribuição da luz e dependem do tipo de tecido e do comprimento de onda da luz que é emitida. Por sua vez, a luz utilizada deve conter propriedades espectrais dentro da faixa máxima de comprimento de onda do FS. Nos tecidos biológicos, essa absorção de luz é captada, em grande parte, devido à presença de cromóforos do tipo hemoglobina, mioglobina, melanina e citocromos que têm faixa máxima de absorção na região do vermelho visível e a do infravermelho próximo (650-1200 nm). Quando se aplica um FS que é ativado em comprimentos dentro desse limiar é possível obter aprimoramento da eficácia do tratamento uma vez que a penetração luminosa terá pouco desvio óptico (PLAETZER et al., 2009; ROBERTSON et al., 2009).

Em geral, os FS são classificados como porfirínicos ou não porfirínicos. Enquanto esses últimos apresentam uma aplicação na clínica mais defasada e como exemplos existem as antraciclina e as cianinas (O'CONNOR et al., 2009), os porfirínicos podem ser classificados como de primeira, segunda ou terceira geração, sendo que os de segunda geração, desenvolvidos a partir dos anos 80 são quimicamente mais puros, absorvem luz em comprimentos de onda maiores, causam menor fotossensibilização dérmica (ALLISON et al., 2004) e foram desenvolvidos com o intuito de suprir necessidades observadas em testes clínicos com os FS de primeira geração (CAMARGO, 2018). Como exemplos, têm-se as ftalocianinas que são corantes de coloração azul descobertos em 1907 por Braun e Tcherniac (MOSER & THOMAS, 1964) e já tiveram seu uso clínico aprovado pelo FDA (ALLISON et al., 2004).

As ftalocianinas são compostos macrocíclicos conjugados, simpétricos e aromáticos com 18 elétrons de configuração π e apresentam coloração forte dependendo do solvente, metal central e substituinte. São derivadas das azoporfirinas e a estrutura dos anéis dão a elas um alto coeficiente de absorção espectral na faixa entre 650-900 nm, correspondente ao intervalo da região do vermelho com maior penetração nos tecidos sem sofrer ação dos cromóforos endógenos, principalmente em células de câncer (LONGO et al., 2009; MUEHLMANN et al., 2015). Além disso, são moléculas térmica e quimicamente estáveis que suportam intensas radiações de natureza eletromagnéticas e são excretadas mais rapidamente do que os FS de primeira geração não sendo tóxicos na ausência de luz (GOSLINSKI et al., 2011).

As ftalocianinas têm na sua estrutura dois átomos de hidrogênio centrais que podem ser substituídos por uma variedade de compostos metálicos, como o alumínio, cloro e o zinco (KOLAROVA et al., 2007; TOMAZINI et al., 2007). A presença desses íons metálicos influencia nas propriedades fotofísicas e levam a uma elevada capacidade de geração de ERO e aumento no tempo em que eles permanecem no estado tripleto eletrônico (MAFTOUM-COSTA et al., 2008; DURMUS & AHSEN, 2010). Logo, a utilização da AIClFt tem sido reportada como uma das mais promissoras para aplicações em TFD. Ela é uma molécula constituída por um anel macrociclo tetrapirrólico com um íon metálico diamagnético de alumínio (Al^{3+}) (FIGURA 12) que fornece boas características e reforçam seu uso em TFD causando morte de células de câncer por meio do desenvolvimento de compostos com maior seletividade à região tumoral (MAFTOUM-COSTA et al., 2008; JAYME et al., 2016).

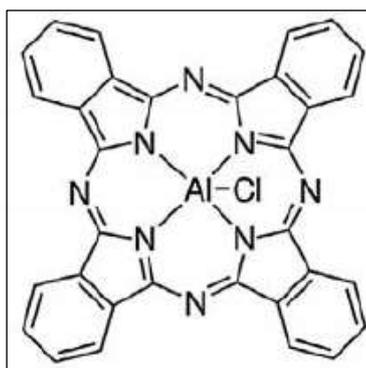


Figura 12. Molécula de alumínio cloro ftalocianina. Adaptado de Py-Daniel (2018).

Apesar das vantagens descritas nos parágrafos anteriores, para se alcançar uma TFD eficaz e segura é necessária a liberação dos FS em concentrações terapêuticas essenciais nas células-alvo, sendo absorvidos em pequenas ou inexistentes quantidades por células saudias. No entanto, um dos principais entraves para esse sucesso esperado é a conformação planar e aromática dos derivados de ftalocianinas, o que lhe denota uma característica hidrofóbica indesejável e agregação do FS devido à sobreposição π dos orbitais moleculares, que pode resultar em alterações como a redução de formação de ERO, a redução da solubilidade, a dificuldade de absorção em meios fisiológicos e o alto acúmulo de FS em tecidos saudáveis, uma vez que apenas em sua forma monomérica é que eles são fotoativos (VAN KEUREN et al., 2008; WOJTONISZAK et al., 2013; TSUBONE et al., 2014; LUCKY et al., 2015).

Dentre as estratégias para reverter tais efeitos está o acoplamento de moléculas de AIClFt a nanossistemas (ASEM et al., 2016; JOANITTI et al., 2017) que têm boas

características, como a elevada área superficial e biocompatibilidade com o meio biológico, excluindo problemas de perda dos FS por agregação e acumulando mais fármaco na região tumoral devido o acoplamento neles de grupos funcionais, além de ser uma forma simples e eficaz para transportar fármacos hidrofóbicos em meio aquoso (TINKOV et al., 2010; WANG & THANOU, 2010; ZHEN et al., 2014). Outra característica vantajosa da associação de FS a nanossistemas está na possibilidade de administração dos fármacos de maneira intravenosa, diminuindo o número de doses e reduzindo efeitos colaterais (WOJTONISZAK et al., 2013). Esses FS que começaram a ser ligados com diferentes tipos de nanossistemas são denominados de fotossensibilizantes de terceira geração e entre os nanossistemas utilizados em TFD, as nanopartículas poliméricas são um sistema muito promissor uma vez que são susceptíveis a transformações químicas no sentido de serem funcionalizadas com diferentes ligantes favorecendo a entrega efetiva ao tumor, possuem alta captação do FS, características não imunogênicas evitando resposta imunológica negativa ao serem introduzidas no organismo (CHATTERJEE et al., 2008; KIM et al., 2014). Esse tipo de nanossistema também é de fácil preparação, com a maioria dos polímeros utilizados sendo biocompatíveis e biodegradáveis, além de possuírem a capacidade de serem degradados em ambientes fisiológicos com concomitante liberação dos fármacos. Já foi relatado também que o efeito de fototoxicidade depende da natureza do polímero (BECHET et al., 2008).

3. OBJETIVO GERAL

O objetivo principal deste trabalho foi sintetizar um nanossistema composto por nanopartículas de PLGA e encapsulando nanopartículas de óxido de ferro (NPFeO) associadas ao fotossensibilizante alumínio cloro ftalocianina (AlClFt), denominado NPPMagFt, e avaliar sua aplicação na terapia fotodinâmica (TFD) contra células tumorais de câncer de mama.

3.1. Etapas

- Avaliar as propriedades coloidais e a estabilidade física do nanossistema ao longo do tempo sob diferentes temperaturas de armazenamento.
- Avaliar as propriedades fotofísicas de absorção e fluorescência do nanossistema.
- Avaliar as propriedades físico-químicas do nanossistema, como o perfil de interação das NPFeO e da AlClFt às nanopartículas de PLGA e a capacidade do nanossistema na geração de espécies reativas de oxigênio (ERO).
- Determinar a magnetização do nanossistema por meio de um campo magnético externo.
- Avaliar a morfologia do nanossistema.
- Avaliar o perfil de internalização celular do nanossistema.
- Determinar o efeito citotóxico do nanossistema utilizando diferentes concentrações de seus constituintes nas células de câncer de mama humano (MCF-7) e murino (4T1) e fibroblasto murino normais (NIH-3T3) pelo método colorimétrico de MTT.
- Determinar o efeito citotóxico da TFD nas células MCF-7, 4T1 e NIH-3T3 expostas às NPPMagFt.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Equipamentos, materiais e reagentes

As listas de materiais, reagentes e equipamentos utilizados nesse estudo estão descritas nas Tabelas 2, 3 e 4, respectivamente.

Tabela 2. Lista dos materiais utilizados nesse estudo.

Materiais	Fabricante
Cubeta de quartzo 4 faces polidas	K24-135-Q, KASVI, EUA
Frascos de Cultura (25 cm ³ e 75 cm ²)	TPP, CHE
Hemocitômetro de Neubauer	C. A. Hausser & Son, EUA
Micropipetas	Gilson e Kasvi, EUA
Micropipeta Multicanal	Gilson, EUA
Microplacas (12 e 96 poços)	TPP, CHE
Ponteiras para Micropipetas	Axygen, EUA
Tubos de plástico (<i>ependorfs, falcons</i>)	TPP, CHE

Tabela 3. Lista dos reagentes utilizados nesse estudo.

Reagentes	Fabricante
1,3-difenil-isobenzofurano (DBF)	Sigma-Aldrich Co., EUA
Antibiótico (Penicilina e Estreptomicina)	Gibco, USA
Azul Trypan	Sigma-Aldrich Co., EUA
Álcool polivinílico (PVA)	Vetec, BRA
Albumina sérica bovina (BSA)	Sigma-Aldrich, EUA
Brometo de 3-(4,5 dimetiltiazol-2-il)-2-5-difenil-tetrazólio (MTT)	Invitrogen, EUA
Bicarbonato de Sódio (NaHCO ₃)	Sigma-Aldrich Co., EUA
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Gibco, EUA
Dimetilsulfóxido (DMSO)	Cromaline, BRA

(Continua)

Tabela 3. Lista dos reagentes utilizados nesse estudo (Continuação).

Reagentes	Fabricante
Diclorometano (DCM)	J.T Baker, EUA
Etanol 98 ⁰ GL	Sigma-Aldrich Co., EUA
Ftalocianina de cloro-alumínio (AlClFt)	Sigma-Aldrich, EUA
Poli(ácido lático-co-ácido glicólico (PLGA)	Sigma-Aldrich, EUA
Soro Fetal Bovino (SFB)	Gibco, EUA
Tampão fosfato-salino (PBS)	Laborclin, BRA
Tripsina-EDTA	Gibco, EUA

Tabela 4. Lista dos equipamentos utilizados nesse estudo.

Equipamento	Modelo	Fabricante
Agitador magnético	Q221M	Quimis, BRA
Autoclave	Vitate 12	Cristófoli, BRA
Balança Analítica	AA200	Denver Instrument, EUA
Banho Maria	240-2	J. Prolab, BRA
Banho de ultrassom	Q9.5/40A	Ultronique, BRA
Centrífuga	Mikro 220R	Hettich, BRA
Citômetro de fluxo	BD FACSVers	Biosciences, EUA
Espectrofluorímetro	Fluorolog	Horiba, BRA
Espectrofotômetro acoplado a leitor de placas	Spectramax M2	Molecular Devices, EUA
Espectrofotômetro de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)	Vertex 70	Bruker, EUA
Espectrofotômetro de UV/Vis	UV-2600	Shimadzu, JPN
Incubadora de células	3130	Thermo Scientific, EUA
Fluxo Laminar	CFLV 12	Veco, BRA
Glow Discharge	K100X	EMS, EUA
Incubadora de CO ₂	3425	Thermo Scientific, EUA

(Continua)

Tabela 4. Lista dos equipamentos utilizados nesse estudo (Continuação).

Equipamento	Modelo	Fabricante
Magnetômetro SQUID	MPMS3	Quantum Design, EUA
Metalizador	SCD 050®	Blazers Union AG, Liechtenstein
Microscópio de Luz Invertido	Ck 2	Olympus. JPN
Microscópio Eletrônico de Transmissão (MET)	1011	Jeol, JPN
Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV)	JEM 7001F	Jeol, JPN
pHmetro	DM-22	Digimed, BRA
Purificador de água	Direct-Q3	Millipore, EUA
Refrigerador	Continental	Mabe, BRA
Rotaevaporador	RII	Buchi, BRA
Sonicador	Q700	Fischer Scientific
Speed Vac	SPD131DDA	Thermo Scientific, EUA
Vortéx	K45-2820	Kasvi, EUA
Zetasizer	ZS90	Malvern, Reino Unido

4.2 Preparo dos nanossistemas

As nanopartículas de óxido de ferro estabilizadas com ácido oleico (NPFeO) utilizadas nesse estudo foram cedidas pela professora Dra. Emília Celma de Oliveira, do Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás (IQ-UFG) sintetizadas de acordo com Shen et al. (2013). Inicialmente foram conduzidos estudos prévios em que foram testados dois diferentes surfactantes – PVA e BSA – com o objetivo de verificar qual era capaz de melhor estabilizar a superfície do nanossistema. Para isso, eles foram inseridos nas preparações com e sem as NPFeO e foram usados os seguintes critérios para avaliá-los: melhor estabilidade ao longo de 105 dias, além de características macroscópicas como a presença de precipitados e/ou partículas em suspensão, cor e turbidez. Por fim, o nanossistema contendo BSA apresentou características mais satisfatórias de acordo com os critérios acima e então foi explorado para os estudos posteriores.

As NPFeO foram recebidas em pó e para a obtenção do nanossistema foram utilizados 1,32 mg delas que foram adicionadas, em tubo de vidro, a 400 µL de PLGA 2% (recém preparada), 200 µL de DCM (fase oleosa) e 116 µL de uma solução de AlCl₃ em etanol (1 mg/mL) que no nanossistema desse estudo tinha uma concentração final de 40 µM ou 23 µg/mL, respectivamente. Em seguida, a mistura foi submetida à homogeneização em

vórtex por dois minutos e depois passou por procedimento de ultrassonicação por 10 segundos em banho de gelo. O método de preparação do nanossistema foi o de emulsificação-evaporação de solvente no qual, nesse estudo, consistiu na adição de 1,2 mL da fase aquosa, composta de uma solução previamente pronta de BSA 2%, na fase oleosa e logo após aplicado um novo ciclo de ultrassonicação por um minuto sob banho de gelo. A mistura resultante, uma emulsão simples água em óleo (A/O) tendo a estabilidade do seu sistema mantida pelo BSA, foi transferida para um béquer de vidro e, protegida da luz, permaneceu sob agitação magnética a 500 rpm por duas horas sendo que em seguida os solventes foram removidos por rotaevaporação. Este nanossistema foi denominado NPPMagFt, mas também foram preparados nanossistemas sem a adição das NPFeO (NPPFt), sem conter AlClFt (NPPMag) e nanossistemas sem ambos, somente com a parte polimérica (NPPs) (FIGURA 13). Na Tabela 5 estão descritos os nanossistemas com seus respectivos componentes.

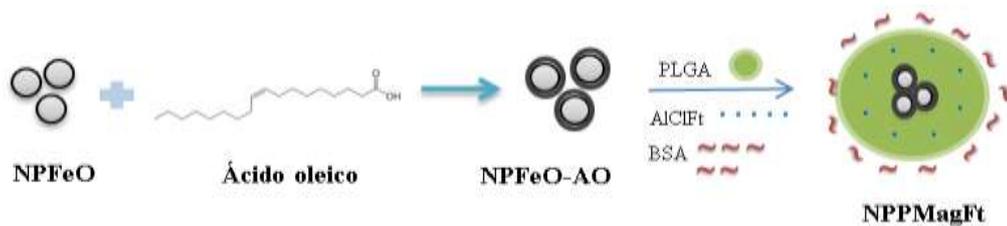


Figura 13. Representação esquemática do nanossistema preparado. Fonte: Adaptado de Shen et al. (2013). (NPFeO: nanopartículas magnéticas de óxido de ferro. AO: ácido oleico. PLGA: poli(ácido lático-co-ácido glicólico. BSA: albumina sérica bovina. AlClFt: alumínio cloro ftalocianina. NPPMagFt: nanopartículas polimérico-magnéticas contendo alumínio cloro ftalocianina).

Tabela 5. Descrição dos componentes presentes nos nanossistemas desenvolvidos e suas concentrações finais.

Componentes	NPPs	NPPMag	NPPMagFt	NPPFt
PLGA (mg/mL)	20	20	20	20
BSA (mg/mL)	20	20	20	20
NPFeO (mg)	-	1,32	1,32	-
AlClFt ($\mu\text{g/mL}$)	-	-	23	23

(NPPs: nanopartículas poliméricas. NPPMag: nanopartículas polimérico-magnéticas. NPPMagFt: nanopartículas polimérico-magnéticas contendo alumínio cloro ftalocianina. NPPFt: nanopartículas poliméricas contendo alumínio cloro ftalocianina).

4.3 Caracterização dos nanossistemas

4.3.1 Propriedades coloidais

As variáveis de diâmetro hidrodinâmico (DH), índice de polidispersão (PdI) e o potencial Zeta de superfície (PtZ) dos nanossistemas foram avaliadas através da técnica de espalhamento de luz dinâmico (DLS) e mobilidade eletroforética utilizando o equipamento

ZetaSizer. Com o intuito de acompanhar a estabilidade das amostras ao longo do tempo, alíquotas de 1 mL de cada uma delas foram mantidas em três diferentes condições de armazenamento: na geladeira (4-8 °C); em temperatura ambiente (18-25 °C) e em estufa (37 °C). Para as análises, 20 µL de cada nanossistema eram diluídos em 1.980 µL de água Milli-Q e o diluído era colocado em cubetas de poliestireno que eram postos para leitura no equipamento na temperatura de 18-25 °C, sob um ângulo de 90°, laser de 633 nm, após estabilização por 60 segundos. As medições iniciaram logo após o preparo (T0), depois foram realizadas no 7º dia e em seguida a cada 15 dias até completar 105 dias nas três temperaturas de armazenamento, conforme Figura 14 com todas as leituras sendo realizadas em triplicata com 10 corridas de cada vez.

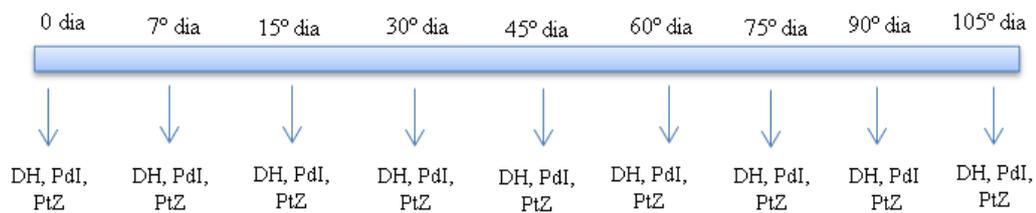


Figura 14. Esquema representativo das análises de propriedades coloidais para definir a estabilidade dos nanossistemas nas três condições de temperatura de armazenamento (4-8, 18-25 e 37 °C). (DH: diâmetro hidrodinâmico. PdI: índice de polidispersão. PtZ: potencial Zeta).

A técnica de DLS possibilita avaliar parâmetros fundamentais de nanossistemas em meio líquido, são eles: DH, PdI e o PtZ. O DH é determinado medindo o movimento Browniano – movimento aleatório de partículas em líquidos devido o ataque de moléculas ao seu redor – das partículas difusas em uma suspensão e é obtido pela iluminação que elas recebem por um laser e análise da flutuação da luz que se dispersa por elas, gerando movimento e determinando seu tamanho. O DLS pode gerar distribuições de tamanho por meio de intensidade, número e volume. Nesse estudo, esses valores são demonstrados por meio de distribuições de intensidade. O PdI, por sua vez, é obtido a partir da distribuição de tamanho por meio da difração da luz e indica a homogeneidade no tamanho das partículas quando dispersas em meio líquido. Seu valor varia de 0 a 1 sendo que quanto mais próximo de 0, menor é a variação no tamanho, ou seja, mais monodispersa é a amostra analisada (YAMAMOTO, 2014). O PtZ é uma medida da magnitude da repulsão ou atração eletrostática ou das cargas entre partículas em suspensão com o meio dispersante e oferece uma visão detalhada sobre dispersão, agregação e estabilidade de nanossistemas sendo que quando observada uma alta carga potencial positiva ou negativa essas partículas tendem a se repelir (MALVERN INSTRUMENTS, 2004). É uma técnica que mede o quão rápido as

partículas se movem em suspensão ao ser aplicado um campo elétrico, uma vez que nanopartículas têm carga de superfície que atrai íons de cargas opostas formando dupla camada elétrica ao seu redor, sendo a primeira formada por íons em sua superfície e a segunda por meio de interações de forças eletrostáticas de íons livres no fluido (RABE et al., 2011; YAMAMOTO, 2014).

4.3.2 Propriedades fotofísicas

A caracterização fotofísica dos nanossistemas foi realizada com o auxílio de um espectrofluorímetro. Essa técnica permite verificar a fluorescência dos nanossistemas por meio de excitação continuada resultando em espectros de emissão e excitação. As análises de fluorescência foram realizadas na Central Analítica de Química do Instituto de Química – IQ/UnB com comprimento de onda de excitação em 350 nm e a faixa espectral de emissão de 380-850 nm.

4.3.3 Propriedades físico-químicas

Neste estudo, todos os constituintes utilizados no preparo dos nanossistemas e os nanossistemas em si foram analisados em um espectrômetro de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) do Laboratório de Espectroscopia Óptica, do Instituto de Física – IF/UnB. Inicialmente as amostras foram secas em equipamento *SpeedVac* e com massa final em torno de 2 mg de cada uma foram misturadas em almofariz a 70 mg de brometo de potássio (KBr) previamente seco em estufa a 37 °C e macerados até homogeneização das amostras. Em seguida, foram preparadas as pastilhas de KBr por prensagem e a medição no equipamento foi feita com 48 varreduras por amostra na região de 4000 a 400 cm^{-1} .

Além da técnica acima, foi feito o ensaio de determinação da capacidade dos nanossistemas na geração de espécies reativas de oxigênio (ERO). Essa avaliação foi realizada por meio do método de degradação do 1,3-difenil-isobenzofurano (DBF) conforme adaptações nos protocolos pré-estabelecidos em estudos anteriores do grupo de pesquisa do Laboratório de Nanobiotecnologia da UnB. Essa molécula possui no espectro de absorvância um pico de absorção em torno de um 410 nm e ele foi o utilizado para estimar a quantidade de DBF total sendo que à medida que as ERO vão sendo formadas, o reagente é degradado e a sua absorvância sofre decaimento.

Para essa avaliação foi utilizado um equipamento emissor de luz desenvolvido pelo professor Dr. Paulo Eduardo Narciso de Souza do Laboratório de Softwares e Instrumentação em Física Aplicada do Instituto de Física – IF/UnB (FIGURA 15). Esse

equipamento emite luz em comprimentos de onda de 630 nm ou 660 nm e oferece possibilidade de modificação manual de variáveis como densidade de potência, fluência, tempo e distância da fonte luminosa a serem utilizadas nos ensaios.



Figura 15. Equipamento emissor de luz LED. Fonte: O autor.

Neste estudo, os nanossistemas têm concentrações equivalentes dos seus constituintes quando presentes, porém, como descrito no tópico 4.2, eles não possuem os mesmos constituintes. Portanto, nos ensaios e apresentação dos resultados com os nanossistemas em conjunto, foram utilizadas diferentes concentrações de AICIFt quando presente e a massa de PLGA correspondente à essas concentrações do fotossensibilizante foi usada como correspondente para os nanossistemas sem a AICIFt de forma que os componentes sempre tivessem a mesma proporção em relação à concentração quando na ausência de um deles. Em resumo, a Tabela 6 descreve os componentes dos nanossistemas em suas diferentes concentrações a partir de diluições da solução estoque.

Tabela 6. Diferentes concentrações de PLGA, BSA, NPFeO e AICIFt dos nanossistemas utilizadas nos ensaios de geração de ERO e ensaios *in vitro*.

PLGA (mg)	BSA (mg)	NPFeO (mg)	AICIFt (μ M)	Sigla
0,4	0,4	0,005	2	C1
1	1	0,013	5	C2
1,4	1,4	0,019	7	C3
2	2	0,026	10	C4

(PLGA: poli(ácido lático-co-ácido glicólico. BSA: albumina sérica bovina. NPFeO: nanopartículas magnéticas de óxido de ferro. AICIFt: alumínio cloro ftalocianina).

Uma solução de DBF foi preparada na concentração de 0,225 mg/mL em etanol, sendo logo após agitada em vórtex por 2 minutos e deixada em banho de ultrassom para completa dissolução do reagente na solução; esta, por sua vez, foi utilizada logo em seguida considerando a conhecida degradação gradual de DBF em solução. Para verificar a ação do fotossensibilizante, este ensaio foi realizado com 285 μL dos nanossistemas nas concentrações definidas na Tabela 6 de acordo com os seus constituintes, em microplacas de 96 poços. Em seguida, os nanossistemas foram submetidos à irradiação com laser vermelho (660 nm) a uma distância de 5 cm da fonte de luz em um espectrofotômetro acoplado a leitora de placas com comprimento de onda de 405 nm. Após isso, adicionou-se 15 μL da solução de DBF em cada poço e fez-se uma nova leitura. Os nanossistemas foram submetidos a 15 ciclos de irradiação com o objetivo de alcançar a estabilização da absorbância das amostras, sendo divididas em 11 ciclos de 5 segundos, 1 ciclo de 10 segundos, 2 ciclos de 20 segundos e 1 último ciclo de 40 segundos chegando a uma fluência total recebida pelas amostras de 10,12 J/cm^2 . Foram também preparados como controles poços com AlClFt dispersas em H_2O e EtOH nas concentrações do fotossensibilizante quando presentes nos nanossistemas e esse experimento foi realizado duas vezes de maneira independente sendo cada um feito em triplicata.

4.3.4 Propriedades magnéticas

As medidas de magnetização (M) em função de um campo magnético externo (H) foram realizadas usando um magnetômetro SQUID do Núcleo de Física Aplicada da Universidade de Brasília – IF/UnB com objetivo de determinar a M_s na temperatura de 300 K e campo alternado na faixa de -30 a +30 kOe. Os nanossistemas foram secos em *SpeedVac* e aproximadamente 20 mg de cada um foi colocado no porta amostra que é inserido em uma vareta dentro do magnetômetro. Antes de começar as análises magnéticas, foi feita a calibração do equipamento em relação à posição e amplitude de oscilação.

4.3.5 Propriedades morfológicas

A caracterização morfológica dos nanossistemas foi realizada em um MEV operando a 15 kV no Laboratório de Microscopia e Microanálise do IB-UnB. Para isso, alíquotas de 20 μL de cada suspensão dos nanossistemas foram depositados em suportes metálicos – *stubs* que foram deixados para secar por 24 horas à temperatura ambiente e após esse período sua superfície foi metalizada com ouro em um metalizador. As imagens foram obtidas em vários aumentos determinados pelo equipamento.

Para MET, 5 μL de cada um dos nanossistemas foram depositados em grades de cobre cobertas com Formvar® previamente energizadas com carga positiva, já que os nanossistemas desenvolvidos possuíam carga negativa determinada pelo PtZ no momento da análise, no equipamento *Glow Discharge* quanto à morfologia, em diferentes kV – variando de 80 a 120. Essas análises foram realizadas no Laboratório de Microscopia Aplicada às Ciências da Vida (LAMAV) do Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO) no Rio de Janeiro pela Dra. Renata Carvalho Silva.

4.4 Estudos biológicos *in vitro*

4.4.1 Linhagens celulares

Para esses ensaios foram utilizadas linhagens de células tumorais imortalizadas humanas e murinas, além de fibroblastos murinos também imortalizados, conforme Tabela 7, adquiridas do banco de células da Universidade Federal do Rio de Janeiro (BCRJ).

Tabela 7. Linhagens celulares utilizadas nesse estudo.

Linhagens celulares	Descrição
MCF-7	Adenocarcinoma mamário humano
4T1	Adenocarcinoma mamário murino
NIH-3T3	Fibroblasto murino

Neste estudo, os experimentos foram conduzidos usando-se alíquotas dessas células que já se encontravam em nitrogênio líquido no estoque de células do Laboratório de Nanobiotecnologia do IB-UnB. Todos os ensaios *in vitro* foram realizados em incubadora de células à temperatura de 37 °C, com 80% de umidade e 5% de CO₂.

4.4.2 Meio de cultivo

Para todas as linhagens celulares foi utilizado o meio de cultivo DMEM estéril tamponado com NaHCO₃ com pH de 7,2. Este foi suplementado com 10% (v/v) de SFB e 1% (v/v) de solução de antibiótico (100 U/mL de penicilina e 100 $\mu\text{g/mL}$ de streptomomicina).

4.4.3 Manutenção das linhagens celulares

As células foram cultivadas, após descongelamento, em garrafas de cultura de 25 cm² contendo 4 mL de meio de cultivo completo e mantidas em incubadora. Os experimentos *in vitro* aconteceram a partir do estágio de confluência celular igual ou próximo a 80% visualizado com o auxílio de um microscópio de luz invertido onde também era possível acompanhar mudanças na morfologia e detectar possíveis contaminações dentro das garrafas,

seguindo o padrão pré-estabelecido na rotina de trabalho do Laboratório de Nanobiotecnologia.

4.4.4 Subcultivos celulares

O estabelecimento dos subcultivos foi realizado a partir do momento em que as células chegavam à confluência aproximada de 80% onde o meio de cultivo era descartado e em seguida adicionados 2 mL de tripsina (0,25%) nas garrafas permanecendo por cinco minutos na incubadora – processo de passagem das células. Após esse tempo, o desprendimento das células era observado no microscópio de luz e em seguida adicionado meio de cultivo completo no mesmo volume de tripsina com o objetivo de inativá-la. O conteúdo total da garrafa era então transferido para tubos estéreis do tipo *falcon* de 15 mL que era centrifugado a 750 g por três minutos. O sobrenadante era descartado e o *pellet* ressuspensionado com 1 mL de meio de cultura completo.

4.4.5 Plaqueamento das células

Para determinação do número de células viáveis a serem usadas nos ensaios *in vitro*, 10 µL das células anteriormente ressuspensionadas com 1 mL de meio de cultura foram colocados em um microtubo de 0,6 mL e adicionados 40 µL do corante azul de tripan (0,4% em PBS). O princípio do uso desse corante é que ele só penetra nas células com membrana plasmática defeituosa, indicando que a célula não está viva. Por outro lado, quando a membrana das células está íntegra, o corante não entra ou é rapidamente excluído e a coloração nesse caso fica mais clara. Dessa mistura que contém o corante, foram retirados 10 µL e colocados em hemocitômetro de Neubauer. A concentração de células/mL foi determinada baseando-se na contagem delas nos quadrantes laterais (FIGURA 16) sendo esse número inserido na fórmula abaixo:

$$\text{Número de células em 1 mL} = \frac{\text{número de células contadas}}{\text{número de quadrantes contados}} \times \text{Fator de diluição} \times 10^4$$

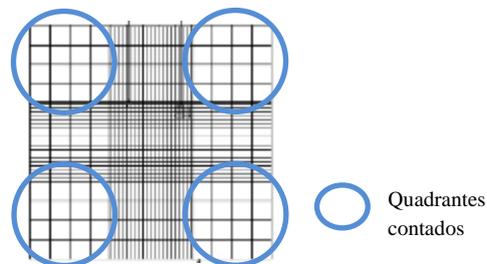


Figura 16. Esquema da câmara de Neubauer mostrando os quadrantes contados para determinar o cálculo do número final de células em cada ensaio. Fonte: Protocolo padrão do Laboratório de Nanobiotecnologia – IB/UnB.

Depois de feita a contagem, as células eram transferidas para microplacas de cultura em número de acordo com os experimentos a serem realizados. Além disso, 50 μL de cada suspensão de células eram repassados para uma nova garrafa de cultivo (nova passagem celular) para acompanhar crescimento, morfologia e proceder às repetições dos ensaios quando necessário.

4.4.6 Incorporação dos nanossistemas nas células

Para visualizar a internalização das NPPMagFt nas linhagens celulares, foram padronizadas quatro diferentes concentrações de AlClFt – 2 μM , 5 μM , 7 μM e 10 μM presentes em 800 μL do nanossistema. Os procedimentos consistiram no plaqueamento de 5×10^4 de células MCF-7 e 4T1 e 3×10^4 de células NIH-3T3 em microplacas de 12 poços e as células mantidas em incubadora. Transcorridos 24 horas de crescimento celular, o meio de cultivo foi removido e adicionado o nanossistema nas concentrações estabelecidas do fotossensibilizante ou nas concentrações dos demais componentes quando não presente a AlClFt, conforme Tabela 6 e incubadas por 1, 2, 4, 6 e 24 horas. Após o término de cada um desses tempos, os tratamentos foram removidos dos poços e as células foram lavadas com 500 μL de PBS gelado e logo após foram adicionados 200 μL de tripsina-EDTA 0,25% para desprender as células aderidas às placas permanecendo por três minutos na incubadora. 500 μL de meio de cultivo novo foram colocados nos poços para inativar a tripsina e as células com o sobrenadante foram dispostas em tubos tipo *ependorf* e centrifugados a 2.500 rpm, 4 °C por cinco minutos. Depois da centrifugação, o sobrenadante foi descartado e 200 μL de meio de cultivo novo e 200 μL PBS foram adicionados nos tubos e as células levadas para análise no citômetro de fluxo. Durante esses ensaios, foram contados dez mil eventos por amostra feitos em triplicata.

4.4.7 Citotoxicidade dos nanossistemas

O ensaio de MTT é um dos mais utilizados para avaliar a viabilidade celular em ensaios biológicos. Trata-se de um ensaio colorimétrico, inicialmente descrito por Mosmann (1983), que quantifica, de forma indireta, as células viáveis por meio da redução do Brometo de (3-[4,5-dimetiltiazol-2yl)-2-5-difenil tetrazolium]) (MTT) (coloração amarela) em um composto chamado formazan (coloração roxa) por meio da ação de enzimas mitocondriais, principalmente desidrogenases, de células ativas (FIGURA 17). Ao final, a viabilidade celular é indicada pela formação dos cristais de formazan no meio que são quantificados por espectrofotometria.

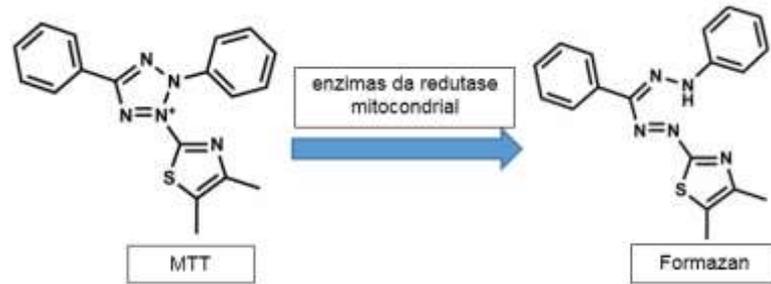


Figura 17. Metabolização do MTT em sal de formazan reduzido por enzimas mitocondriais de células viáveis. Fonte: Adaptado de Medrano (2018).

Para a realização desses experimentos, foram semeadas 5×10^3 células das linhagens MCF-7 e 4T1 e 3×10^3 células de NIH-3T3 em microplacas de 96 poços. Após 24 horas de crescimento celular em incubadora, o meio de cultura foi substituído e as células foram expostas a 200 μL dos nanossistemas e à AICIFt livre, conforme especificado na Tabela 6, sendo em seguida incubadas por 24 horas.

Após o tempo de tratamento das células com os grupos experimentais, o meio de cultivo foi descartado e adicionado neles 150 μL de uma solução de MTT (0,5 mg/mL) a 10% em meio de cultivo novo. As placas foram então colocadas na incubadora e permaneceram em repouso, protegidas da luz, por duas horas. Depois, o MTT foi retirado e substituído por 100 μL de DMSO para dissolução dos cristais de formazan. O conteúdo dos poços foi homogeneizado e após três minutos a absorbância dos poços foi mensurada a 595 nm por meio de espectrofotômetro conjugado a uma leitora de microplacas. Foram realizados, para cada linhagem celular, experimentos com três repetições em triplicata e os resultados obtidos foram expressos como porcentagem de viabilidade celular em relação ao controle (meio DMEM completo com células, sem nenhum tratamento, com viabilidade em 100%).

4.4.8 Citotoxicidade mediada pela TFD com os nanossistemas

Este ensaio foi realizado com o intuito de avaliar a eficácia dos nanossistemas na TFD. Os procedimentos foram adaptados do descrito em Rodrigues (2018). Sendo assim, foi realizado o plaqueamento das células nas mesmas condições do tópico anterior e após 24 horas de incubação, o meio de cultivo foi descartado e as células foram expostas apenas a menor (C1) e a maior (C4) concentração dos nanossistemas e da AICIFt livre, definidas na Tabela 6, em triplicata, por 15 minutos e quatro horas, em incubadora. Células sem qualquer tratamento foram utilizadas como controle.

Ao término de cada um desses tempos, as células foram lavadas com PBS gelado duas vezes e irradiadas com equipamento de emissão de luz, mostrado na Figura 15, com

comprimento de onda de 660 nm, por 10 minutos e com uma distância de 10 cm da fonte de luz para a placa. Nessas condições, a densidade de energia chegou a 23 J/cm^2 e enquanto uma placa era submetida à irradiação para averiguar a fototoxicidade, outra idêntica era mantida no escuro para verificação da toxicidade nessa condição.

A Figura 18 ilustra como foram dispostos os grupos experimentais na microplaca de 96 poços.

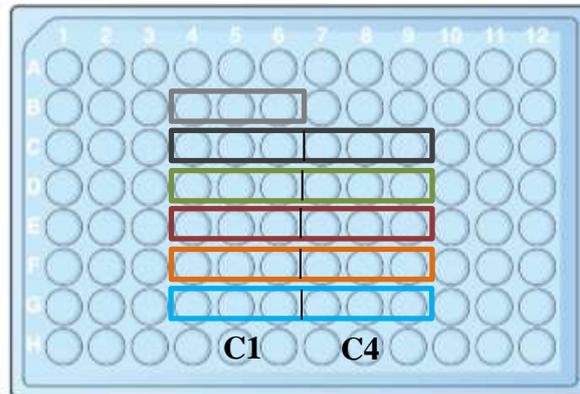


Figura 18. Disposição dos grupos experimentais, em duas concentrações, nas placas para o ensaio de TFD. Poços em cinza: controle (células com meio de cultivo completo, sem tratamento); Poços em preto: AlClFt em H_2O ; Poços em verde: NPPs; Poços em vermelho: NPPMag; Poços em laranja: NPPMagFt; Poços em azul: NPPFt (AlClFt: alumínio cloro ftalocianina. H_2O : água. NPPs: nanopartículas poliméricas. NPPMag: nanopartículas polimérico-magnéticas. NPPMagFt: nanopartículas polimérico-magnéticas contendo alumínio cloro ftalocianina. NPPFt: nanopartículas poliméricas contendo alumínio cloro ftalocianina).

Após a irradiação ou incubação no escuro, as células foram lavadas com PBS gelado e depois um novo meio de cultivo foi adicionado. As placas, protegidas da luz com papel alumínio, foram colocadas na incubadora por 24 horas e finalizado esse período foi realizado o teste colorimétrico de MTT conforme descrito no tópico 4.4.7.

4.5 Análises estatísticas

Os dados obtidos nos diferentes ensaios de caracterização e atividade biológica *in vitro* deste estudo foram plotados e os gráficos construídos usando o programa Origin Pro[®] 8 (Origin Lab Corporation) e/ou GraphPad Prism 6. Foram realizados os testes estatísticos de análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste de Tukey para os dados de estabilidade coloidal e o teste de Bonferroni para os dados dos ensaios *in vitro*, todos com um nível de significância de 95% ($p < 0,05$).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Avaliação das propriedades coloidais

Os nanossistemas preparados não apresentaram formação de precipitados ou a presença de partículas em suspensão. A cor e turbidez das soluções foram de acordo com os componentes presentes em cada nanossistema e na Figura 19 estão registradas fotos após o preparo de cada nanossistemas.

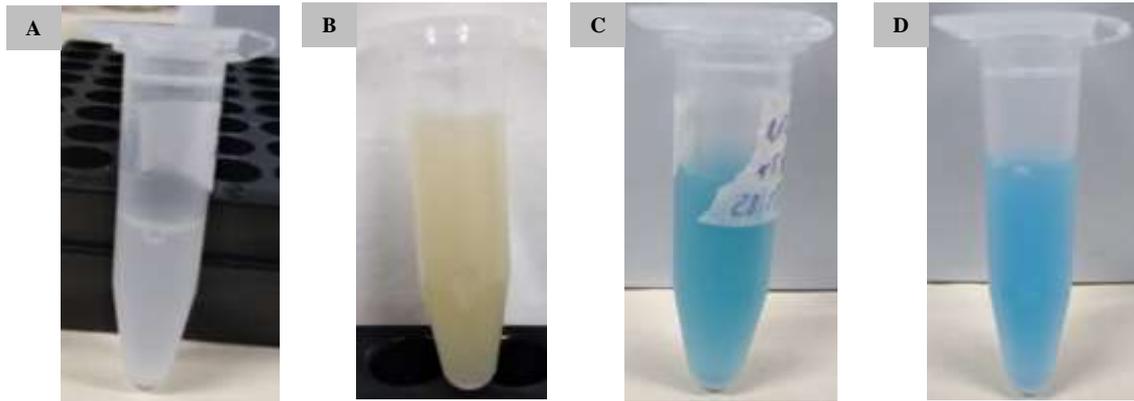


Figura 19. Registro dos nanossistemas logo após suas preparações. (A) NPPs; (B) NPPMag; (C) NPPMagFt; (D) NPPFt. (NPPs: nanopartículas poliméricas. NPPMag: nanopartículas polimérico-magnéticas. NPPMagFt: nanopartículas polimérico-magnéticas contendo alumínio cloro ftalocianina. NPPFt: nanopartículas poliméricas contendo alumínio cloro ftalocianina).

De acordo com Baek & Kun (2013), a caracterização coloidal de nanossistemas é imprescindível quando a sua utilização é o carregamento de fármacos e/ou moléculas para fins terapêuticos. Após o preparo, os nanossistemas tiveram suas medidas de DH, PdI e PtZ mensuradas no ZetaSizer obtendo as médias das análises. Os resultados estão expressos na Tabela 8.

Tabela 8. Valor médio das propriedades coloidais dos nanossistemas logo após sua preparação (Média de triplicatas \pm desvio padrão da média).

Nanossistemas	DH (nm)	PdI	PtZ (mV)
NPPs	186,8 \pm 0,5	0,116 \pm 0,02	-36,4 \pm 1,1
NPPMag	255,9 \pm 4,3	0,133 \pm 0,05	-36,2 \pm 1,3
NPPMagFt	218,8 \pm 2,2	0,097 \pm 0,02	-32,3 \pm 1,4
NPPFt	200,5 \pm 1,1	0,097 \pm 0,01	-28,2 \pm 1,1

(NPPs: nanopartículas poliméricas. NPPMag: nanopartículas polimérico-magnéticas. NPPMagFt: nanopartículas polimérico-magnéticas contendo alumínio cloro ftalocianina. NPPFt: nanopartículas poliméricas contendo alumínio cloro ftalocianina. DH: diâmetro hidrodinâmico. PdI: índice de polidispersão. PtZ: potencial Zeta).

É possível observar que as amostras que contém características magnéticas e/ou com o fotossensibilizante apresentaram os maiores valores de DH, destacando-se as NPPMag. Ao comparar os valores de DH no T0 dos nanossistemas, observou-se que as NPPMag foram as únicas que diferiram significativamente ($p < 0,05$) dos outros nanossistemas desenvolvidos. A partir desses resultados, ressalta-se que a incorporação das NPFeO nos nanossistemas afeta os diâmetros dos mesmos após o preparo e que quando a AIClFt é incorporada, verifica-se uma redução dos diâmetro. O nanossistema sem contribuição magnética, porém com o FS (NPPFt), não difere daquele unicamente polimérico (NPPs). Não foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as médias dos valores de T0 para o parâmetro PdI nem para o PtZ quando analisados entre os nanossistemas. Além disso, todos os dados de PdI estiveram abaixo de 0,2 o que sugere uma distribuição homogênea e monodispersa das populações de partículas. O PtZ mostrou ainda que a carga de superfície foi negativa, indicando suspensões com boa estabilidade coloidal após preparadas.

Vale ressaltar que o aspecto macroscópico de todas as suspensões de NPs não mostrou, ao longo do estudo, a formação de precipitados nem partículas em suspensão, além disso, a coloração manteve-se a mesma que a observada após a preparação dos nanossistemas e mesmo sob diferentes condições de temperatura de armazenamento, não foram observadas reduções dos volumes (evaporação) das alíquotas armazenadas para o estudo dos testes de estabilidade. Nesse sentido, foi monitorada ao longo de 105 as propriedades de DH e PdI dos nanossistemas e os dados estão expressos em gráficos ao longo dos dias (FIGURA 20).

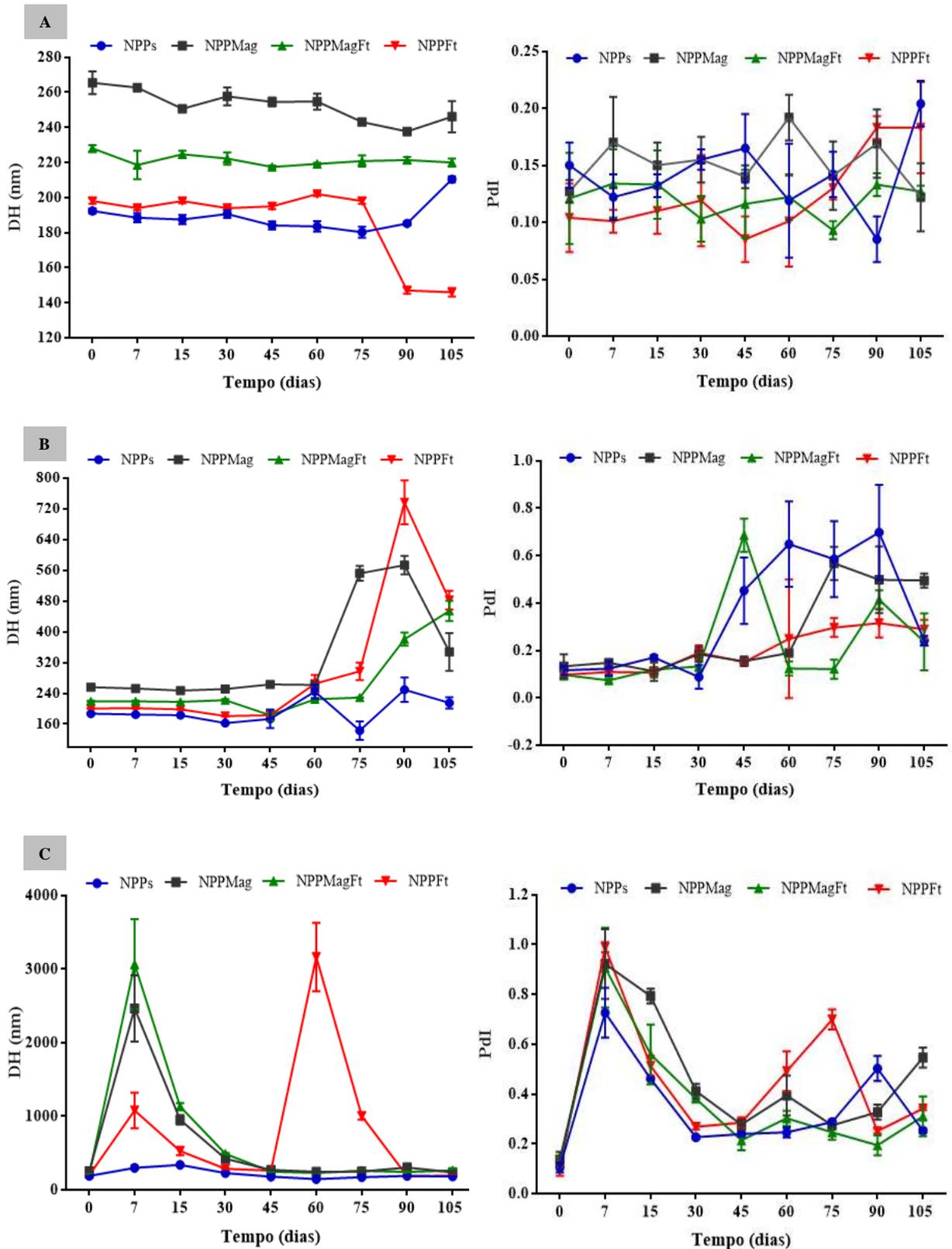


Figura 20. Características coloidais ao longo de 105 dias do diâmetro hidrodinâmico (DH) (esquerda) e índice de polidispersão (PdI) (direita) dos nanossistemas nas três condições de temperatura de armazenamento. (A) 4-8 °C; (B) 18-25 °C; (C) 37 °C (NPPs: nanopartículas poliméricas. NPPMag: nanopartículas polimérico-magnéticas. NPPMagFt: nanopartículas polimérico-magnéticas contendo alumínio cloro ftalocianina. NPPFt: nanopartículas poliméricas contendo alumínio cloro ftalocianina. DH: diâmetro hidrodinâmico).

Após 105 dias, foi possível obter gráficos com comportamentos distintos dos nanossistemas em relação à estabilidade. Quando estes permaneceram na geladeira (FIGURA 20A), foi possível observar menor amplitude de variação dos valores de DH sendo que ao final dos 105 dias o tamanho ficou em $210,4 \pm 1,6$ nm para NPPs, $246,1 \pm 9$ nm para NPPMag, $220 \pm 2,8$ nm para NPPMagFt e $146 \pm 2,1$ nm para NPPFt. Como se observa na Figura 20A, os nanossistemas com contribuição magnética (NPPMag e NPPMagFt) diminuíram o DH no 105º dia em relação ao tamanho medido logo após sua preparação (T0). Penteadó (2016) observou um aumento no DH de micelas poliméricas contendo ou não a AICIFt em diferentes concentrações após 42 dias armazenadas nessa mesma temperatura e isso pode estar relacionado ao aprisionamento de moléculas de água nas cadeias poliméricas a partir de ligações de hidrogênio (SCHERLUND et al., 2000; FOSTER et al., 2009). Em relação ao PdI, após os 105 dias, para todos os nanossistemas o valor ficou abaixo de 0,2 indicando monodispersão das partículas em suspensão, destacando-se as NPPMagFt como o nanossistema que mais permaneceu estável ao longo do tempo, tendo um PdI de 0,121 logo após seu preparo e 0,127 após 105 dias. Não foram notadas diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as nove médias de DH e PdI quando comparadas entre si ao longo dos 105 dias, demonstrando estabilidade dos nanossistemas quando acondicionados na geladeira.

Acondicionados à 18-25 °C (FIGURA 20B), os nanossistemas variaram de comportamento a partir dos 60 dias. Isso foi mais facilmente observado em NPPMag em que o aumento de DH foi de até 53% maior aos 75 dias em comparação ao valor medido anteriormente; além disso, NPPMagFt e NPPFt, aos 90 dias de armazenamento aumentaram em até 40% e 60% o tamanho em relação à medida anterior, respectivamente. Ao final das análises, apenas as NPPs tinham um DH próximo de 200 nm. Ao comparar o DH medido nos diferentes dias para um mesmo nanossistema, foram encontradas diferenças significativas ($p < 0,05$) entre valores obtidos somente a partir de 90 dias, como por exemplo, nas NPPs em que a medida do 90º dia diferia significativamente daquela do 75º dia; nas NPPFt o DH do 90º dia apresentou notável diferença daquele obtido aos 15, 30 e 45 dias; para as NPPMagFt somente na última análise, aos 105 dias, houve diferença significativa em relação ao DH do 45º dia. Por esses achados e não levando em consideração o nanossistema NPPs, mostra-se que o nanossistema com todos os constituintes – NPPMagFt – foi o mais estável em temperatura ambiente, podendo esse ser mantido nessas condições por até três meses, não sendo necessário expor as NPs ao frio ou calor por um longo período. O PdI das NPPs e NPPMagFt a partir do primeiro mês de estocagem aumentou consideravelmente, porém, no 105º dia os valores ficaram próximos de 0,23; no caso das NPPMag e NPPFt, mudanças mais

pronunciadas foram observadas após o segundo mês, sendo que o PDI chegou a 0,56 e 0,29 após o 75º dia, respectivamente, mostrando um aumento de pouco mais de três vezes em comparação à mesma medida no T0. Quando as médias de PDI obtidas de um mesmo nanossistema foram comparadas entre si, não observou-se diferenças significativas ($p < 0,05$).

Quando armazenadas em estufa à 37 °C (FIGURA 20C) é difícil estimar a estabilidade dos nanossistemas desenvolvidos uma vez que eles mostraram menor estabilidade já após o 7º dia de preparação e armazenamento e os valores observados chegaram em 2.463 ± 450 nm, 3.063 ± 613 nm e 1.078 ± 243 nm, respectivamente para NPPMag, NPPMagFt e NPPFt, em contraste, destaca-se as NPPs que permaneceram estáveis ao longo de todas as medidas. Nessa condição, os valores de DH das NPPMag e NPPMagFt após o 7º dia foram estatisticamente diferentes ($p < 0,05$) daqueles obtidos nos dias 0, 45, 60, 75, 90 e 105, mostrando que, pelo menos por duas semanas, esses nanossistemas podem ser mais sensíveis e sofrer alterações conformacionais na estrutura de seus constituintes orgânicos, levando a mudanças na superfície das NPs alterando assim seu comportamento em meio aquoso. Além disso, o DH das NPPFt após 60 dias diferiu significativamente ($p < 0,05$) dos valores do dia 0, 30, 45, 90 e 105. O PDI nessa condição também mostrou-se bastante diferente já após sete dias e mesmo demonstrando uma diminuição nas duas análises seguintes, voltou a apresentar aumento de tamanho após o 45º dia. Em relação ao T0, os índices de PDI alcançados para NPPs, NPPMag, NPPMagFt e NPPFt aumentaram 59%, 75%, 60% e 71%, respectivamente e não houveram diferenças significativas ($p < 0,05$) na comparação entre as médias de PDI de um mesmo nanossistema quando comparadas entre si.

A partir da Figura 21 é possível observar os valores de PtZ dos nanossistemas no período de análise desse estudo. Estudar as cargas adsorvidas na superfície de NPs torna-se interessante uma vez que nos estudos de atividade biológica elas são aplicadas em células tumorais que possuem seu microambiente tumoral carregado positivamente (WEINBERG, 2014). Logo, se possuírem carga oposta, o efeito sob as células cancerosas pode ser maior.

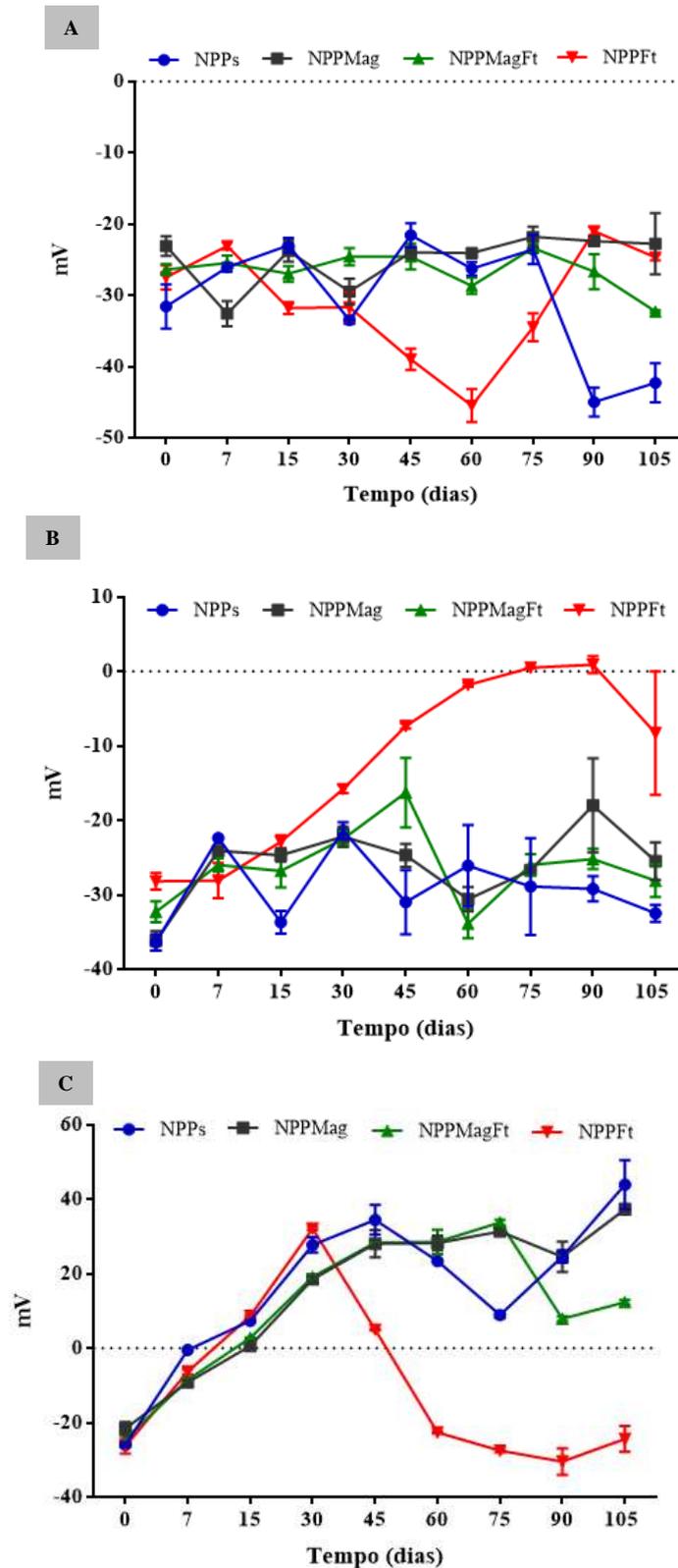


Figura 21. Características coloidais do potencial Zeta dos nanossistemas nas três condições de temperatura de armazenamento. (A) 4-8 °C; (B) 18-25 °C; (C) 37 °C (NPPs: nanopartículas poliméricas. NPPMag: nanopartículas polimérico-magnéticas. NPPMagFt: nanopartículas polimérico-magnéticas contendo alumínio cloro ftalocianina. NPPFt: nanopartículas poliméricas contendo alumínio cloro ftalocianina).

Nesse estudo é possível observar que a temperatura de armazenamento influencia na estabilidade dos nanossistemas quanto ao PtZ. Inicialmente, quando armazenados em geladeira, eles não apresentam grande amplitude de variação até 30 dias de estocagem e mantiveram-se entre -20 mV e -40 mV demonstrando boa estabilidade. A partir de então, as NPPs e NPPFt foram os nanossistemas que mais sofreram modificação nos seus valores de PtZ até o período final de 105 dias. Assim como o comportamento do DH na mesma temperatura de armazenamento de 4-8 °C, as NPPMag e NPPMagFt foram as que menos tiveram modificação nos índices de PtZ; enquanto o primeiro nanossistemas variou de $-23,1 \pm 1,4$ mV no T0 para $-22,8 \pm 4,3$ mV no 105º dia, o outro nanossistema foi de $-26,4 \pm 0,7$ mV no T0 para $-32,3 \pm 0,2$ mV no 105º dia.

À temperatura ambiente (18-25 °C) e sob estresse térmico (37° C), destaca-se o comportamento apresentado pela NPPFt que, no primeiro caso, aumentou seus valores de carga de superfície até os 90 dias de análise; já no segundo caso, comportou-se de forma inversa chegando a ultrapassar o ponto isoeletrico mais de uma vez, mudando de carga. Segundo Araújo (2017), isso pode ser resultado de cátions nos nanossistemas que tendem a ser liberados na fase dispersante, alterando o PtZ e essas avaliações corroboram com os dados de DH e PdI de NPPFt nessas duas condições que mostram bastante instabilidade (FIGURA 21B e 21C). É possível perceber que apenas na condição de 37 °C no 15º dia e permanecendo assim até o final das análises todos os nanossistemas mudam de carga de superfície, tornando-a positiva, exceto as NPPFt que retornam a ter carga superficial negativa após o 45º dia. Além disso, ao comparar os diferentes valores de PtZ alcançados pelos nanossistemas foi revelada ausência de diferenças estatísticas entre eles ($p < 0,05$) nas três condições de temperatura de armazenamento.

Alguns trabalhos foram conduzidos preparando nanossistemas similares aos aqui desenvolvidos. Yu et al. (2012) prepararam NPs de PLGA estabilizadas com 3% de BSA com um DH de 420 nm e PtZ em torno de -20 mV. Romero et al. (2010) também produziram NPs de PLGA com 3% de BSA na superfície e encontraram valores de DH em torno de 450 nm. Os autores observaram que a 1% de BSA o tamanho aumentava para 520 nm e de acordo com He et al. (2008), o caráter anfifílico da proteína usada para estabilizar a formulação foi um fator importante na redução do tamanho das NPs. Já a carga de superfície delas, independente da concentração do BSA, permaneceu em torno de -25 mV. Em um estudo recente, Saengruengrit et al. (2018) também obtiveram NPs de PLGA com BSA e o DH delas esteve em torno de 270 nm, com PdI de 0,1 e PtZ de -10 mV.

Nesse mesmo trabalho, Saengruengrit et al. (2018) produziram NPs de PLGA revestidas com BSA, porém encapsulando NPFeO em uma massa inicial de 25 mg e o valor de DH foi de 285 nm, com PdI de 0,167 e PtZ de -11 mV; os autores ainda determinaram que o número de NPFeO no nanossistema era de 1.390. Outros estudos produziram nanoesferas de PLGA contendo 5 mg de NPFeO como o de Mosafer et al. (2017a) que encontrou um tamanho de 170 nm, população monomodal com PdI de 0,043 e o de Silva et al. (2013) em que o DH foi de 202 nm com PdI de 0,097 e -7 mV, no entanto para esses dois últimos, o surfactante usado para estabilização da emulsão simples formada foi o PVA. O DH e PtZ das NPPs foi menor do que os das NPPMag em todas temperaturas de armazenamento. Corroborando com isso, Bootdee et al. (2012) prepararam NPs de PLGA e observaram que ao adicionar NPFeO havia um aumento no tamanho das partículas que ia de 359 nm para 400 nm. Além disso, outra similaridade é que o PtZ das NPs sem contribuição magnética foi maior em módulo (-26,8 mV) do que as que continham o ferro (-24,1 mV). Paula et al. (2013) desenvolveram NPs de PLGA com AICIFt encapsulada e encontraram valor de DH de 178 nm, com PdI de 0,116 indicando uma população monodispersa e PtZ alto chegando a -50 mV. As NPPFt do presente estudo, na temperatura de armazenamento de 4 °C, tiveram um tamanho e PdI obtido por DLS de 146 nm e 0,183, respectivamente, no entanto, a carga de superfície foi menor em módulo -24,7 mV podendo ser devido à concentração do fotossensibilizante que era dez vezes menor.

O tamanho médio das NPs é um dos parâmetros mais importantes para determinar os destinos *in vitro* e *in vivo* de nanossistemas com fins terapêuticos (ALEXIS et al., 2008; PERRAULT et a., 2009). Tamanhos reduzidos favorecem na transposição de barreiras biológicas e aumentam a área superficial proporcionando uma maior interação com meios biológicos (MAINARDES & EVANGELISTA, 2005; ALEXIS, et al., 2008; JAIN & KUMAR, 2010). A maioria das aberturas nas barreiras endoteliais é da ordem nanométrica, então é recomendado que os nanossistemas que transportam moléculas pela corrente sanguínea tenham um tamanho de até 300 nm, favorecendo também o efeito de permeabilidade e retenção aumentado (EPR) dentro da vasculatura tumoral (GUPTA & KOMPELLA, 2006). Além disso, a absorção celular das NPs é realizada por meio de mecanismos de fagocitose quando elas formam agregados ou têm diâmetro maior que 10 µm, pinocitose quando os diâmetros são menores que 1 µm ou estão em solução e ainda por meio de endocitose quando as NPs têm entre 25-50 nm e possuem ligantes específicos que permitem seletivamente maior de fármacos em determinados sítios (FARAJI & WIPF, 2009).

A fagocitose é realizada por células dendríticas, macrófagos e neutrófilos; já a pinocitose pode ser feita por qualquer tipo celular.

As NPs acumulam-se preferencialmente nos tumores sólidos devido características ligadas à vetorização passiva e ativa. Enquanto na vetorização passiva esse acúmulo é devido à fisiologia anormal dos vasos presentes nos tumores, à morfologia esférica, ao reduzido tamanho, à ausência de modificação na superfície das NPs e ao efeito EPR que pode acumulá-las e promover liberação dos agentes terapêuticos; na vetorização ativa o uso de ligantes específicos de superfície (anticorpos, peptídeos) e modificações estruturais nas NPs (carga de superfície, polímeros, tensoativos) melhora o direcionamento das moléculas transportadas ou, no caso de modificação com polímeros e tensoativos que alteram a carga, reduz a captura pelo sistema fagocítico mononuclear (SFM) que faria diminuir a eficácia do tratamento (OLIVEIRA et al., 2012; SAHOO et al., 2017). Torna-se importante esse mecanismo de vetorização ativa uma vez que, segundo Owens III & Peppas (2006), as NPs sem modificações estruturais são mais susceptíveis a problema de rápida remoção da circulação sanguínea após administração intravenosa e isso pode diminuir a possibilidade delas atingirem as células alvo já que seriam presas em órgãos como fígado, baço e linfonodos (PESTANA, 2009; VASSILIOU et al., 2010).

Nesse sentido, os parâmetros coloidais obtidos por DLS podem ser modulados por meio de diversos fatores como: os solventes envolvidos na preparação, o método de obtenção dos nanossistemas, a massa dos constituintes, a interação entre esses diferentes constituintes, tempo de sonicação e evaporação dos solventes e o meio dispersante (RAO e GECKELER, 2011). Nesse estudo, a concentração de PLGA e BSA foi de 20 mg/mL, além de 0,264 mg/mL de NPFeO foram utilizadas no preparos dos diferentes nanossistemas. Yu et al. (2012) atribuem elevados valores de DH à camada hidrofílica dos surfactantes utilizados na preparação dos nanossistemas e que tendem a ficar sobre a superfície deles. Além disso, essa cobertura pode gerar uma camada escura na superfície formando uma estrutura núcleo-casca que pode contribuir para o aumento da espessura das NPs. As moléculas individuais de BSA podem chegar a ter tamanhos de 6,8 nm e ao formarem agregados podem se juntar às moléculas de PLGA aumentando o tamanho das NPs, além da própria camada de solvatação que reveste as partículas em meio aquoso e que devido ao efeito corona pode ancorar muitas moléculas em sua superfície (GONZÁLEZ FLECHA & LEVI, 2003; YU et al., 2012). De acordo com Shakweh et al. (2005) e Zhou et al. (2009), partículas de BSA com até 20 nm podem ser dispersas na interface do PLGA com o meio aquoso e gerarem aumento no diâmetro quando medido por DLS. A partir do exposto, vale ressaltar que no presente estudo,

o nanossistema NPPs apresentou DH máximo de 214 ± 14 nm com PDI de $0,2 \pm 0,01$ e uma vez que seu DH esteve abaixo daqueles relatados nos trabalhos anteriores e apresentou uma população com distribuição homogênea, não aparenta ter sofrido tantas interferências da camada de polimerização causada pela concentração do PLGA utilizada, nem mesmo da agregação de moléculas livres de BSA.

Em relação às partículas poliméricas, os resultados expostos do presente estudo corroboram com os de Silva et al. (2013) que ao preparar NPs de PLGA estabilizadas com BSA estudaram a influência de diferentes concentrações do polímero no DH e constataram que conforme essa concentração aumentava, o tamanho das NPs também era maior, além disso, eles observaram que com um minuto de sonicação as NPs já tinham seu DH próximo de 250 nm e esse também foi o tempo em que as NPPs tiveram de sonicação no presente estudo. De acordo com eles, esse comportamento também já havia sido relatado anteriormente nos estudos de Feczko et al. (2011) e Van de Ven et al. (2011). O principal fator que explica esses resultados é o aumento da viscosidade na solução a partir do aumento da concentração polimérica que pode gerar emulsões instáveis com partículas maiores (MAINARDES & EVANGELISTA, 2005; PAL et al., 2013). Bilati et al. (2003) estudando o tempo de sonicação como método de diminuição no diâmetro de nanocápsulas de PLGA, mostraram que a formação de uma dupla emulsão A/O/A com um tempo de sonicação de 20 segundos reduziu o tamanho médio das NPs para uma faixa entre 260-280 nm em comparação com a primeira etapa de formação de emulsão simples. Além disso, as NPPMag mesmo com uma quantidade inferior de NPFeO daquelas apresentadas nos trabalhos acima permaneceram estáveis quando acondicionadas na geladeira com um DH de $246 \pm 8,9$ nm e a adição dessa contribuição magnética influenciou em um aumento de 15%, 39% e 25% nas NPPMag mantidas sob temperatura de armazenamento de 4-8 °C, 18-25 °C e 37 °C logo após sua preparação e no tempo final de 105 dias, respectivamente.

Alguns outros trabalhos demonstram que, assim como relatado nesse estudo, o DCM também foi o solvente orgânico utilizado no preparo dos nanossistemas e essa utilização quando otimizada à concentração do polímero foi capaz de induzir uma diminuição no diâmetro médio de NPs de PLGA. Manchanda et al. (2010) formularam NPs de PLGA como sistemas de entrega de doxorrubicina (DOX) com tamanhos de 137 nm quando a concentração de PLGA é 13,3 mg/mL e 164 nm quando essa concentração aumenta para 66,7 mg/mL com o aumento de encapsulamento da droga sendo proporcional ao aumento da concentração do polímero. Segundo os autores, esse comportamento é resultado do aumento da disponibilidade de PLGA na fase orgânica que aumenta a resistência viscosa da mistura, a

faz absorver mais energia para agitação, leva a uma redução da tensão de cisalhamento e resulta em partículas maiores. Budhian et al. (2007) ao preparar NPs de PLGA contendo o fármaco haloperidol também relatam um aumento no DH à medida que a concentração de PLGA é maior; eles também observaram que à medida que o volume de DCM aumenta de 1 mL para 10 mL, o tamanho das partículas permanece 225 nm, no entanto, o teor do fármaco diminui de 1,8% para 1% uma vez que na presença de maior volume de DCM o tempo de evaporação desse também será aumentado e isso pode reduzir o conteúdo do fármaco. Além disso, o método de evaporação de solventes há muito tempo vem sendo relatado como importante em preparações de NPs de PLGA uma vez que resulta em partículas porosas, com formatos uniformes e maior eficiência de carregamento de drogas (ALEX & BODMEIER, 1990; JEYANTHI et al., 1996; YUSHU & VENKATRAMAN, 2006). Nesse sentido, Ashjari et al. (2012) compararam as propriedades coloidais de nanocápsulas de PLGA contendo cisplatina e nanopartículas magnéticas que foram obtidas por meio da técnica de evaporação do solvente DCM à temperatura ambiente ou por evaporação à pressão reduzida e enquanto no primeiro caso o tamanho foi de 142 nm, com PdI de 0,071 e PtZ de -16,5 mV, no segundo tipo de eliminação de solvente utilizado o tamanho elevou-se para 314 nm com PdI em torno de 0,102 e PtZ de -10,5 mV.

Diante dos resultados expostos observou-se que, de modo geral, os nanossistemas mantiveram melhor estabilidade coloidal quando armazenados em baixas temperaturas (4-8 °C) até 105 dias de preparo. Dessa forma, para os estudos de caracterização e os ensaios *in vitro* optou-se por amostras acondicionadas nessa condição de temperatura.

5.2 Avaliação das propriedades fotofísicas

As análises de intensidade de fluorescência dos nanossistemas com a AICIFt demonstraram que elas exibem propriedades interessantes para uso em TFD uma vez que ambas – NPPMagFt e NPPFt – apresentaram pico máximo na faixa terapêutica de TFD (600 – 1000 nm), sendo entre 680 nm e 685 nm, respectivamente (FIGURA 22C e 22D). Esses valores mostram que o fotossensibilizante tem deslocamento no seu pico de emissão máximo uma vez que quando disperso em H₂O e EtOH era de 690 nm (FIGURA 22A e 22B, respectivamente).

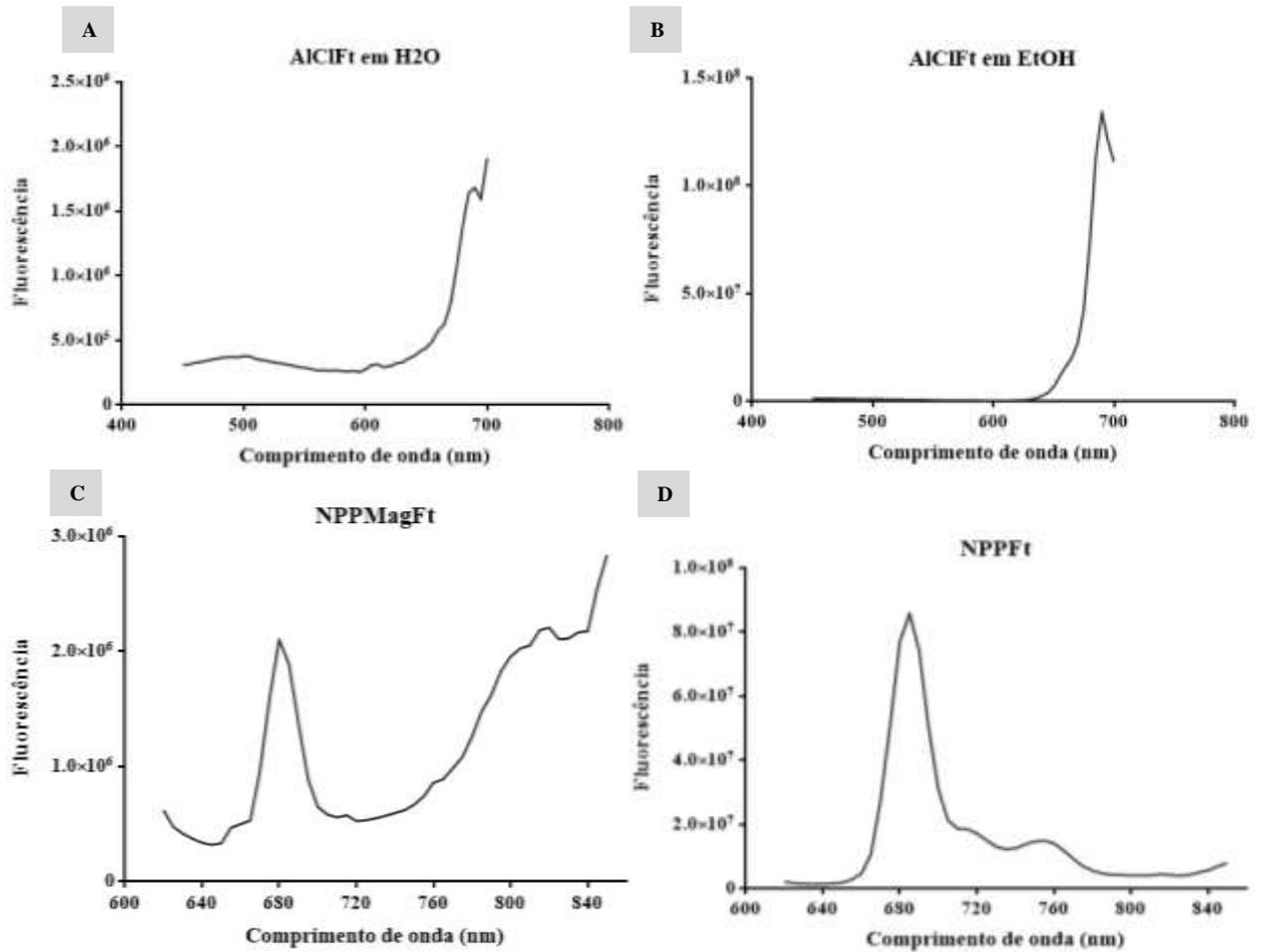


Figura 22. Espectro de fluorescência dos nanossistemas. (A) AICIFt em H₂O; (B) AICIFt em EtOH; (C) NPPMagFt; (D) NPPFt. (AICIFt: alumínio cloro ftalocianina. H₂O: água. EtOH: Etanol NPPMagFt: nanopartículas polimérico-magnéticas contendo alumínio cloro ftalocianina. NPPFt: nanopartículas poliméricas contendo alumínio cloro ftalocianina).

O comportamento dos nanossistemas sem o fotossensibilizante – NPPs e NPPMag – foi similar. Neles, os espectros mostraram mais ruídos e apresentaram-se irregulares (FIGURA 23A e 23B). Pôde-se observar um pico em torno de 660 nm, 750 nm e outro próximo de 815 nm, que pode ser oriundo do fenômeno de difração de segunda ordem (PY-DANIEL, 2017).

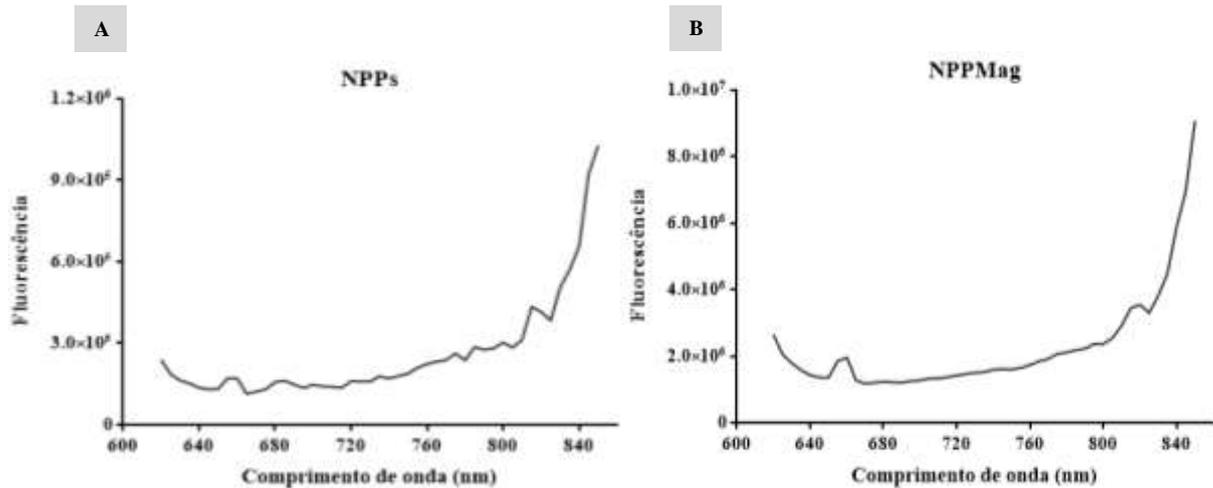


Figura 23. Espectro de fluorescência dos nanossistemas. (A) NPPs; (B) NPPMag. (NPPs: nanopartículas poliméricas. NPPMag: nanopartículas polimérico-magnéticas).

Vale a pena ressaltar que diversos estudos do grupo de pesquisa do Laboratório de Nanobiotecnologia da Universidade de Brasília/UnB investigaram características de fluorescência da AICIFt, no entanto, nestes trabalhos o nanossistema utilizado era de nanoemulsões. Os resultados mostram picos máximos de fluorescência entre 670-690 nm (SILVA, 2013; MONGE-FUENTES, 2014; RODRIGUES, 2014; PY-DANIEL, 2017; RODRIGUES, 2018) e são compatíveis com Detty et al. (2004) que afirmam que um fotossensibilizante deve sofrer excitação com luz em comprimento de onda entre 600-800 nm sendo essa uma janela óptica ideal para aplicações em TFD.

Outros dois trabalhos realizados pelo grupo de pesquisa estudaram nanossistemas poliméricos contendo a AICIFt e suas propriedades fotofísicas de fluorescência, entretanto, esse é o primeiro estudo que descreve tais propriedades em nanossistemas polimérico-magnéticos. De acordo com Muehlmann et al. (2014), o FS quando associado a NPs poliméricas apresenta banda máxima de absorção de fluorescência em torno de 690 nm. Pentado (2016) mostra que quando a AICIFt está incorporada em micelas poliméricas é possível observar um único pico de fluorescência em torno de 680 nm. Além disso, em um estudo de Paula et al. (2013) foi demonstrado que nanocápsulas de PLGA contendo AICIFt apresentam pico máximo em 680 nm e que quando comparados o perfil dos espectros de fluorescência desse FS disperso em EtOH em sua forma livre (meio homogêneo) em relação à sua forma conjugada em nanossistemas (meio heterogêneo) são observados desvios de até 10 nm devido às forças intermoleculares da ligação dele com o polímero.

Segundo Rico et al. (2013), as ftalocianinas quando dispersas em etanol e em estado de não agregação tendem a exibir suas características de emissão de fluorescência na faixa de 650-700 nm e esta foi a faixa observada para os nanossistemas do presente estudo sendo importante uma vez que essa é a região do vermelho no espectro e a luz nesse intervalo de comprimento de onda tem grande capacidade de permear estruturas biológicas (MUEHLMANN et al., 2015; RODRIGUES et al., 2015). Como a maioria dos fotossensibilizantes possui natureza química hidrofóbica dificultando a sua incorporação em meios biológicos (MUEHLMANN et al., 2015; CAMERIN et al., 2016) torna-se importante a obtenção de nanossistemas que os deixem livres de possibilidade de agregação levando a perda de suas propriedades fotofísicas (LONGO et al., 2009; RODRIGUES et al., 2015), além de proteção desses nanossistemas à luz uma vez que isso pode levar à degradação da AICIFt (MUEHLMANN et al., 2015; RODRIGUES et al., 2015).

5.3 Avaliação das propriedades físico-químicas

5.3.1 FTIR

Neste estudo, utilizou-se a espectroscopia na região do infravermelho para determinar a interação de grupos funcionais do FS e o sistema carreador. O nanossistema estudado neste trabalho carrega a alumínio cloro ftalocianina em uma nanopartícula polimérica de PLGA contendo BSA como surfactante, o qual contém nanopartículas magnéticas de óxido de ferro (NPFeO) revestida com ácido oleico.

O espectro no FTIR do ácido oleico puro foi analisado por Mosafer et al. (2017a) e indicou a formação de dímero devido a presença da banda em 1713 cm^{-1} atribuída ao estiramento da carbonila ($\nu\text{C=O}$) ligada ao H, devido à presença de ligações de hidrogênio, e uma banda em 1285 cm^{-1} devido ao $\nu\text{C-O}$. A formação do dímero pode ser confirmada também pela localização da banda em 3000 cm^{-1} atribuída ao $\nu\text{O-H}$ do dímero ligado ao H e duas bandas em 2929 e 2885 cm^{-1} correspondentes aos modos de estiramentos assimétrico e simétrico do CH_2 , respectivamente. As bandas em 1439 e 938 cm^{-1} foram atribuídas às deformações no plano e fora do plano do O-H, respectivamente.

Os espectros de FTIR do BSA, PLGA e das NPPs, estão apresentados na Figura 24.

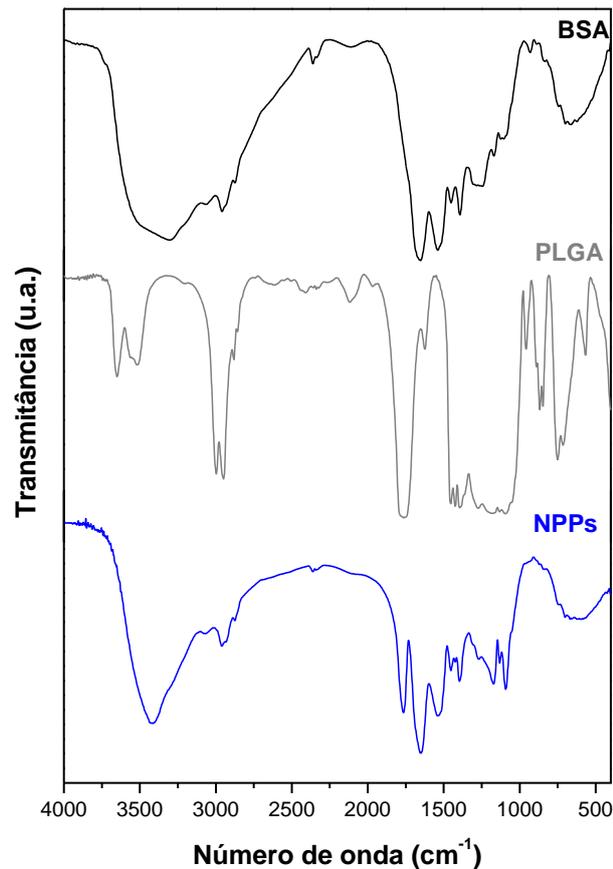


Figura 24. Espectros vibracionais na região do infravermelho do BSA, PLGA e das NPPs. (BSA: albumina sérica bovina. PLGA: poli(ácido lático-co-ácido glicólico. NPPs: nanopartículas poliméricas).

As bandas características dos espectros da proteína no FTIR são as bandas amida I e amida II na região de $1400\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$ (BYLER & SUSI, 1986), que são aquelas que surgem das ligações amida que ligam os aminoácidos. A amida I centrada em torno de 1740 cm^{-1} corresponde ao modo estiramento da ligação C–O da amida, no espectro desse trabalho observou-se em 1651 cm^{-1} . A banda atribuída à amida II é centrada em torno de 1550 cm^{-1} que corresponde ao modo de deformação da ligação NH da amida, e na Figura 24 observou-se em 1537 cm^{-1} . As características desses picos fornecem informações sobre a estrutura secundária das proteínas, uma vez que as ligações de hidrogênio que estabelecem essa estrutura estão associadas principalmente às ligações C–O e N–H. Bandas referentes ao estiramento da hidroxila ($\nu\text{O–H}$) ou $\nu\text{N–H}$ estão na região de $2500\text{-}3500\text{ cm}^{-1}$, no espectro do BSA obtido nesse trabalho observa-se uma banda larga e intensa em 3304 cm^{-1} atribuída ao $\nu\text{N–H}$. A banda larga na região em 662 cm^{-1} corresponde à $\gamma\text{N–H}$.

No espectro do PLGA, Figura 24, observa-se duas bandas em 3648 e 3518 cm^{-1} atribuídas ao $\nu\text{O–H}$ provavelmente oriundas de interações de hidrogênio. Outras duas bandas de baixa intensidade são observadas em 2997 e 2949 cm^{-1} que são atribuídas ao estiramento assimétrico e simétrico do CH_2 . Em 1765 e 1759 cm^{-1} observa-se as duas bandas intensas e

agudas atribuídas ao estiramento C=O ($\nu_{\text{C=O}}$) dos ésteres. As bandas em 1180 e 1094 cm^{-1} de média intensidade são atribuídas ao estiramento C–O ($\nu_{\text{C–O}}$), sendo estas características de poliésteres alifáticos. Bandas na região de 1450 cm^{-1} são características da deformação C–H. Observa-se ainda uma banda de baixa intensidade centrada em 750 cm^{-1} que é atribuída ao CH_2 (SINGH et al., 2014). Quando o espectro da NPPs foi avaliado a Figura 24, observa-se uma semelhança muito grande com o espectro do BSA livre, entretanto, foi possível observar a presença da banda referente ao $\nu_{\text{C=O}}$ do PLGA. Observou-se picos de absorção em 1765 cm^{-1} , 1649 cm^{-1} e 1535 cm^{-1} , o que confirma a presença das estruturas de PLGA e BSA e a integridade química dos componentes no espectro das NPPMag.

Após a obtenção da NPPs neste trabalho, adicionou-se as NPFeO com o intuito de se obter uma nanopartícula polimérico-magnética. A Figura 25 apresenta os espectros vibracionais na região do infravermelho da NPFeO, NPPs e NPPMag.

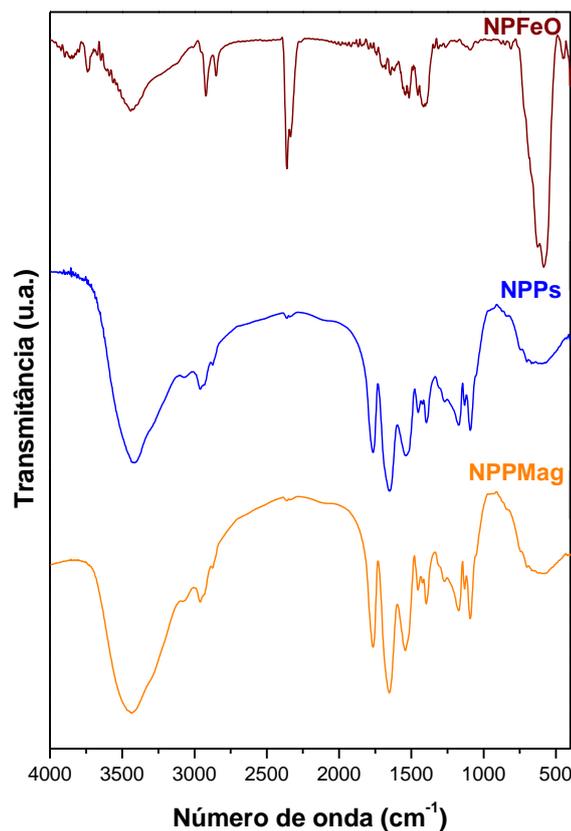


Figura 25. Espectros vibracionais na região do infravermelho da NPFeO, NPPs e NPPMag. (NPFeO: nanopartículas magnéticas de óxido de ferro. NPPs: nanopartículas poliméricas. NPPMag: nanopartículas polimérico-magnéticas).

No espectro da NPFeO da Figura 25, o estiramento assimétrico e simétrico do CH_2 mudaram para 2922 e 2852 cm^{-1} , respectivamente. Além disso, observa-se ainda a ausência do $\nu_{\text{C=O}}$ em 1713 cm^{-1} comparado ao espectro do ácido oleico puro e o aparecimento de duas novas bandas em 1542 e 1643 cm^{-1} , embora sejam relativamente

pequenas, são visíveis e são características dos estiramentos assimétrico $\nu_{as}(\text{COO}^-)$ e simétrico $\nu_s(\text{COO}^-)$. Este resultado pode ser explicado uma vez que o padrão de ligação dos ácidos carboxílicos à superfície das nanopartículas foi uma combinação de moléculas ligadas simetricamente e moléculas ligadas a um ângulo da superfície (TAO, 1993). Uma adsorção em 1040 cm^{-1} aparece devido ao $\nu\text{C-O}$ de uma ligação simples. Esses resultados mostram que o ácido oleico foi quimicamente absorvido pela superfície da nanopartícula metálica como um carboxilato.

A partir de estudos prévios de carboxilatos, sabe-se que a interação entre a cabeça de carboxilato e o átomo metálico é categorizada em quatro tipos: monodentado, ponte (bidentado), quelante (bidentado) e interação iônica (NAKAMOTO, 2006). A separação do número de onda, Δ , entre as bandas no infravermelho $\nu_{as}(\text{COO}^-)$ e $\nu_s(\text{COO}^-)$ pode ser utilizada para distinguir o tipo de interação entre a cabeça do carboxilato e o átomo metálico. Neste trabalho, o valor de Δ é igual a 101 cm^{-1} , sendo um indicativo de uma interação bidentada quelante entre o oleato e os átomos de ferro. O núcleo de óxido de ferro em si apresenta uma vibração característica e intensa no infravermelho em 584 cm^{-1} , relacionada a ligações Fe-O (ZHANG et al., 2006), confirmando a interação oleato e nanopartícula metálica conforme reportado no trabalho de Vakilinezhad et al. (2018).

No espectro da NPPMag é possível visualizar uma banda de baixa intensidade também centrada em 584 cm^{-1} também atribuída ao modo vibracional estiramento Fe-O, o que permite inferir que houve a incorporação das NPF₂O à nanopartícula polimérica (NPPs), no entanto, a formação nítida dessa banda pode ter sido mascarada pelo efeito de diluição do nanossistema quando seco para análise em FTIR, fazendo com que a proporção do polimérico fosse superior à quantidade das NPF₂O. Observa-se ainda que as bandas características de formação da NPPs (1765 cm^{-1} , 1649 cm^{-1} e 1535 cm^{-1}) estão presentes no espectro da NPPMag (1765 , 1653 e 1541 cm^{-1}).

A AICIFt foi adicionado às NPPMag com o objetivo de estudar o efeito promovido pelo FS na terapia fotodinâmica. A Figura 26 apresenta os espectros vibracionais na região do infravermelho do fotossensibilizante disperso em EtOH, das NPPs, das NPPFt e das NPPMagFt.

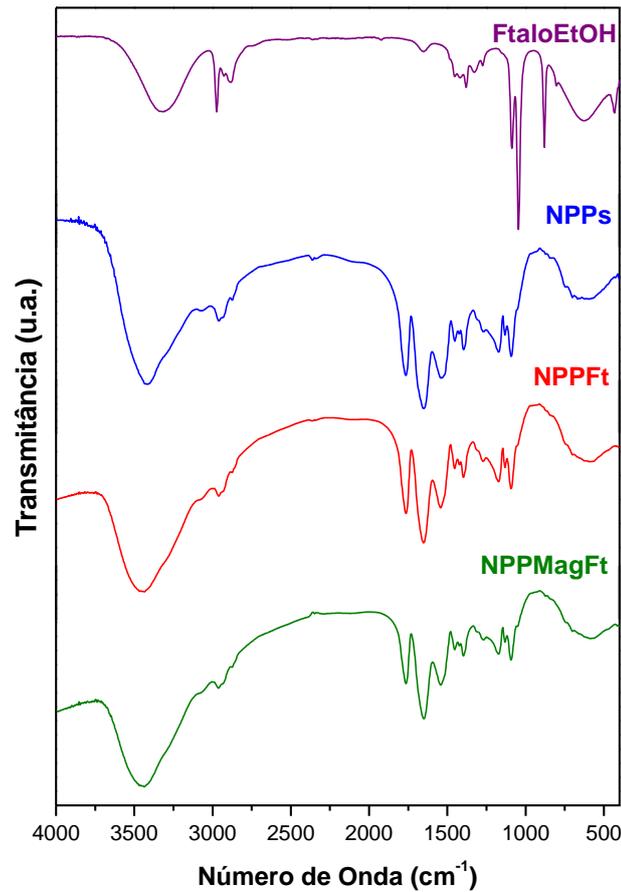


Figura 26. Espectros vibracionais na região do infravermelho da AICIFt dispersa em EtOH, NPPs, NPPFt e NPPMagFt. (FtaloEtOH: alumínio cloro ftalocianina. NPPs: nanopartículas poliméricas. NPPFt: nanopartículas poliméricas contendo alumínio cloro ftalocianina. NPPMagFt: nanopartículas polimérico-magnéticas contendo alumínio cloro ftalocianina).

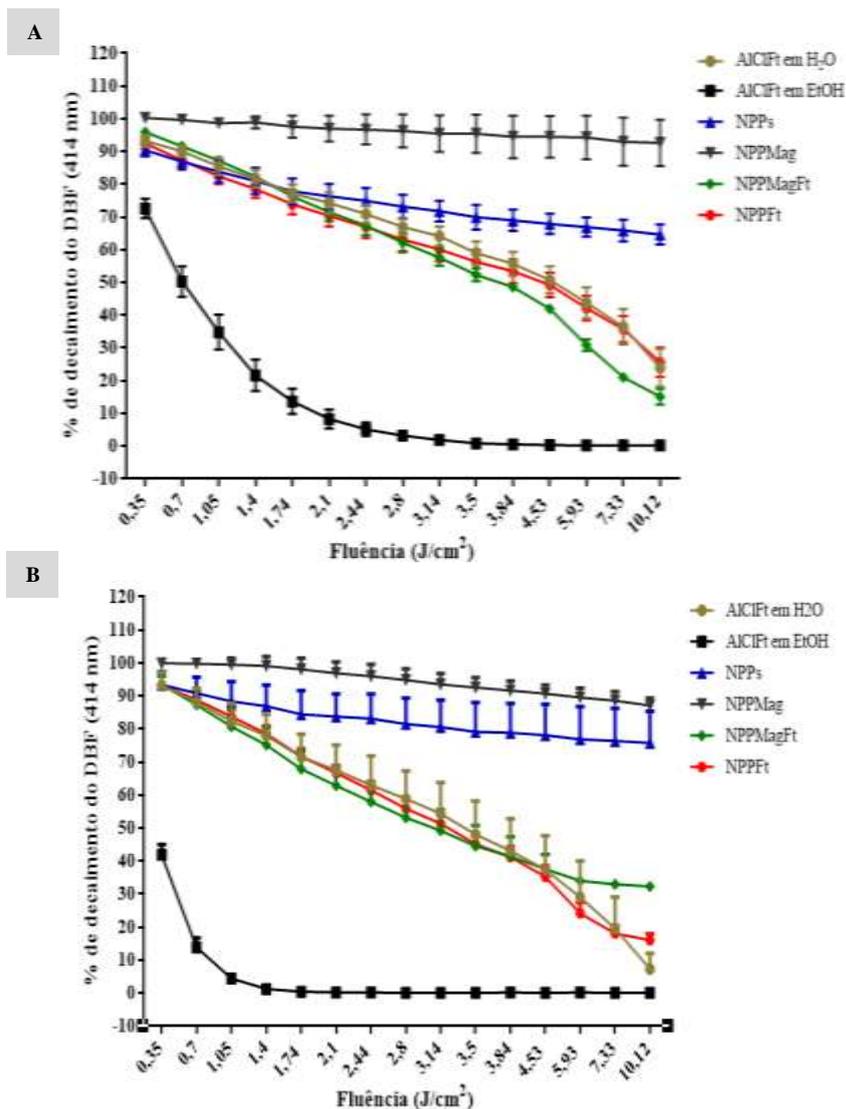
O espectro do FS livre está apresentado na Figura 26 e pode se observar uma banda de média intensidade e alargada em 3317 cm^{-1} atribuída ao $\nu\text{N-H}$ e com indícios de formação de interações hidrogênio. Bandas em 2979 e 2883 cm^{-1} atribuídas ao $\nu\text{C-H}$. Duas bandas referentes ao $\nu\text{C-N}$ dos anéis pirrólicos são observadas em 1088 e 1045 cm^{-1} . Um pico intenso em 880 cm^{-1} foi atribuído à deformação fora do plano C-H ($\gamma\text{C-H}$), a $\gamma\text{C-C}$ referente ao anel macrocíclico foi observada em 627 cm^{-1} e por último a banda atribuída a deformação $\text{C}_\alpha\text{-C}_\beta$ do isoindol foi identificada em 432 cm^{-1} (EL-NAHASS et al., 2015).

Ao analisar a Figura 26 não foi possível observar a presença das bandas características da AICIFt no espectro da NPPFt, uma vez que as bandas do fotossensibilizante estão na mesma região das bandas características da NPPs e a proporção do FS quando comparada à proporção do PLGA presente no nanossistema é menor e pode não ter sido totalmente capaz de formar os picos característicos no espectro. Diante disso pode-se inferir que os picos do PLGA e BSA encobriram as bandas do FS, não sendo possível dessa maneira verificar diferença significativa entre os espectros da NPPs e NPPFt. Ao realizar um estudo do

espectro das NPPMagFt o mesmo é observado: o encobrimento das bandas da AICIFt pelas bandas da NPPs, principalmente a de 1092 cm^{-1} atribuída ao $\nu\text{C-O}$ do PLGA que é intensa e larga sobre a de 1088 cm^{-1} , por exemplo. Diante desses resultados de FTIR, é possível verificar a interação dos diferentes componentes dos nanossistemas desenvolvidos e com isso inferir que a nanopartícula polimérica de PLGA estabilizada com BSA, contendo NPFeO e moléculas de AICIFt foi obtida.

5.3.2 Geração de ERO

A capacidade de geração de ERO na presença ou não do fotossensibilizante pelos nanossistemas quando irradiados com LED a 660 nm foi avaliada pelo método de degradação do reagente DBF. Os resultados estão representados na Figura 27. Para esses ensaios, foram utilizadas diferentes concentrações dos nanossistemas contendo ou não a AICIFt, além do fotossensibilizante disperso em H_2O e EtOH e irradiações por tempos distintos, conforme descrito no tópico 4.3.3 para analisar se essas variáveis influenciam na produção de ERO.



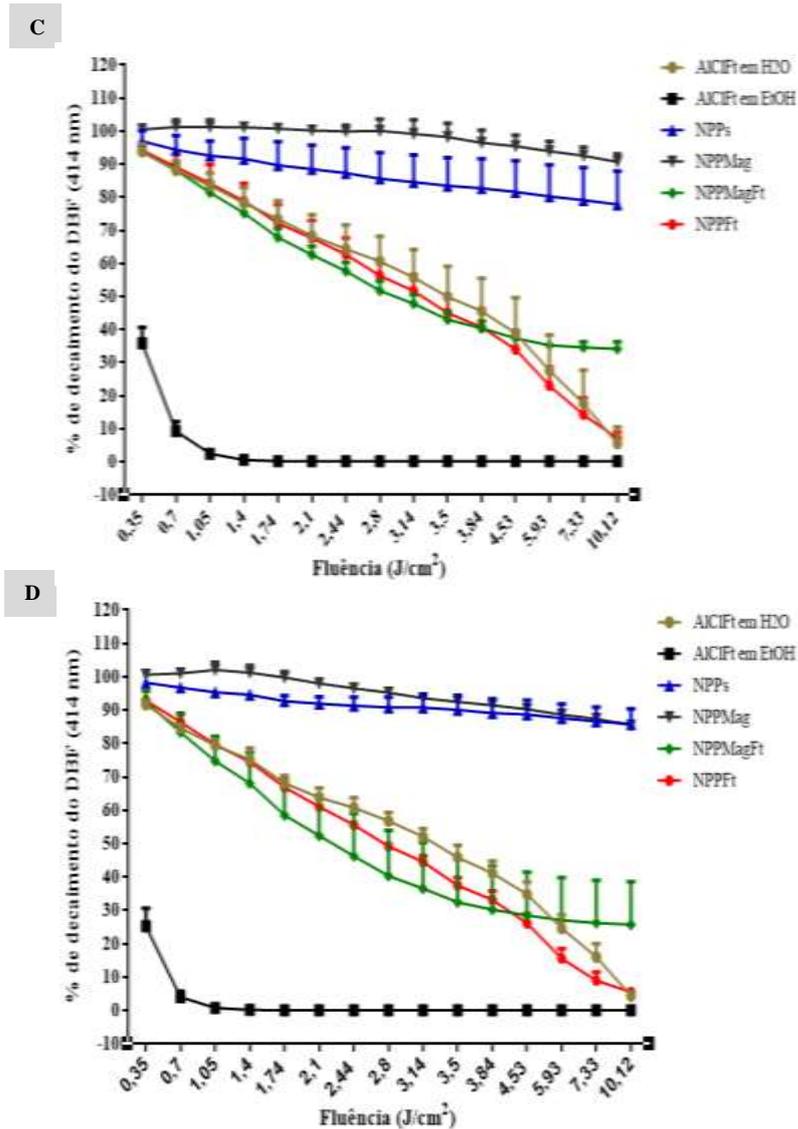


Figura 27. Produção de ERO com diferentes concentrações dos nanossistemas pelo método de degradação do DBP sob diferentes fluências do laser 660 nm. (A) C1; (B) C2; (C) C3; (D) C4. Onde C1= 0,4 mg de PLGA e/ou 2 μ M de AICIFt; C2= 1 mg de PLGA e/ou 5 μ M de AICIFt; C3= 1,4 mg de PLGA e/ou 7 μ M de AICIFt; C4= 2 mg de PLGA e/ou 10 μ M de AICIFt. (AICIFt: alumínio cloro ftalocianina. H₂O= água. EtOH: etanol. NPPs: nanopartículas poliméricas. NPPMag: nanopartículas polimérico-magnéticas. NPPMagFt: nanopartículas polimérico-magnéticas contendo alumínio cloro ftalocianina. NPPFt: nanopartículas poliméricas contendo alumínio cloro ftalocianina).

É bem conhecida a importância das ERO para a ação eficiente e manutenção das propriedades físico-químicas dos FS aplicados em TFD (GARG & AGOSTINIS, 2014; MUEHLMANN, 2015). Os FS, por sua vez, absorvem a luz em comprimento de onda específico e são capazes de transmitir a energia luminosa para o oxigênio molecular presentes em tecidos-alvo modificando o estado energético do oxigênio para um estado excitado, tornando-o mais reativo e formando as ERO (KORBELIK et al., 2015; LAN et al., 2016).

Foi possível então verificar que o comportamento dos nanossistemas em produzir as ERO manteve-se similar nas diferentes concentrações testadas com um aumento na medida em que a dose de energia luminosa era maior. Em relação aos grupos controle, a produção de

ERO foi de 99% nas amostras em que a AICIFt estava dispersa em EtOH (linha preta), destacando-se a concentração de 10 μM que aos 15 segundos já mostrava ausência total de O_2 (FIGURA 27D). O outro grupo controle – AICIFt em H_2O – também chegou ao final do tempo de irradiação com pouco DBF disponível no sistema, conforme mostrado pelas linhas marrons em que o decaimento chegou até 96% na maior concentração (FIGURA 27D) e em 75% na menor concentração (FIGURA 27D).

Em relação aos grupos experimentais que não continham a AICIFt – NPPs e NPPMag, verifica-se um menor perfil de geração de ERO em todas as concentrações. No geral, as NPPMag foram as que menos geraram ERO e para ambos, na maior concentração teste, essa degradação foi de no máximo 15% (FIGURA 27D linhas azul e cinza). Esses resultados podem indicar que nanossistemas que não carregam a AICIFt em sua composição conseguem manter por mais tempo o oxigênio em seu estado fundamental, mesmo com distintas taxas de energia luminosa aplicada, evitando a geração excessiva de ERO e, portanto não são eficientes para uso em TFD.

Por outro lado, os nanossistemas com o fotossensibilizante – NPPMagFt e NPPFt foram analisados e ao final do experimento, quando comparada entre eles a capacidade de degradar o DBF, foi observada uma taxa maior das NPPFt nas concentrações de 5 μM , 7 μM e 10 μM de AICIFt onde essa degradação chegou em 83%, 93% e 95%, respectivamente (FIGURA 27B, 27C, 27D linha vermelha). Quanto aos índices das NPPMagFt, a taxa de absorvância diminuía em 85%, 66%, 65% e 76% em 2 μM , 5 μM , 7 μM e 10 μM de AICIFt, respectivamente (FIGURA 27A, 27B, 27C, 27D linha verde). Os valores obtidos da produção de ERO por esses nanossistemas começaram a decair antes dos 30 segundos de irradiação (2,1 J/cm^2) e ao final foram significativamente diferentes daqueles em que o fotossensibilizante não estava presente ficando mais próximo ao comportamento verificado quando ele estava disperso apenas em meio aquoso ou em álcool. Dessa forma, tais amostras parecem ter uma composição promissora para atuar como fotossensibilizante em TFD após a irradiação com laser vermelho em diversas condições de doses de energia, tempo de exposição à luz e concentração de seus constituintes. Os resultados mostram que mesmo quando presente nos nanossistemas, a AICIFt foi capaz de induzir a formação de ERO; nesse sentido, o revestimento promovido pelos sistemas nanométricos pode filtrar menos a luz irradiada e promove, dessa forma, um menor decaimento do DBF podendo explicar os menores valores em relação ao FS livre quando irradiado

Em micelas poliméricas, a geração de ERO também foi detectada e apresentou um comportamento dependente da concentração da AICIFt sendo que quanto maior esse valor,

maior a degradação do DBF, conforme Penteadó (2016). Alguns estudos mostram resultados utilizando AICIFt presente em nanoemulsões contendo óleos vegetais, destacando um efeito de geração de ERO por meio do decaimento da absorvância do DBF a partir do aumento da fluência de energia aplicada (SILVA, 2013; MONGE-FUENTES, 2014; RODRIGUES, 2014), corroborando com os resultados do presente estudo. Outros estudos verificaram a capacidade de produção de ERO promovida pela AICIFt quando adsorvida em nanossistemas com contribuição magnética, como o de Py-Daniel (2017) que preparou nanoemulsões magnéticas contendo o FS e observou que essas nanoemulsões apresentavam uma curva de degradação do DBF similar a da AICIFt dispersa em EtOH. Gianizeli (2015) sintetizou nanopartículas de magnetita contendo o FS e observou considerável diminuição da absorvância do DBF em comparação à AICIFt livre em tampão fosfato ou H₂O e esse resultado pode ser explicado de acordo com o estudo de Muehlmann et al. (2015) uma vez que as moléculas da AICIFt são hidrofóbicas e tendem a agregar-se, encurtando a distância entre elas sendo o contrário do observado no presente estudo em que disperso em EtOH o FS degradou praticamente 100% do DBF. Vale ressaltar que no presente estudo, as NPPFt mostraram um perfil de degradação do DBF, em todas as concentrações testadas, similar ao grupo no qual o FS estava disperso apenas em água e que, na menor concentração, as NPPMagFt apresentaram relativa vantagem nesse perfil de formação de ERO, mesmo sem diferença estatística.

5.4 Avaliação das propriedades magnéticas

Nesse estudo, os nanossistemas foram caracterizados também quanto à magnetização em função da aplicação de um campo magnético externo sob uma temperatura de 300 K (FIGURA 28). Todos os gráficos tiveram correção realizada pela massa de ferro pesada e colocada no porta-amostra e também a correção pelas curvas de magnetização do nanossistema NPPs (sem componentes magnéticos).

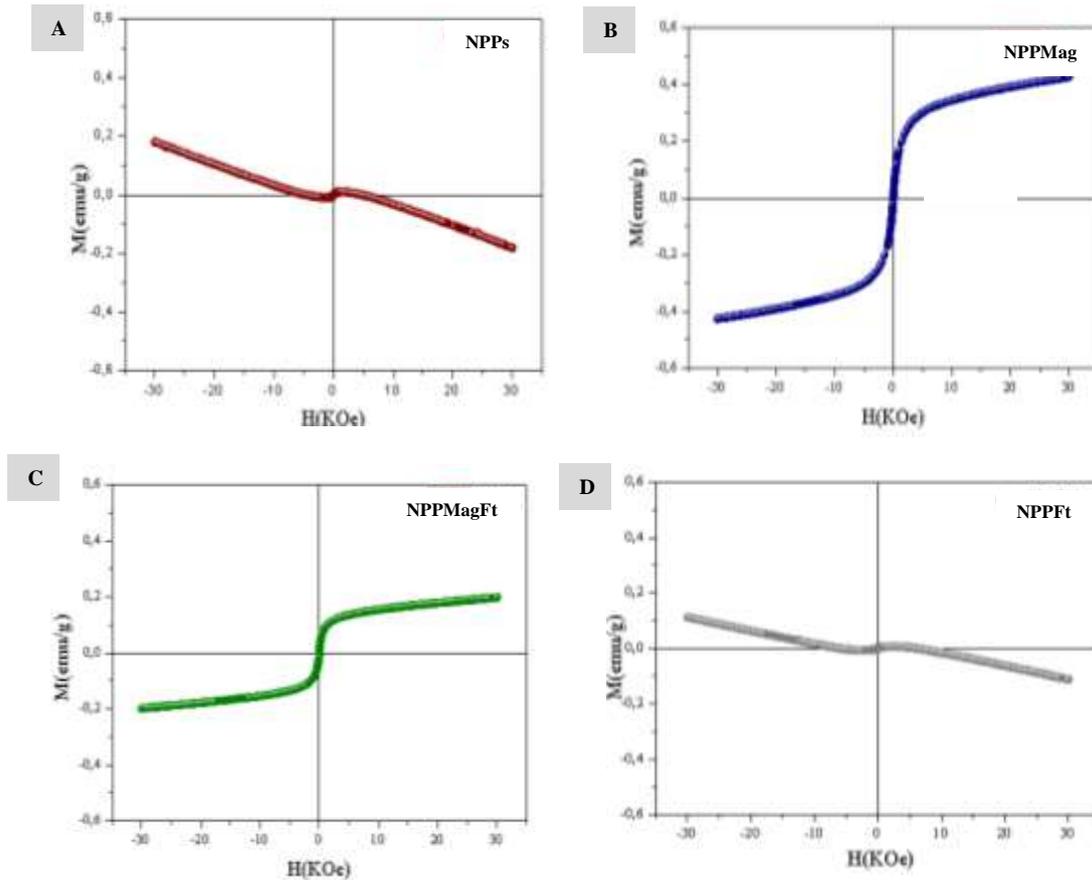


Figura 28. Curva de magnetização (M) dos nanossistemas após aplicação de campo magnético externo (H) à temperatura de 300 K. (A) NPPs; (B) NPPMag; (C) NPPMagFt; (D) NPPFt. (NPPs: nanopartículas poliméricas. NPPMag: nanopartículas polimérico-magnéticas. NPPMagFt: nanopartículas polimérico-magnéticas contendo alumínio cloro ftalocianina. NPPFt: nanopartículas poliméricas contendo alumínio cloro ftalocianina).

Os resultados confirmam a propriedade magnética das amostras com as NPFeO uma vez que essas respondem ao campo magnético na temperatura de 300 K. As curvas das NPPMag e NPPMagFt apresentam similaridade sendo que apenas NPPMagFt apresenta notável diminuição da magnetização de saturação (M_S) e a saturação foi mais rápida quando comparado à M_S de NPPMag (FIGURA 28B e 28C). Pode-se perceber que as curvas dessas amostras mostram valores de M_S em torno de 0,5 emu/g e 0,2 emu/g, respectivamente. Essa diminuição da M_S pode ser explicada pela presença da AlClFt no nanossistema NPPMagFt já que a magnetização é diretamente proporcional ao conteúdo magnético que é analisado, aumentando a quantidade de material diamagnético pela interação do ferro com meio orgânico (efeito de camada superficial “morta” de NPs). Isso influencia na curva de NPPMag que mostra um comportamento mais ferromagnético devido a maior concentração de íons férricos adsorvidos em sua superfície, favorecendo à tendência de saturação observada e também a uma possível encapsulação inferior das NPFeO devido à competição com o FS (GIANIZELI, 2015). Essa capacidade de resposta a um campo magnético torna esses

nanossistemas – NPPMag e NPPMagFt – promissores para aplicações em magnetohipertermia uma vez que, mesmo com baixos valores de magnetização, ao serem administrados no organismo, podem ser direcionados ao microambiente do tumor por meio de atração do campo magnético e seu movimento aleatório pode, ao gerar aquecimento, destruir células tumorais sensíveis a essas temperaturas.

O perfil de magnetização das NPPs e NPPFt demonstra que, sem contribuição magnética, as curvas têm comportamento predominantemente diamagnético no lado positivo (à esquerda) e no centro dela até aproximadamente 8 KOe mesmo que certa parte ferromagnética ainda esteja presente no lado negativo (à direita) devido a algum constituinte dessa natureza (FIGURA 28A e 28D).

Assim como as NPPMag desenvolvidas nesse estudo, outros trabalhos também relatam que nanossistemas similares, compostos por PLGA e magnetita encapsulada, têm a capacidade de responder a um campo magnético externo e apresentar comportamento superparamagnético. Bootdee et al. (2012) mostram que na preparação de NPs com diferentes concentrações de PLGA é observada uma M_s maior à medida em que a essa concentração do polímero diminui, chegando em 45 emu/g a 5 mg/mL de PLGA e a 36 emu/g a 60 mg/mL do polímero. Nanoesferas de PLGA com magnetita foram sintetizadas por Mosafer et al. (2017a) com o objetivo de uso como agentes de contraste de imagem e os autores identificaram uma boa resposta do material quando exposto ao campo magnético na temperatura de 300 K, mostrando 5,9 emu/g de magnetização; os autores ressaltam que essa menor M_s quando comparada à das NPFeO é devido ao revestimento de AO e polímero não magnéticos. Saengruengrit et al. (2018) prepararam nanossistemas com PLGA e NPFeO e, assim como no presente estudo, utilizaram o BSA como surfactante para estabilizar a emulsão formada e obtiveram um comportamento superparamagnético a 300 K com magnetização máxima de 2,3 emu/g e de acordo com os autores, a presença do BSA não afetou a M_s das NPs uma vez que a proteína presente no nanossistema foi componente da fase aquosa e, separada pela parte oleosa/polimérica, não alterou a distância interpartículas. É possível observar que a contribuição do PLGA e BSA não influencia no comportamento magnético dos nanossistemas e que mesmo diminuindo o valor de M_s eles preservam as características superparamagnéticas.

Uma vez que nanopartículas magnéticas também são importantes na área biomédica como mediadoras de magnetohipertermia e liberação controlada de agentes anticâncer, alguns trabalhos mostram que nanossistemas com os mesmos constituintes das NPPMag desenvolvidas nesse estudo, porém, carregando quimioterápicos também têm a

capacidade de responder a um campo magnético externo na temperatura de 300 K, como por exemplo, o de Cui et al. (2013) e Mosafar (2017b) que trabalharam com a doxorubicina e Vakilinezhad et al. (2018) que desenvolveram nanossistemas polimérico-magnéticos contendo o fármaco metotrexato e que encontraram valores em torno de 4,5 emu/g, 6,5 emu/g e 45 emu/g de M_s , respectivamente. Essa propriedade pode ser útil no direcionamento de nanossistemas carregados com fármacos para locais de tumores específicos.

Além do PLGA, outros polímeros já foram utilizados como matriz nanoestruturada para encapsulamento de NPFeO e tiveram sua propriedade magnética medida à temperatura ambiente de 300 K. Bedê (2010) preparou nanossistemas poliméricos compostos por alginato, quitosana e magnetita e observou que o valor de magnetização foi 8 emu/g. Liu et al. (2012) sintetizaram NPs de sílica mesoporosa magnéticas e obtiveram uma M_s de 2 emu/g. Araújo (2017), utilizando como polímero o pivalato de vinila (PVi) produziu NPs com uma magnetização variando entre 7 a 22 emu/g e de acordo com o autor, essa magnetização era proporcional ao teor da magnetita presente na matriz polimérica.

Quando comparados os resultados da literatura com os do presente estudo são observadas reduções na M_s que podem estar relacionadas à barreira para a magnetização causada pela: (1) concentração e tipo do polímero, (2) concentração e quantidade de magnetita utilizada na preparação e encapsulada, (3) tamanho das NPs ou (4) processo de secagem das amostras antes das análises. No entanto, não foram identificadas histereses em nenhum dos gráficos de $M \times H$, indicando nanopartículas magnéticas com domínio simples (OKASSA et al., 2005).

5.5 Avaliação das propriedades morfológicas

5.5.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A avaliação da morfologia dos nanossistemas por MEV demonstrou NPs esféricas, com superfície rugosa e, em alguns casos, relativamente quebradiça (FIGURA 29). Além disso, é possível observar uma camada escura ao redor das NPs que provavelmente é devido à contribuição polimérica.

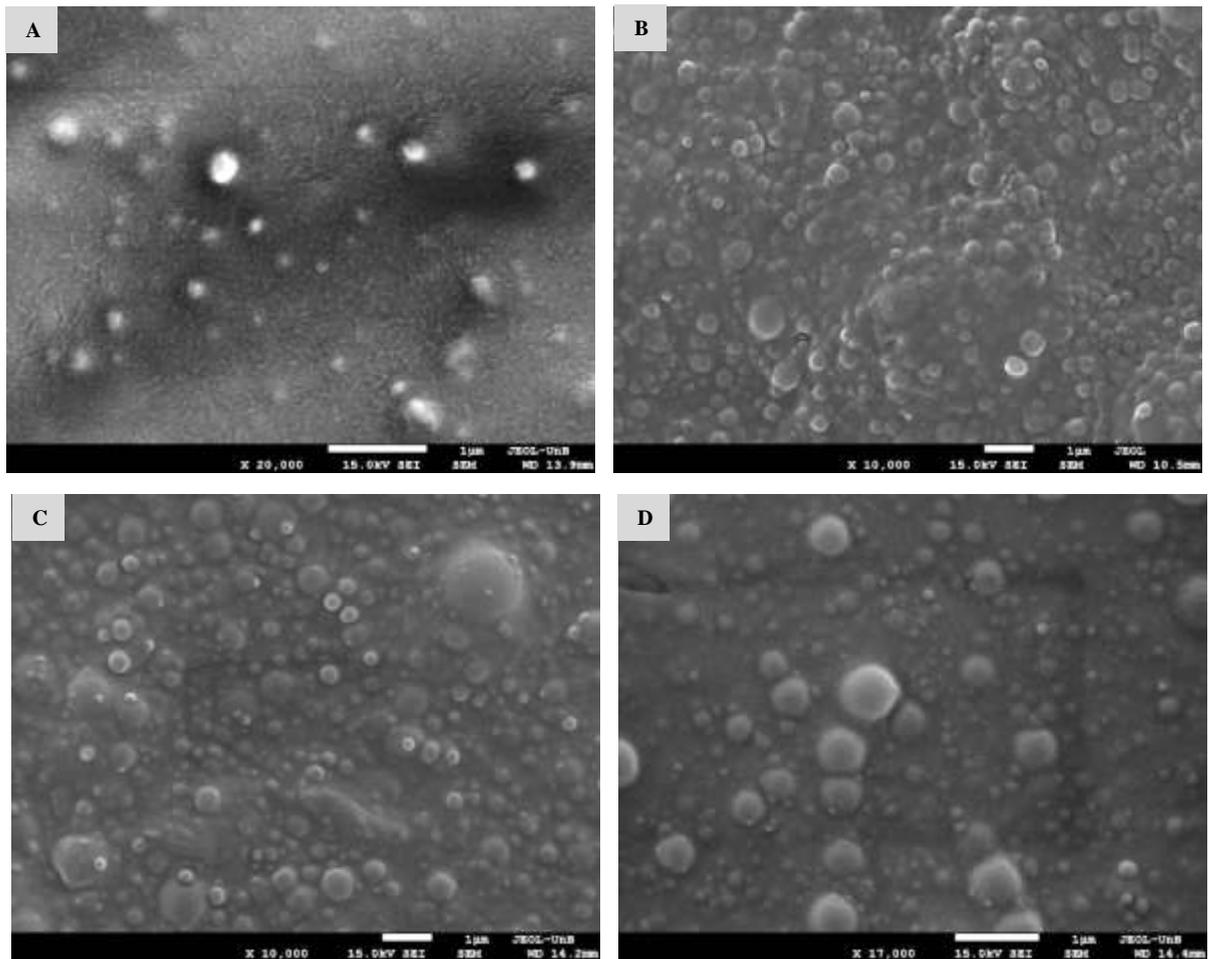


Figura 29. Eletromicrografias de varredura dos nanossistemas (A) NPPs; (B) NPPMag; (C) NPPMagFt e (D) NPPFt em diferentes magnitudes. Todas as barras inferiores correspondem a 1 μm . (NPPs: nanopartículas poliméricas. NPPMag: nanopartículas polimérico-magnéticas. NPPMagFt: nanopartículas polimérico-magnéticas contendo alumínio cloro ftalocianina. NPPFt: nanopartículas poliméricas contendo alumínio cloro ftalocianina).

Como previamente determinado por DLS, através do tamanho médio e baixo PDI, as NPs em suspensão, quando analisadas por MEV, apresentam populações monodispersas com pequena probabilidade de aglomeração mesmo com partículas de diferentes tamanhos. A camada de solvatação que envolve os nanossistemas quando dispersos em meio aquoso pouco influencia nos resultados de tamanho médio obtidos por microscopia eletrônica uma vez que, para esses ensaios, a suspensão passa pelo processo de secagem para somente em seguida ser analisado.

A morfologia dos diferentes nanossistemas com base em polímero e contendo as NPFeO nesse estudo estão de acordo com outros trabalhos que observaram um formato predominantemente esférico, bordas regulares e com distribuição uniforme da população de NPs por MEV (ESFANDYARI-MANESH et al., 2015; MOSAFER et al., 2017a).

5.5.2 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

A análise morfológica da forma e determinação dos diâmetros médios das NPs foi realizada por meio de MET. Para as NPPs é possível observá-las com formato esférico bem definido, em tamanhos homogêneos, uniformemente distribuídas na imagem e um contraste escuro nas bordas que pode ser devido à presença do PLGA e também do BSA (FIGURA 30).

Bootdeen et al. (2012) e Manoochehri et al. (2013) sintetizaram NPs de PLGA com formato esférico bem definido de cerca de 200 nm. De acordo com esses estudos, o surfactante usado para a preparação dos nanossistemas pode ter sido o responsável por formar uma estrutura na superfície denominada de núcleo-casca que, como relatado por Hu et al. (2007), possivelmente impede a opsonização eficiente de NPs de PLGA.

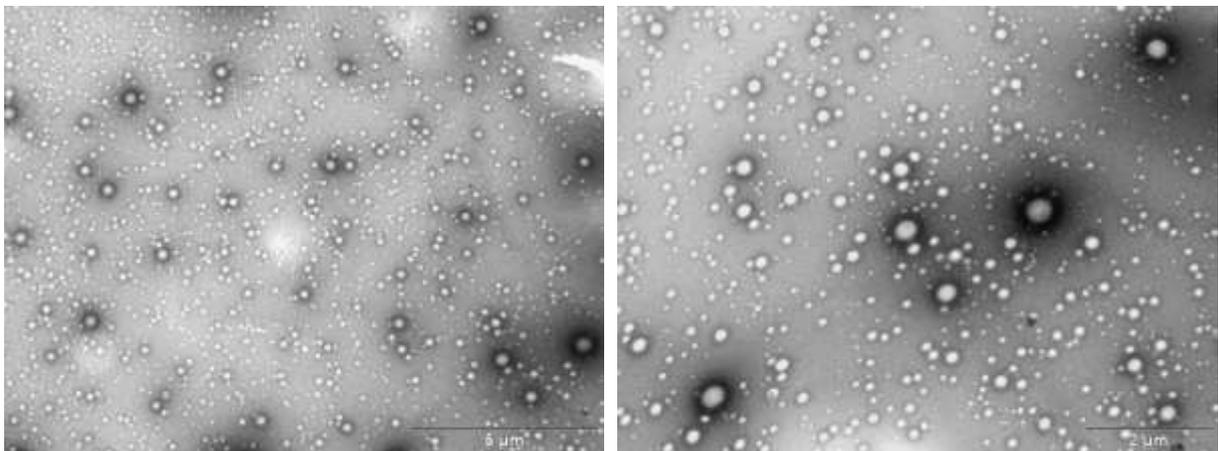


Figura 30. Eletromicrografias de transmissão das NPPs. (NPPs: nanopartículas poliméricas).

As micrografias das NPPMag mostram que a parte magnética da qual elas são formadas aparecem dentro das malhas de PLGA, ou seja, no interior das NPs ou muito próximo dele; além disso, assim como as NPPs, elas possuem forma esférica bem definida com bordas escurecidas ao redor da superfície e mesmo com os dados de DLS nos quais essa população foi a maior em DH ($246 \text{ nm} \pm 9$) não são visualizados aglomerados. De acordo com o observado no momento da análise, quando o feixe de elétrons incidia sobre as amostras, as NPFeO encapsuladas deslocavam-se para as bordas. Com o intuito de demonstrar a presença magnética nas NPPMag, imagens em diversas magnitudes são mostradas (FIGURA 31)

Ao produzir NPs de PLGA encapsulando magnetita de 200 nm, Bootdee et al. (2012) observaram que o material magnético estava distribuído de maneira homogênea dentro das nanoesferas. Em um recente trabalho, Saengruengrit et al. (2018) mostraram que nanossistemas poliméricos-magnéticos revestidos por BSA tiveram comportamento uniforme

ao serem analisados por MET com diâmetro em torno de 10 nm; ainda segundo esses autores, a carga do surfactante proteico não levou à alteração significativa na morfologia das NPs. Aravind et al. (2013) demonstram que a conjugação de NPs de PLGA com um fluído magnético resulta em imagens esféricas e uma população com tamanho entre 50-300 nm.

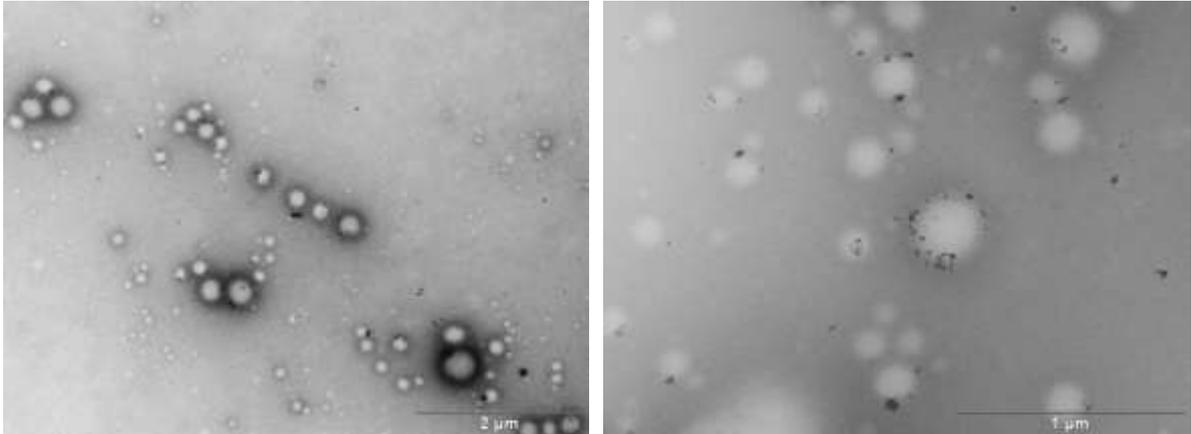


Figura 31. Eletromicrografias de transmissão das NPPMag. (NPPMag: nanopartículas polimérico-magnéticas.).

Nas imagens de NPPMagFt, a presença da AICIFt parece ter sido responsável por formar ruídos e por algum motivo “esconder”, em sua maioria, a presença das NPFeO devido à possível competição com a AICIFt pelo encapsulamento eficiente. No entanto, as outras características foram preservadas e as populações mostravam-se bem distribuídas e bem definidas quanto ao formato esférico, presença da camada de recobrimento formada por polímero e surfactante na superfície, além de uma micrografia em maior aumento mostrando uma partícula carregando o núcleo magnético em seu interior (FIGURA 32).

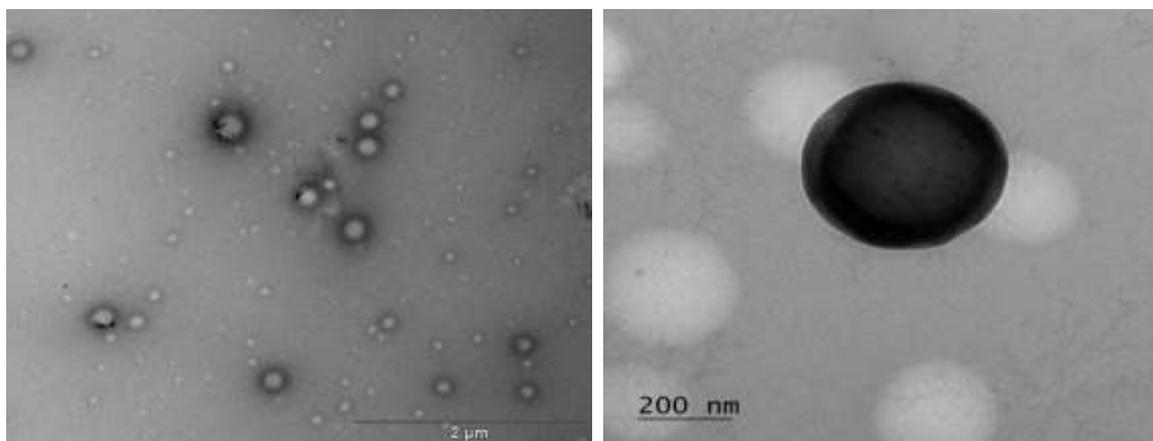


Figura 32. Eletromicrografias de transmissão das NPPMagFt. (NPPMagFt: nanopartículas polimérico-magnéticas contendo alumínio cloro ftalocianina).

Os nanossistemas NPPFt apresentaram-se esféricos e com uma população bastante monodispersa, corroborando com os dados de DLS no qual o tamanho em suspensão foi de $146 \text{ nm} \pm 2,1$ e PdI de 0,1. Talvez a presença do fotossensibilizante nessa preparação tenha causado uma menor definição/nitidez das NPs, o que pode ser observado na Figura 33 (à direita), mesmo assim o contraste dado pelo PLGA é facilmente distinguido.

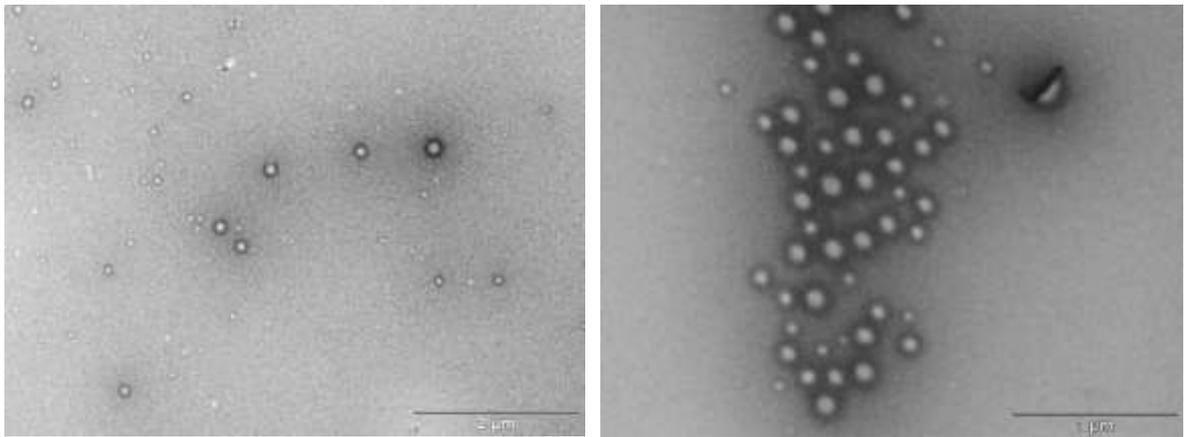


Figura 33. Eletromicrografias de transmissão das NPPFt. (NPPFt: nanopartículas poliméricas contendo alumínio cloro ftalocianina).

5.6 Avaliação biológica *in vitro*

5.6.1 Incorporação de AlClFt nas células

A nanotecnologia é uma ciência útil na melhoria de diferentes características de fármacos anticâncer que atingem a massa tumoral e ainda conseguem chegar a locais subcelulares (JOANITTI et al., 2017). Nesse sentido, promover a dispersão da AlClFt em meios nanoestruturados que têm fácil dispersão pelas organelas biológicas contribui para a diminuição da agregação desse FS uma vez que, em meio aquoso, isso ocorre devido sua composição hidrofóbica dificultando a internalização pelas células (MUEHLMANN et al., 2014; MUEHLMANN et al., 2015). Para verificar o perfil de internalização da AlClFt nas células em diferentes tempos de exposição às NPPMagFt e em diferentes concentrações do fotossensibilizante, conforme descrito na Tabela 6, foi utilizada a técnica de citometria de fluxo. A Figura 34 mostra os resultados para as células 4T1 e NIH-3T3; a célula MCF-7 não respondeu à captura da AlClFt nas duas vezes em que o experimento foi realizado possivelmente devido ao lote das células utilizadas que apresentava problemas no metabolismo e crescimento celular.

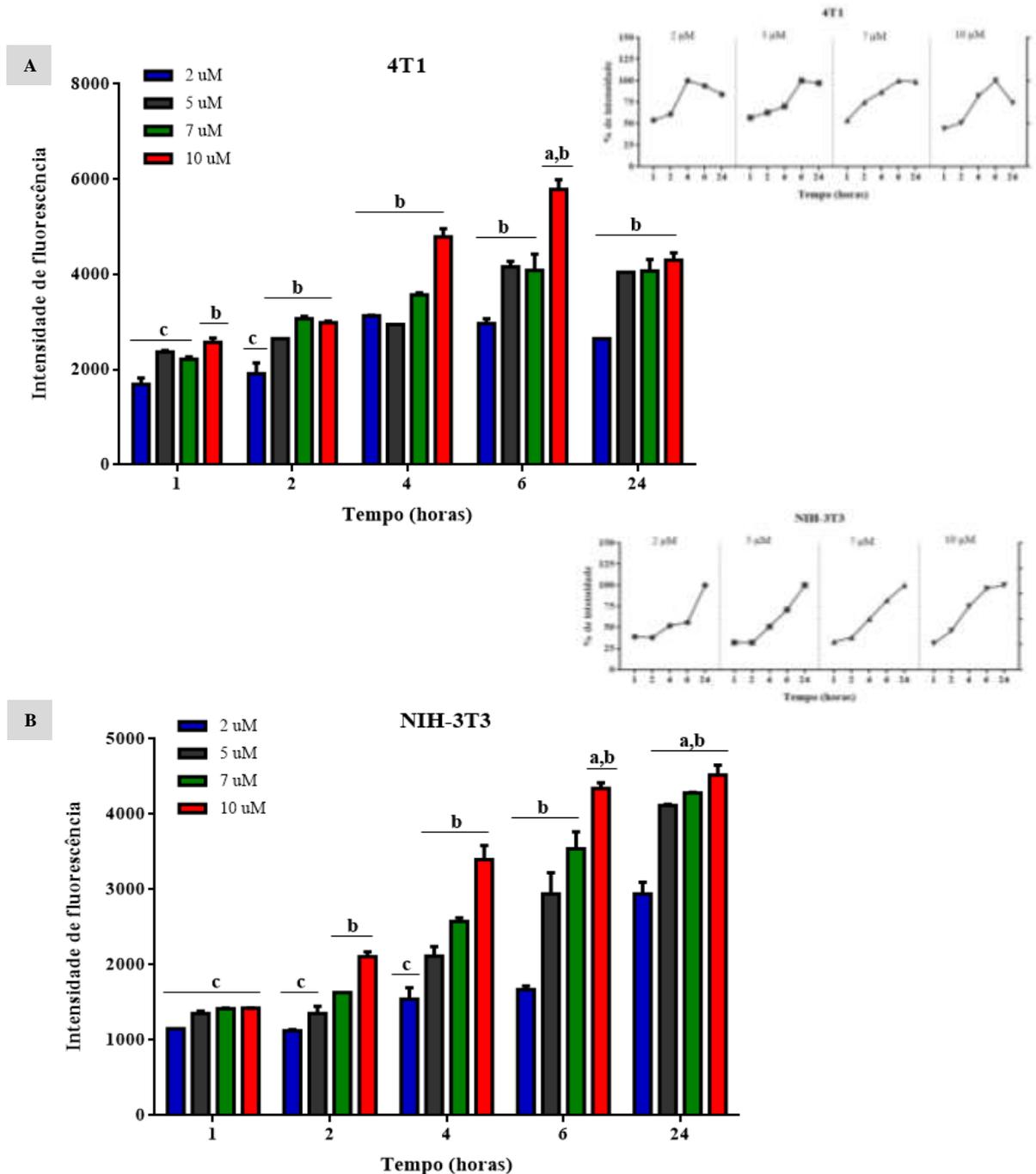


Figura 34. Intensidade de fluorescência da AICIFt em células 4T1 (A) e NIH-3T3 (B) expostas às NPPMagFt (Em detalhe, acima dos gráficos, normalização pelo tempo máximo em que observa-se 100% de intensidade de fluorescência em cada concentração). Letras iguais acima das barras indicam grupos sem diferença estatística ($p < 0,05$).

As figuras acima mostram como se dá a quantificação da intensidade de fluorescência da AICIFt nas células 4T1 e NIH-3T3 após diferentes tempos e evidencia que o sinal da AICIFt em 4T1 foi maior do que o observado para a linhagem não tumoral, chegando a ter quase 40% mais sinal de fluorescência. Enquanto para 4T1, a 2 μM da AICIFt o valor máximo de fluorescência se dá após 4 horas de exposição, nas concentrações de 5 μM , 7 μM e 10 μM esse tempo se eleva para as 6 horas podendo ser um indício do efeito “aprisionador”

do fotossensibilizante em maiores concentrações nas NPPMagFt impedindo sua captura pelas células. Nas células tumorais é observada uma diferença significativa ($p < 0,05$) da captação da AICIFt após 6 horas na maior concentração em relação às concentrações do tempo de 1 hora e esse efeito também é visualizado para as menores concentrações dos tempos de 2 e 4 horas.

Quando analisados os dados das células NIH-3T3, a intensidade de fluorescência no maior período de incubação com o nanossistema é maior em todas as concentrações testadas em comparação com as mesmas concentrações nos tempos inferiores. Observa-se também uma intensa fluorescência quando as células são expostas por 6 horas a 10 μM de FS, assim como por 24 horas a 5, 7 ou 10 μM quando comparado com todas as concentrações do menor tempo testado (1 hora) e as menores concentrações (2 e 5 μM) nos tempos de 2 e 4 horas, indicando que a internalização da molécula da AICIFt no nanossistema estudado varia de acordo com a quantidade de FS e com o tempo de contato com as células não-tumorais.

A porcentagem de intensidade fluorescente da AICIFt para 4T1 pode ser acompanhada também por gráficos de dispersão que demonstram uma captação de mais de 50% do fotossensibilizante após 2 horas de ensaio em todas as concentrações e uma tendência à diminuição dessa porcentagem após o alcance máximo de fluorescência (FIGURA 34A, acima). Já para NIH-3T3, a internalização ocorreu de maneira considerável mostrando um aumento a partir das 4 horas de ensaio para as maiores concentrações; a 2 μM da AICIFt, a internalização nessas células demonstrou um aumento expressivo somente após 6 horas (FIGURA 34B, acima). Esses resultados indicam que células tumorais tendem a consumir mais o meio dispersante de nanossistemas constituídos por AICIFt e por consequência de seu metabolismo internalizar em até quatro horas grande parte dessa molécula disponível nas concentrações aqui definidas corroborando com Aizadeh et al. (2014) que demonstram uma maior habilidade de células tumorais na internalização de moléculas de FS do que células não tumorais, assim há um aumento na quantidade deles em tecidos ou células-alvo melhorando seu desempenho terapêutico (NDHUNDHUMA et al., 2011; GARG et al., 2014; WEIJER et al., 2015; LAN et al., 2016; JOANITTI et al., 2017). Ainda de acordo com Joanitti et al. (2017), quando os FS são veiculados a nanossistemas, o destino intracelular pode ser alterado em relação ao destino da molécula livre.

Um diferencial desse estudo e que vale a pena ser ressaltado é que foram testadas diferentes concentrações da AICIFt presente nas NPPMagFt, além de tempos distintos de incubação deste com as linhagens celulares. Essa escolha foi feita com o objetivo de estudar essas variáveis uma vez que o próprio nanossistema foi também desenvolvido pela primeira vez para a aplicação na terapia fotodinâmica no combate ao câncer. As NPPMagFt utilizadas

estavam acondicionadas em geladeira e no período de realização dos ensaios *in vitro* tinham um diâmetro de aproximadamente $220 \text{ nm} \pm 3,2$ e PtZ de $-24 \text{ mV} \pm 0,5$ e, de acordo com Gianizeli (2015), apesar das ftalocianinas serem lipofílicas e na sua forma livre conseguirem atravessar a membrana celular por difusão, neste estudo elas estavam em uma suspensão de NPs e isso pode ter dificultado a captura pelas células, principalmente as MCF-7, aliado ao tamanho médio medido por DLS, e outro fator que justifica essa proposição é a ausência de dados que mostrem qual a porcentagem de incorporação total do fotossensibilizante por cada uma das linhagens celulares. O efeito da carga de superfície dos nanossistemas desempenha um papel fundamental na captação celular e internalização deles (CIANI et al., 2007; SILVA, 2013). Quando essa carga apresenta-se negativa, ou seja, aniônica, as NPs localizam-se em membranas e organelas celulares (SOUKOS et al. 1997) sugerindo que em uma investigação do local de destino das NPPMagFt pelas células 4T1 e NIH-3T3 deste estudo estas poderiam ser encontradas acumuladas no citosol. Ensaios posteriores com marcadores de organelas citoplasmáticas deverão ser realizados como parte de continuação do presente estudo a fim de confirmar essa hipótese e definir a citolocalização desse nanossistema.

Trabalhos anteriores reportam resultados semelhantes em relação ao perfil de captação da AICIFt dispersa em nanossistemas entre células cancerosas e não cancerosas. Ma (2012) estudou essa captação de AICIFt associadas à NPs poliméricas e verificou que, após 60 minutos de incubação, a incorporação era mais elevada nas células tumorais MCF-7 e 4T1 em comparação às NIH-3T3. Por outro lado, Camargo (2018) mostrou que a AICIFt em NPs poliméricas contendo DOX foi mais efetivamente internalizada por células 4T1 após o período de 180 minutos. Em um estudo anterior a esses, Romero et al. (2010) produziram NPs de PLGA estabilizadas com BSA e mostraram que, mesmo sem a presença do fotossensibilizante, a captação do nanossistema alcançou um patamar correspondente a 90% nas células HepG2 de hepatocarcinoma humano durante as seis horas iniciais de incubação indicando que mesmo envolvido por uma superfície polimérica rígida, esse tipo de nanossistema é passível de internalização celular na ausência de FS.

A AICIFt em nanoemulsões também já teve seu perfil de incorporação investigado nas mesmas linhagens celulares descritas neste estudo e, de forma geral, o melhor tempo de incubação dos nanossistemas com as células em que a intensidade de fluorescência era mais elevada foi de 15 e 60 minutos com o fotossensibilizante sendo encontrado principalmente no citoplasma das células tumorais (SILVA, 2013; MUEHLMANN et al., 2014; RODRIGUES, 2018). No entanto, em nanopartículas magnéticas tendo a AICIFt adsorvida na superfície, foi

possível, após 15 minutos de incubação, observar que o comportamento de captação celular foi maior para células de fibroblastos murinos NIH-3T3 do que para 4T1 (GIANIZELI, 2015).

5.6.2 Avaliação da citotoxicidade dos nanossistemas

Este ensaio teve como principal objetivo avaliar o efeito citotóxico dos nanossistemas em diferentes concentrações nas células MCF-7, 4T1 e NIH-3T3. Para representar a viabilidade em 100%, foi utilizado o controle do meio DMEM completo. Inicialmente, na Figura 35, são apresentados os dados para MCF-7.

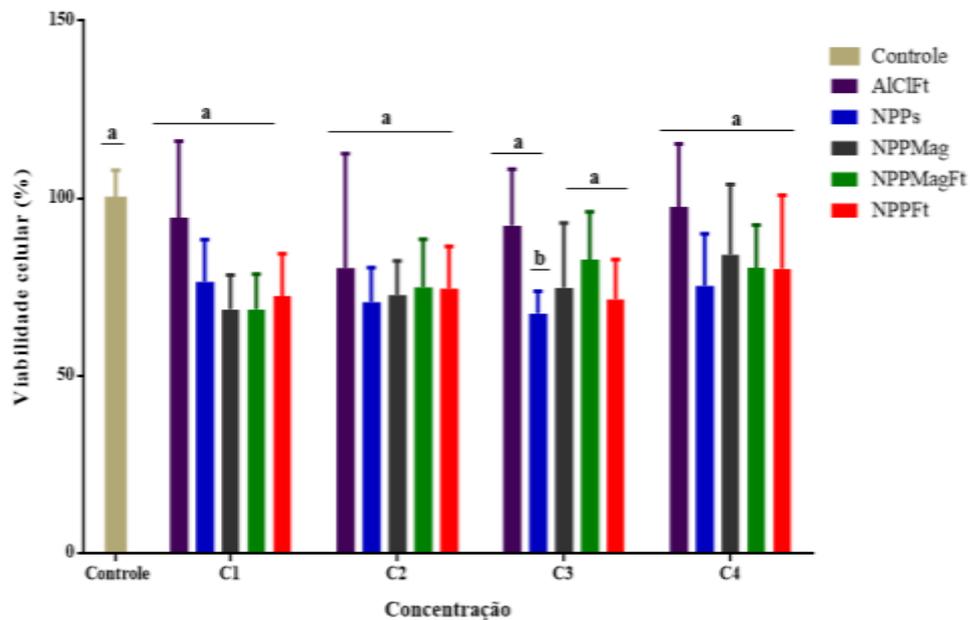


Figura 35. Ensaio de viabilidade celular pelo método de MTT em células MCF-7 submetidas a diferentes concentrações e distintos nanossistemas. Onde C1= 0,4 mg de PLGA e/ou 2 μ M de AICIFt; C2= 1 mg de PLGA e/ou 5 μ M de AICIFt; C3= 1,4 mg de PLGA e/ou 7 μ M de AICIFt; C4= 2 mg de PLGA e/ou 10 μ M de AICIFt. Letras iguais acima das barras indicam grupos sem diferença estatística em relação ao controle ($p < 0,05$). (Controle: células somente com meio DMEM. AICIFt: alumínio cloro ftalocianina. NPPs: nanopartículas poliméricas. NPPMag: nanopartículas polimérico-magnéticas. NPPMagFt: nanopartículas polimérico-magnéticas contendo alumínio cloro ftalocianina. NPPFt: nanopartículas poliméricas contendo alumínio cloro ftalocianina).

As células MCF-7, quando expostas à AICIFt, tiveram a sua viabilidade reduzida a 80% quando a concentração do FS era 5 μ M, no entanto, em nenhuma das concentrações-teste, esses valores foram diferente significativamente do controle ($p < 0,05$).

Ao serem expostas a todos os nanossistemas desenvolvidos, foi observada uma diferença significativa na viabilidade celular ($p < 0,05$) apenas na concentração de 1,4 mg de PLGA e/ou 7 μ M de AICIFt (C3) para as NPPs, resultando em 67%. As NPPMagFt reduziram a viabilidade para 68% e 75% quando a concentração do polímero e FS era de 0,4 mg e 2 μ M (C1) ou 1 mg e 5 μ M (C2), respectivamente, no entanto, sem haver significância em relação ao controle ($p < 0,05$). A exposição das células a qualquer um dos nanossistemas nas

concentrações de 1,4 e 2 mg de PLGA e/ou 7 e 10 μM de AICIFt (C3 e C4) não causou redução significativa nas células comparando esses resultados ao controle. Vale ressaltar que essas reduções na viabilidade também não são diferentes significativamente quando comparadas entre os nanossistemas dentro de uma mesma concentração.

Ma (2012) expôs células MCF-7 a nanossistemas poliméricos com AICIFt e observou a ausência de toxicidade sob diferentes concentrações sem irradiação. De acordo com a autora, o fato de células humanas demorarem aproximadamente 25 horas para passarem por divisão celular pode ter influenciado nos resultados descritos uma vez que a exposição das células antes da realização do MTT durou 15 minutos. Aravind et al. (2013) testou um nanocarreador multifuncional polimérico contendo NPs magnéticas e o quimioterápico PTX e observaram que o efeito citotóxico em MCF-7 foi dose-dependente sendo mais pronunciado quando todos os componentes estavam presentes eliminando até 75% de células vivas. Nanossistemas poliméricos com AICIFt foram citotóxicos para até 70% de células MCF-7 na concentração de 0,5 nM de AICIFt (CAMARGO, 2018).

Os resultados de citotoxicidade para a linhagem 4T1 são mostrados na Figura 36.

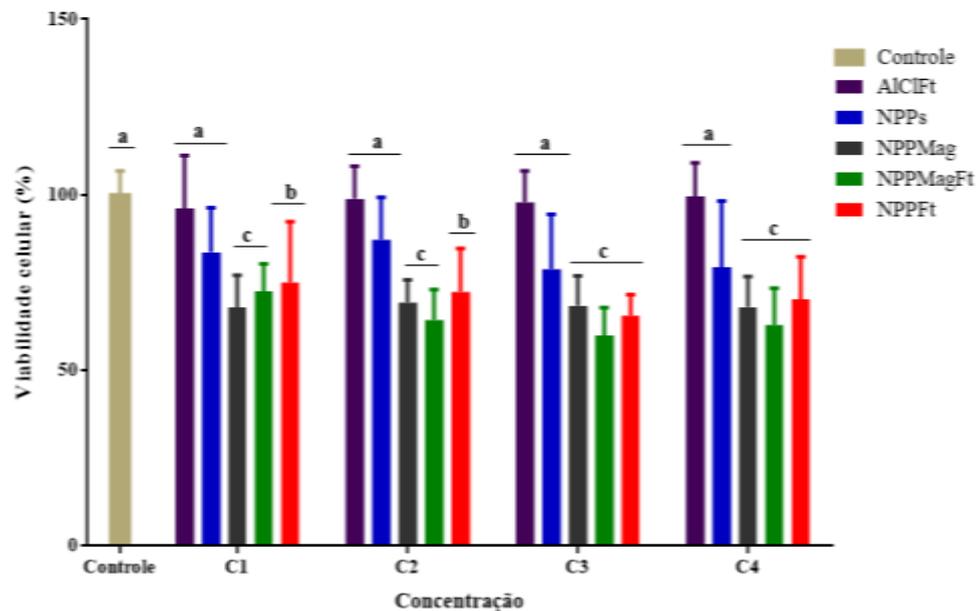


Figura 36 Ensaio de viabilidade celular pelo método de MTT em células 4T1 submetidas a diferentes concentrações e distintos nanossistemas. Onde C1= 0,4 mg de PLGA e/ou 2 μM de AICIFt; C2= 1 mg de PLGA e/ou 5 μM de AICIFt; C3= 1,4 mg de PLGA e/ou 7 μM de AICIFt; C4= 2 mg de PLGA e/ou 10 μM de AICIFt. Letras iguais acima das barras indicam grupos sem diferença estatística em relação ao controle ($p < 0,05$). (Controle: células somente com meio DMEM. AICIFt: alumínio cloro ftalocianina. NPPs: nanopartículas poliméricas. NPPMag: nanopartículas polimérico-magnéticas. NPPMagFt: nanopartículas polimérico-magnéticas contendo alumínio cloro ftalocianina. NPPFt: nanopartículas poliméricas contendo alumínio cloro ftalocianina).

De acordo com os resultados apresentados acima, observa-se a AICIFt dispersa em meio aquoso não causou alteração no perfil de viabilidade de células 4T1 em nenhuma das concentrações ($p < 0,05$). Os nanossistemas induziram morte celular em diferentes proporções às células murinas de câncer de mama. Enquanto a viabilidade resultante da exposição às NPPs não diferiu do controle em nenhuma das concentrações testadas, todos os outros nanossistemas apresentaram redução significativa da viabilidade celular em pelo menos uma concentração em relação ao controle. As NPPMag, independente da concentração, provocaram diminuição significativa ($p < 0,001$) para 68% de células vivas em relação ao controle. Para o nanossistemas contendo a contribuição magnética e AICIFt – NPPMagFt – destacam-se o perfil citotóxico nas duas maiores concentrações (C3 e C4) de polímero e FS (1,4 e 2 mg de PLGA; 7 e 10 μM de AICIFt) que mostraram redução significativa do controle ($p < 0,001$) para 59% e 62%, respectivamente. O nanossistema polimérico contendo o FS – NPPFt – nas mesmas concentrações acima, teve uma porcentagem de 65% e 70% de células viáveis, sendo distinto ($p < 0,001$) do controle. Como observado, apenas em maiores concentrações dos componentes dos nanossistemas desenvolvidos no presente estudo, foi possível detectar redução significativa na viabilidade de células tumorais murinas de mama.

Resultados de viabilidade celular para essa mesma célula foram apresentados por Muehlmann et al. (2014) onde, a partir de 8 μM da AICIFt, o nanossistema polimérico de PVM/MA era citotóxico em até 42%; quando a concentração se elevava para 12 μM esse valor aumentava para 91%. Silva (2013) produziu uma nanoemulsão polimérica com e sem extrato vegetal e mostrou que, após 24 horas, concentrações acima de 450 $\mu\text{g/mL}$ para a nanoemulsão branca e de 54 $\mu\text{g/mL}$ da nanoemulsão com o extrato vegetal foram responsáveis por reduzir a viabilidade em 75% e 55%, respectivamente em 4T1. Quando o FS AICIFt estava associado a uma nanoemulsão com o surfactante Cremophor[®] foi constatada redução da viabilidade de células 4T1 para até 79% (MOURA, 2017). Do contrário, em recentes estudos, Rodrigues (2018) não observou toxicidade significativa para essas células mantidas no escuro após contato com diferentes concentrações de uma nanoemulsão com o surfactante Cremophor[®] contendo AICIFt e Camargo (2018) observou redução significativa, chegando próximo a zero, da viabilidade de 4T1 quando expostas à NPs poliméricas de PVM/MA contendo o FS na concentração de 0,6 nM.

A Figura 37 apresenta os dados de citotoxicidade para as células não tumorais NIH-3T3.

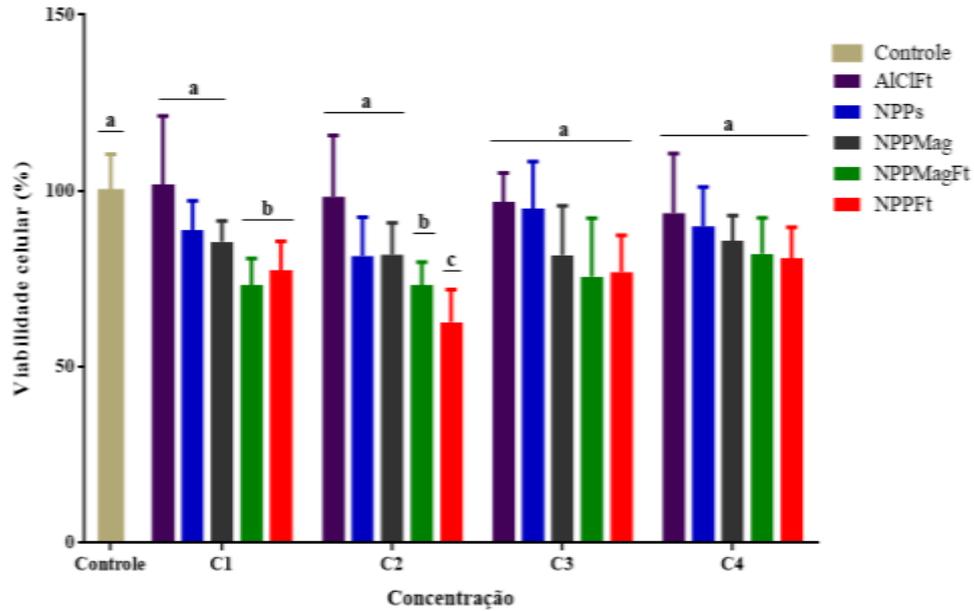


Figura 37. Ensaio de viabilidade celular pelo método de MTT em células de fibroblastos NIH-3T3 submetidas a diferentes concentrações e distintos nanossistemas. Onde C1= 0,4 mg de PLGA e/ou 2 μ M de AICIFt; C2= 1 mg de PLGA e/ou 5 μ M de AICIFt; C3= 1,4 mg de PLGA e/ou 7 μ M de AICIFt; C4= 2 mg de PLGA e/ou 10 μ M de AICIFt. Letras iguais acima das barras indicam grupos sem diferença estatística em relação ao controle ($p < 0,05$). (Controle: células somente com meio DMEM. AICIFt: alumínio cloro ftalocianina. NPPs: nanopartículas poliméricas. NPPMag: nanopartículas polimérico-magnéticas. NPPMagFt: nanopartículas polimérico-magnéticas contendo alumínio cloro ftalocianina. NPPFt: nanopartículas poliméricas contendo alumínio cloro ftalocianina).

Em comparação com o controle, quando expostas ao FS livre, as células não apresentaram diferenças significativas no perfil de células viáveis ($p < 0,05$). Os nanossistemas NPPs e NPPMag, independente da concentração-teste, não mostraram reduções significativas na viabilidade celular quando comparadas ao controle. No entanto, as NPPMagFt diminuem a viabilidade em relação ao controle para 73% ($p < 0,05$) nas duas menores concentrações, ou seja, 0,4 e 1 mg de PLGA e 2 e 5 μ M de AICIFt (C1 e C2). Já as NPPFt, quando em contato com PLGA a 1 mg e 5 μ M do FS (C2), reduz o número de células viáveis para 62%, sendo significativamente diferente ($p < 0,001$) do controle. É possível perceber que para as células de fibroblastos testadas, o perfil de citotoxicidade causado pelos nanossistemas polimérico-magnéticos ou apenas pelos poliméricos com a AICIFt é mais significativo quando a concentração dos constituintes presentes nos nanossistemas é menor, de acordo com as especificações apresentadas nesse estudo; esses resultados sugerem que mesmo a utilização de quantidades pequenas de polímero e FS podem ser suficientes para gerar diminuição dessas células, sendo esse um fato para atentar-se uma vez que tratam-se de células não tumorais.

No presente estudo, essa foi a linhagem celular não tumoral utilizada para testar o potencial citotóxico dos nanossistemas e da AICIFt livre. Essa mesma linhagem já foi utilizada em outros trabalhos e nos resultados de Ma (2012), a taxa de NIH-3T3 viáveis após

tratamento com NPs poliméricas de PVM/MA contendo o FS AICIFt foi 69%, 35% e 15% nas concentrações de 4, 8 e 12 μM de FS, respectivamente; enquanto que Camargo (2018) utilizando o mesmo polímero nanoestruturado com o FS a 0,5 nM obteve 10% de células viáveis. Quando essas células foram expostas a uma nanoemulsão contendo extrato vegetal de cajuru, obteve-se uma CC_{50} próxima a 360 $\mu\text{g/mL}$ com viabilidade celular em torno de 25% (SILVA, 2013). Em nanoemulsões com base em óleo de açaí após 24 horas, a concentração obtida que eliminava 10% das células viáveis de NIH-3T3 (CC_{10}) foi de 71,5 $\mu\text{g/mL}$ e aquela que eliminava 50% dessas células (CC_{50}) foi de 171,6 $\mu\text{g/mL}$ (MONGE-FUENTES, 2014). Moura (2017) constatou uma redução para 87% na viabilidade desses fibroblastos quando tratados com nanoemulsões utilizando Cremophor[®] contendo o FS em concentrações acima de 10 μM .

Os resultados dos ensaios de viabilidade em diferentes linhagens celulares após exposição aos nanossistemas e ao grupo contendo o FS livre demonstram que o tratamento com a AICIFt dispersa em meio aquoso não demonstrou reduções elevadas na viabilidade celular em relação ao controle utilizado no estudo. Dados não mostrados evidenciam que o tratamento com o PLGA foi bastante citotóxico, no entanto, os resultados são devido ao solvente orgânico diclorometano (DCM) no qual o polímero estava disperso e não ao polímero em si; além disso, quando expostas somente à solução de BSA não foram visualizadas diferenças estatísticas significantes no perfil de viabilidade celular (dados não mostrados). Além disso, não foram observadas diferenças estatísticas entre os resultados de viabilidade promovidos pelos nanossistemas em uma mesma concentração para todas as linhagens celulares, podendo sugerir que os diferentes componentes juntos não interferem na viabilidade celular. Vale ressaltar que o polímero PLGA quando aplicado em sua forma livre nas células foi capaz de induzir significativas perdas na viabilidade celular, porém, quando incorporado a um nanossistema, essas reduções não foram significativas.

De forma geral, os resultados apresentados acima evidenciam que os nanossistemas foram citotóxicos na ausência de irradiação utilizando o ensaio de MTT nas diferentes concentrações dos constituintes e diversos fatores podem ajudar nesse entendimento. Entre eles está o índice de proliferação celular, ou seja, o período em que células murinas e humanas levam para se dividir, sendo que, como relatam Ren et al. (2011), aquelas que proliferam mais tendem a ser mais susceptíveis à ação de diferentes drogas. De acordo com Ma (2012), enquanto células de mama murinas se dividem a cada 12 horas, células de mama humanas levam até 25 horas e essa poderia ser uma razão para a diferença de citotoxicidade entre as células de diferentes origens utilizadas no presente estudo, onde

células humanas (MCF-7) quando expostas a qualquer dos nanossistemas em qualquer das concentrações de seus componentes tiveram uma queda de 30 a 35% da viabilidade, enquanto células murinas de mama (4T1) tiveram uma queda de 35 a 40% da viabilidade, independente do nanossistema e da concentração de seus componentes. Outro fator intrínseco às células estudadas é a instabilidade genética das células tumorais que as tornam incapazes de reparar erros e danos no material genético aumentando as mutações ao longo do tempo e inativando mecanismos de morte celular; do contrário, células não tumorais identificam, reparam e disparam mecanismos específicos para minimizar esses danos e impedir sua propagação que muitas vezes as levam à morte celular (LORD & ASHWORTH, 2012; LOZY & KARANTZA, 2012), por isso então que a frequência de células viáveis muitas vezes esperada é maior para linhagens tumorais em comparação às não tumorais, o que também não foi observado no presente estudo.

Quanto aos componentes dos nanossistemas desenvolvidos, já foi relatada na literatura a baixa citotoxicidade e alta compatibilidade e segurança no uso de polímeros como o PLGA em nanotecnologia (DAVDA & LABHASETWAR, 2002; KONAN et al., 2003). O FS AICIFt livre já se mostrou inócuo à células tumorais e não tumorais em várias concentrações-teste (PAULA et al., 2013; RODRIGUES, 2014; MUEHLMANN et al., 2015). Entretanto, as NPFeO têm demonstrado toxicidade celular por meio de mecanismos que envolvem diretamente os íons de ferro livre, como a geração de ERO, liberação de enzimas mitocondriais envolvidas na respiração e danos ao DNA levando a não progressão do ciclo celular (COTRUVO & STUBBE, 2011; IMAM et al., 2015; POURCELOT et al., 2015). Isso pode estar relacionado à capacidade dessas NPs serem citotóxicas de uma maneira dose-dependente (HSIEH et al., 2015) e também a achados que relatam que o ferro em concentrações nanomolares no citoplasma leva à proliferação celular e em concentrações micromolares pode ser tóxico às células (POURCELOT et al., 2015). Ressalta-se que a massa de NPFeO utilizada no preparo dos nanossistemas foi de 1,32 mg e que mesmo aparentemente pequena parece ter influenciado nos índices de viabilidade celular aqui apresentados.

Alguns outros estudos da literatura utilizando nanossistemas similares aos aqui desenvolvidos, porém testados contra outros tipos de células, também causaram citotoxicidade. Romero et al. (2010) sintetizaram NPs de PLGA estabilizadas com BSA e testaram a viabilidade desse nanossistema em distintas linhagens celulares e os achados evidenciam que após 24 horas não houveram alterações para as linhagens de linfoblastos (Hmy2), linfócitos T (Jurkat) e leucemia (U937), enquanto que células de câncer de fígado (HepG2) e câncer de próstata (PC3) tiveram redução de 40% e 90% de células viáveis,

respectivamente. Yu et al. (2012) produziram o mesmo nanossistema que o descrito acima e mostram que em diferentes concentrações a viabilidade de células endoteliais (CRL-1730) foi mantida sem redução significativa quando comparada ao controle, chegando a ter 86,5% de células vivas na concentração de 150 µg/mL.

Trabalhando com nanopartículas polimérico-magnéticas encapsulando um composto fenólico extraído de óleos essenciais vegetais e testando contra uma linhagem tumoral do fígado – Hep3B, Rajan et al. (2014) apresentam resultados de viabilidade celular diminuindo de maneira dose-dependente de 87% até 13% de células vivas à medida em que a concentração aumenta de 5 µg/mL até 30 µg/mL; os autores enfatizam que a eficácia da biomolécula quando testada livre foi menor em comparação à sua incorporação no nanossistema. Saengruengrit et al. (2018) avaliaram a citotoxicidade de um nanossistema composto por PLGA e FeO em macrófagos murinos RAW 264.7 após 24 horas e os resultados demonstram que a 1.000 µg/mL do nanossistema há perda de até 30% da viabilidade celular. Ao estudar nanossistemas poliméricos de PLGA contendo a AICIFt sem irradiação, Paula et al. (2013) não observaram nenhuma citotoxicidade após os tratamentos com AICIFt na concentração de 10 µM.

5.6.3 Avaliação da citotoxicidade mediada pela TFD com os nanossistemas

Os ensaios de viabilidade celular após aplicação de TFD *in vitro* determinaram a citotoxicidade dos nanossistemas nas células MCF-7, 4T1 e NIH-3T3. Para isso, foram utilizadas a menor concentração (C1= 2 µM de AICIFt e/ou 0,4 mg de PLGA) e a maior concentração (C4= 10 µM de AICIFt e/ou 2 mg de PLGA) dos nanossistemas com e sem o FS. Essas concentrações foram escolhidas com base nos ensaios de citotoxicidade previamente realizados sem a aplicação da TFD uma vez que não houveram diferenças estatísticas no perfil de morte celular entre as quatro concentrações testadas dos nanossistemas para as três linhagens celulares. Além disso, foram padronizados dois diferentes tempos em que as células ficariam expostas aos nanossistemas (15 minutos e quatro horas) com o intuito de comparar a viabilidade celular após irradiação por meio do ensaio de MTT.

Os resultados para a célula MCF-7 são mostrados na Figura 38A e 38B.

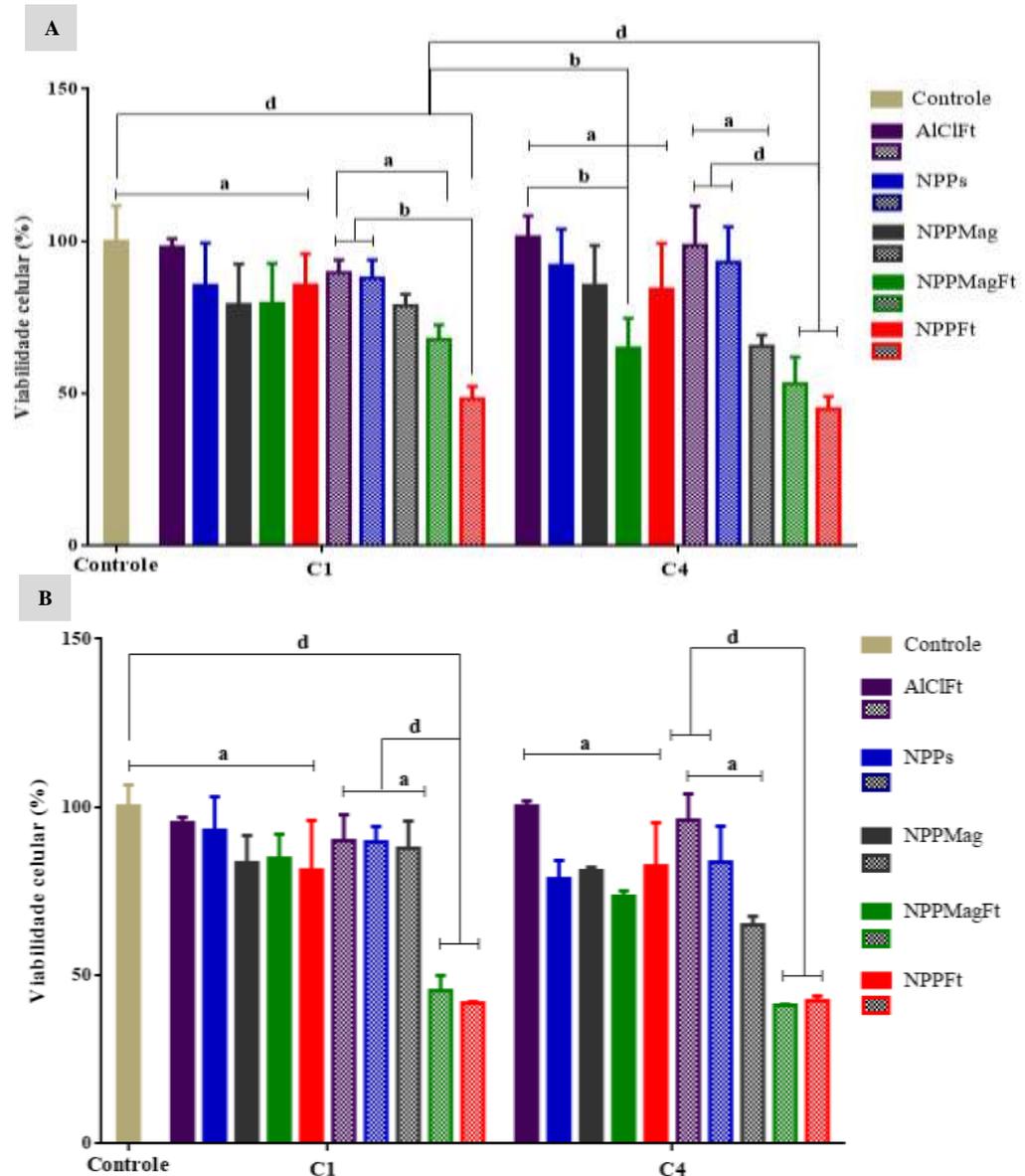


Figura 38. Viabilidade de células MCF-7 pelo método de MTT após exposição por 15 minutos (A) ou quatro horas (B) aos nanossistemas e aplicação de TFD (10 minutos; comprimento de onda de 660 nm; 10 cm de distância da fonte luminosa; fluência de 23 J/cm²). Concentrações utilizadas (C1= 2 μM de AIClFt e/ou 0,4 mg de PLGA; C4= 10 μM de AIClFt e/ou 2 mg de PLGA). Barras lisas refletem os grupos em que as células permaneceram protegidas da luz e não receberam TFD. Barras tracejadas indicam grupos em que as células receberam TFD. Letras iguais acima das barras indicam grupos sem diferença estatística em relação ao controle (p<0,05). (Controle: células somente com meio DMEM. AIClFt: alumínio cloro ftalocianina. NPPs: nanopartículas poliméricas. NPPMag: nanopartículas polimérico-magnéticas. NPPMagFt: nanopartículas polimérico-magnéticas contendo alumínio cloro ftalocianina. NPPFt: nanopartículas poliméricas contendo alumínio cloro ftalocianina).

Como ilustrado na Figura 38A (barras lisas), após exposição por 15 minutos aos nanossistemas protegidos da luz, houve diminuição da viabilidade celular na menor concentração sem aplicação de TFD para 79% causada pela exposição às NPPMag e NPPMagFt. Essa foi a menor porcentagem de células viáveis observada nessa condição,

sendo que não houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos experimentais, nem entre eles e o controle. Na maior concentração-teste, ainda sem aplicação de TFD e após 15 minutos de incubação com os nanossistemas (Figura 38A, barras lisas), o nanossistema NPPMagFt causou redução da viabilidade celular para 64% e foi estatisticamente diferente ($p < 0,05$) do seu grupo controle e do grupo contendo a AICIFt livre. Quando analisados os dados de viabilidade celular após aplicação de TFD, foram observadas maiores sensibilidades das células tratadas com os nanossistemas contendo o FS (NPPMagFt e NPPFt). Na menor concentração (Figura 38A, barras tracejadas), as NPPFt mostraram redução significativa ($p < 0,005$) em relação aos grupos com o FS livre, as NPPs e o controle, diminuindo a viabilidade para 48%. Vale ressaltar que o outro nanossistema contendo a AICIFt – NPPMagFt – causou a redução de células viáveis para 67%, porém, essa redução não foi estatisticamente significativa quando comparada à diminuição da viabilidade de células expostas aos demais nanossistemas com ou sem a aplicação da TFD e às células controle, indicando que apesar da redução de células viáveis, esta não foi tão eficiente quanto o nanossistema NPPFt nessa concentração do FS. Na maior concentração após aplicação de TFD (Figura 38A, barras tracejadas) é possível observar uma drástica perda de viabilidade de células MCF-7 ($p < 0,0001$) quando tratadas com os nanossistemas NPPMagFt e NPPFt chegando a valores de 53% e 44% de células vivas, respectivamente, quando comparados aos seus grupos controle e com AICIFt livre e NPPs, porém, sem diferença estatística entre eles.

Nos ensaios de TFD com as células MCF-7 após incubação por quatro horas com os grupos experimentais não foram detectadas diferenças estatísticas ($p < 0,05$) quando as células permaneceram protegidas da luz nas duas concentrações dos nanossistemas (Figura 38B, barras lisas). A menor porcentagem de células viáveis foi de 73% ocasionada pelas NPPMagFt na concentração de 10 μM de AICIFt e 2 mg de PLGA (C4). No entanto, quando aplicada a TFD (Figura 38B, barras tracejadas), as células com os tratamentos NPPMagFt e NPPFt na menor concentração mostraram significativa perda da viabilidade ($p < 0,0001$) em comparação aos outros grupos experimentais e aos seu grupo controle, sem diferença estatística entre eles. Nessas condições, a porcentagem de células viáveis desses grupos contendo o FS chegou em 45% e 41%, respectivamente. Esses valores foram próximos aos encontrados para esses mesmos grupos na maior concentração-teste (Figura 38B, barras tracejadas) que chegaram a 41% e 42%, respectivamente e foram significativamente distintos ($p < 0,0001$) do controle e dos grupos com AICIFt livre e das NPPs, mas não tiveram diferença significativa entre eles. Nessa concentração, mesmo o grupo NPPMag mostrou perda da viabilidade celular de 64% após as quatro horas de exposição das células ao nanossistema,

mas esse resultado foi estatisticamente semelhante ao controle e aos demais nanossistemas. Dessa forma, é possível observar que para as células MCF-7, nas condições estabelecidas no presente estudo, o efeito citotóxico é mais pronunciado após incubação das células por quatro horas com os nanossistemas e irradiação independente da concentração dos seus constituintes e que as células são mais sensíveis aos tratamentos com os grupos experimentais contendo a AlCIFt, ou seja, as NPPMagFt e NPPFt.

Alguns estudos destacam a eficiência da TFD quando a AlCIFt está associada a nanopartículas poliméricas de PVM/MA. Em 2014, Muehlmann et al. (2014) incubaram células MCF-7 com essas nanopartículas por 15 minutos e em seguida aplicaram TFD sob diferentes fluências de energia diminuindo a viabilidade para 26% e 23% sob $1,38 \text{ J/cm}^2$ e $3,82 \text{ J/cm}^2$, respectivamente na concentração de $2 \text{ }\mu\text{M}$ do FS. Vale lembrar que essa foi uma das concentrações utilizadas no presente estudo. De acordo com Ma (2012), como células humanas de câncer de mama demoram até 25 horas para dividir, a maioria das células vivas após o ensaio de MTT devem ser as mesmas que foram submetidas à TFD após tratamento com os nanossistemas. Recentemente, Camargo (2018) utilizou um mesmo nanossistema com esse polímero, mas com o fármaco doxorrubicina e após 24 horas aplicou a TFD com uma fluência de 185 J/cm^2 verificou que a quantidade de células MCF-7 viáveis chegava a aproximadamente 25% e na concentração de $0,95 \text{ }\mu\text{g/mL}$ foi capaz de eliminar 50% das células vivas. De acordo com o estudo, a combinação do fármaco fotossensibilizante com um fármaco usualmente empregado na prática médica contra células tumorais pode ter influenciado nos efeitos alcançados.

Outros tipos de nanossistemas também já foram explorados em TFD para eliminar células tumorais humanas MCF-7, como o de Rodrigues (2014) que trabalhou com uma nanoemulsão de extrato vegetal contendo AlCIFt e Gianizeli (2015) que desenvolveu nanopartículas magnéticas com o FS adsorvido na sua superfície. Aplicando fluências entre $23\text{-}25 \text{ J/cm}^2$, o que corrobora com a fluência aplicada nas células do presente estudo, os autores verificaram que na concentração de $0,0028 \text{ }\mu\text{M}$ da nanoemulsão houve uma redução de viabilidade para 61% após 15 minutos de incubação das células com os nanossistemas e quando a AlCIFt estava a uma concentração de $0,023438 \text{ }\mu\text{g/mL}$ no nanossistema composto por nanopartículas magnéticas, a porcentagem de viabilidade decaía para 37,2%.

A avaliação do efeito citotóxico nos dois tempos de exposição das células 4T1 aos nanossistemas é apresentada nas Figuras 39A e 39B.

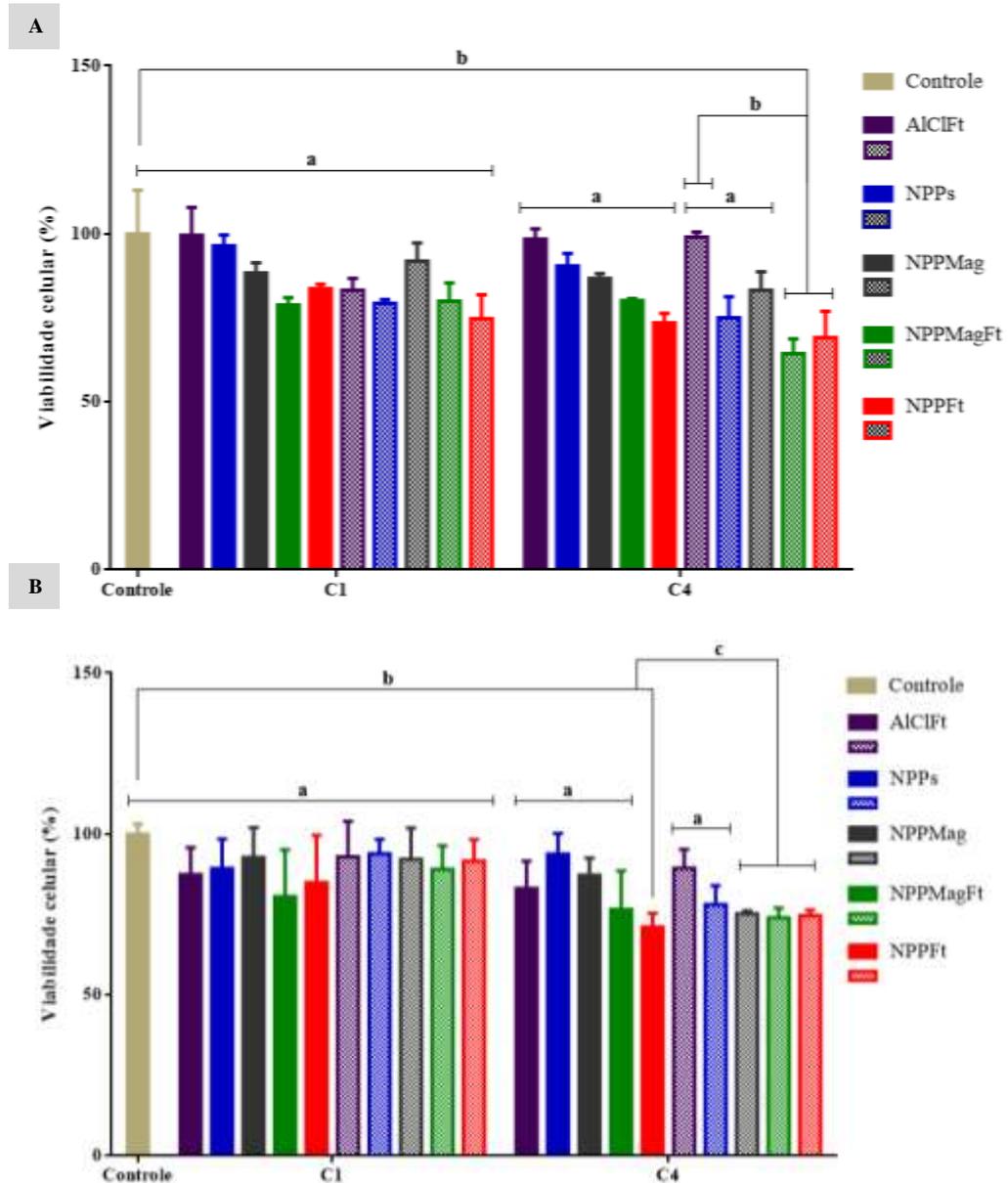


Figura 39. Viabilidade de células 4T1 pelo método de MTT após exposição por 15 minutos ou quatro horas aos nanossistemas e aplicação de TFD (10 minutos; comprimento de onda de 660 nm; 10 cm de distância da fonte luminosa; fluência de 23 J/cm²). Concentrações utilizadas (C1= 2 µM de AlClFt e/ou 0,4 mg de PLGA; C4= 10 µM de AlClFt e/ou 2 mg de PLGA). Barras lisas refletem os grupos em que as células permaneceram protegidas da luz e não receberam TFD. Barras tracejadas indicam grupos em que as células receberam TFD. Letras iguais acima das barras indicam grupos sem diferença estatística em relação ao controle (p<0,05). (Controle: células somente com meio DMEM. AlClFt: alumínio cloro ftalocianina. NPPs: nanopartículas poliméricas. NPPMag: nanopartículas polimérico-magnéticas. NPPMagFt: nanopartículas polimérico-magnéticas contendo alumínio cloro ftalocianina. NPPFt: nanopartículas poliméricas contendo alumínio cloro ftalocianina).

O efeito citotóxico na linhagem murina 4T1 evidencia um comportamento similar, sem diferença estatística (p<0,05) em qualquer uma das duas concentrações, sem irradiação, após 15 minutos de incubação com os grupos experimentais (Figura 39A, barras lisas). Na concentração de 2 µM de AlClFt e/ou 0,4 mg de PLGA (C1), as células que permaneceram protegidas da luz apresentaram viabilidade celular de 99%, 96%, 88%, 78% e 83% quando

tratadas com AICIFt livre, NPPs, NPPMag, NPPMagFt e NPPFt, respectivamente. Esses valores pouco se alteraram nas células submetidas à TFD após 15 minutos expostas aos nanossistemas nessa menor concentração sendo de 83%, 79%, 91%, 79% e 74%, respectivamente para os grupos citados acima (Figura 39A, barras tracejadas). Nas duas condições, o percentual de viabilidade celular não difere estatisticamente em relação ao controle. Como é possível perceber, somente para NPPs e NPPFt os valores tiveram certa diminuição, porém, não refletiram significância. Na maior concentração (10 μ M de AICIFt e/ou 2 mg de PLGA – C4), o efeito sob a viabilidade das células 4T1 mostra pequena diferença, sendo principalmente vista entre os grupos experimentais após aplicação da TFD (Figura 39A, barras tracejadas). Neles, os nanossistemas contendo o FS (NPPMagFt e NPPFt) diferiram significativamente ($p < 0,025$) do grupo contendo a AICIFt livre e do controle. Após 24 horas da TFD, a viabilidade celular foi de 64% e 69% para NPPMagF e NPPFt, respectivamente. Ainda nessa concentração, da mesma forma que os resultados apresentados nos ensaios com a menor concentração e sem TFD, não foram observadas diferenças significantes entre os tratamentos nas células protegidas da luz; neles, a viabilidade observada foi de até 80% para NPPMagFt e 73% para NPPFt (Figura 39A, barras lisas).

Depois de incubadas por quatro horas com todos os nanossistemas na menor concentração, não foram observadas diferenças estatísticas na viabilidade de células 4T1 protegidas ou não da irradiação, quando comparadas entre si e com o controle. (Figura 39B, barras lisas e tracejadas). Ao analisar os resultados dessa linhagem celular tumoral quando incubadas na maior concentração dos constituintes dos nanossistemas e sem sofrer aplicação do LED a 23 J/cm^2 verifica-se que o nanossistema NPPFt diminuiu a viabilidade celular para 71% e diferiu significativamente ($p < 0,01$) do controle, mas não diferiu significativamente dos outros grupos experimentais testados (Figura 39B, barras lisas). Depois da aplicação da TFD, sutis reduções na viabilidade de células 4T1 foram observadas e, quando comparadas ao controle, somente as NPPMag, NPPMagFt e NPPFt foram estatisticamente diferentes ($p < 0,05$) resultando em uma viabilidade após 24 horas da TFD de 75%, 73% e 74% (Figura 39B, barras tracejadas), sem haver diferenças significativas entre eles.

Nanopartículas poliméricas de PVM/MA carregando AICIFt e o fármaco quimioterápico doxorrubicina já foram relatadas como promissoras na redução de viabilidade de células 4T1. Camargo (2018) demonstrou valores chegando a 10% de viabilidade após incubar esse nanossistema com as células por um período de 24 horas. O estudo de Muehlmann et al. (2014) mostra que em concentrações de 2 μ M do FS e após 15 minutos de incubação dos nanossistemas com as células, condições similares ao presente estudo, os

valores de viabilidade estiveram abaixo de 20% quando aplicadas fluências de $1,38 \text{ J/cm}^2$ e $3,82 \text{ J/cm}^2$. Observa-se que, mesmo aplicando doses de energia menores que a dose do presente estudo, nanossistemas poliméricos desenvolvidos por outros autores foram mais eficientes e mostraram elevadas reduções na viabilidade de células 4T1.

Da mesma forma, nanoemulsões mostraram eficiência na diminuição da viabilidade de células 4T1 com valores de viabilidade celular sendo menores à medida que a dose de energia aplicada no sistema aumenta. Silva (2013) trabalhando com uma nanoemulsão de extrato vegetal contendo a AICIFt relata que em uma fluência de 25 J/cm^2 (próxima a do presente estudo), a taxa de viabilidade era aproximadamente de 10%, no entanto, quando essa fluência chegava a 85 J/cm^2 , a viabilidade era em torno de apenas 3% a partir de 15 minutos de incubação das células com a nanoemulsão. No trabalho de Moura (2017), nanoemulsões com e sem a presença de ácido fólico também geravam reduções dependente da potência luminosa aplicada após 15 minutos em contato com as células, sendo que em 10 mW/cm^2 , 50 mW/cm^2 e 100 mW/cm^2 , a viabilidade era de 20%, 5% e 18%, respectivamente, demonstrando que as condições do aparelho de TFD devem ser levadas em consideração para o sucesso da terapia nas diferentes linhagens celulares. Nestes outros trabalhos, onde a dose de energia era maior e/ou próxima a empregada nesse estudo, os nanossistemas à base de emulsões tiveram maior sucesso na redução da viabilidade de células tumorais murinas de mama.

Os resultados da viabilidade de células NIH-3T3 após incubação por 15 minutos e quatro horas com os nanossistemas são mostrados abaixo (FIGURAS 40A e 40B).

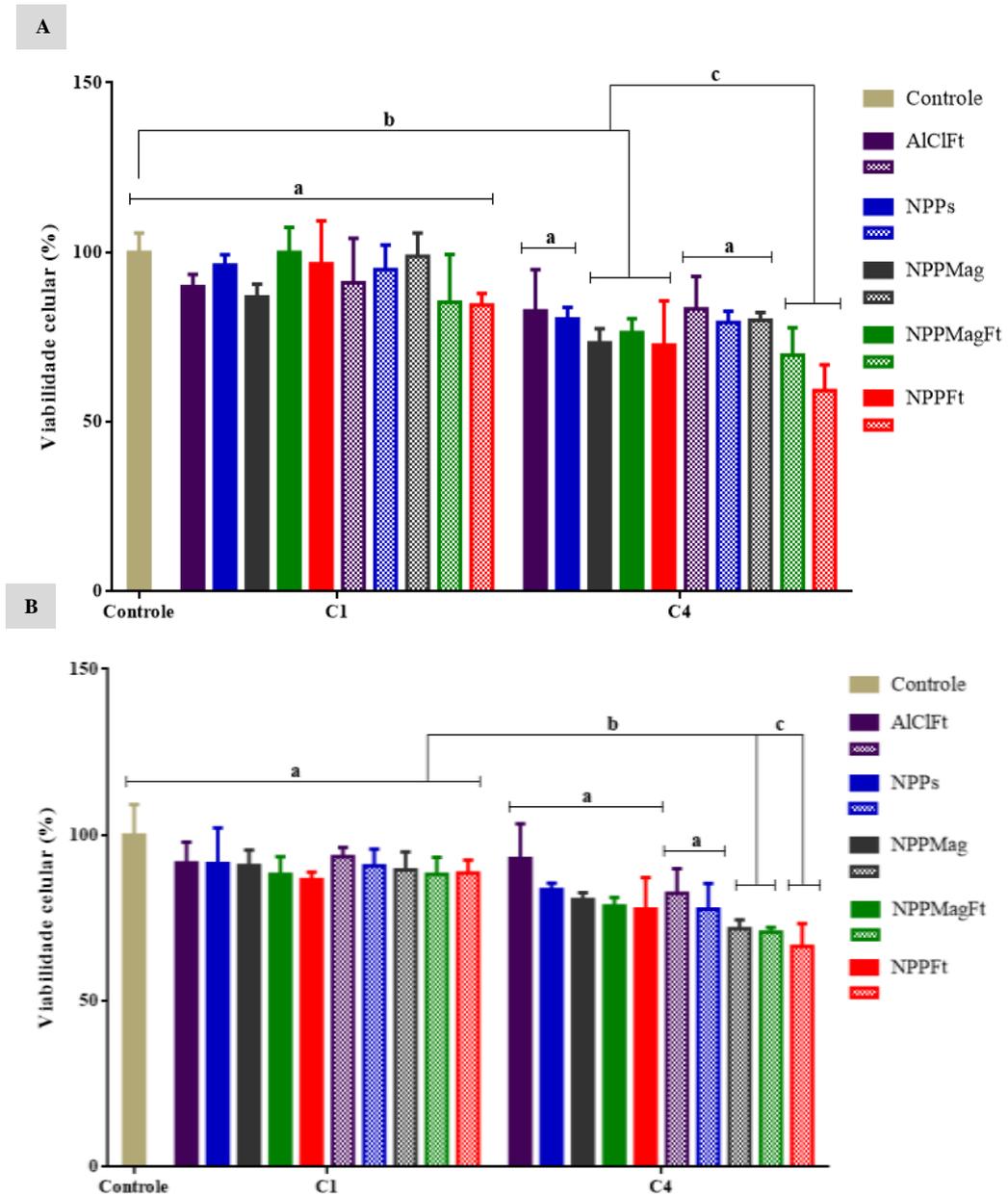


Figura 40. Viabilidade de células NIH-3T3 pelo método de MTT após exposição por 15 minutos ou quatro horas aos nanossistemas e aplicação de TFD (10 minutos; comprimento de onda de 660 nm; 10 cm de distância da fonte luminosa; fluência de 23 J/cm²). Concentrações utilizadas (C1= 2 µM de AICIFt e/ou 0,4 mg de PLGA; C4= 10 µM de AICIFt e/ou 2 mg de PLGA). Barras lisas refletem os grupos em que as células permaneceram protegidas da luz e não receberam TFD. Barras tracejadas indicam grupos em que as células receberam TFD. Letras iguais acima das barras indicam grupos sem diferença estatística em relação ao controle ($p < 0,05$). (Controle: células somente com meio DMEM. AICIFt: alumínio cloro ftalocianina. NPPs: nanopartículas poliméricas. NPPMag: nanopartículas polimérico-magnéticas. NPPMagFt: nanopartículas polimérico-magnéticas contendo alumínio cloro ftalocianina. NPPFt: nanopartículas poliméricas contendo alumínio cloro ftalocianina).

Nas células de fibroblastos, a avaliação da citotoxicidade mostrou que na menor concentração-teste, as células após 15 minutos de incubação com os nanossistemas e que permaneceram no escuro (Figura 40A, barras lisas) não apresentaram redução significativa ($p < 0,05$) em nenhum dos grupos experimentais quando comparada ao controle e entre si. Os

resultados de viabilidade celular mostraram valor de 89%, 96%, 86%, 99% e 96% de células viáveis para AICIFt livre, NPPs, NPPMag, NPPMagFt e NPPFt, respectivamente. As células que foram submetidas à TFD nessa mesma concentração e mesmo tempo de exposição aos nanossistemas (Figura 40A, barras tracejadas) também não reduziram significativamente ($p < 0,05$) o número de células viáveis, porém, os grupos contendo o FS demonstram uma relativa queda na viabilidade quando comparados aos mesmos resultados das células protegidas da luz, para NPPMagFt esse valor caiu para 85%, enquanto para NPPFt ele diminuiu para 84%. Na Figura 40A (barras lisas), os resultados de viabilidade de células NIH-3T3 quando tratadas na maior concentração dos nanossistemas e sem aplicação da TFD demonstram que apenas para os grupos NPPMag, NPPMagFt e NPPFt tiveram uma redução estatisticamente significativa ($p < 0,0128$) em relação ao grupo controle, onde, para esses três grupos, a porcentagem de viabilidade chegou a 73%, 76% e 72%, respectivamente. No entanto, ao verificar essas porcentagens para as células que foram submetidas à TFD é possível notar que novamente os grupos contendo AICIFt na sua composição apresentaram diminuição considerável da viabilidade (Figura 40A, barras tracejadas). As NPPMagFt tiveram uma viabilidade de 69% ($p < 0,01$) e as NPPFt 59% ($p < 0,0001$) em relação ao controle. É interessante observar que para o tratamento por 15 minutos com os nanossistemas, não há diferença estatística entre os grupos experimentais quando se analisa separadamente ou apenas qualquer das concentrações testadas, ou ainda com a aplicação ou não da TFD.

Após incubação por quatro horas com a AICIFt livre e os nanossistemas, os resultados de viabilidade alcançados para a menor concentração-teste foram similares àqueles apresentados após 15 minutos de exposição. De forma geral, nem mesmo às células submetidas à TFD mostraram qualquer redução na viabilidade celular e para essa concentração utilizada, não houve diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os grupos e com o controle. O nanossistema com contribuição magnética – NPPMag – apresentou viabilidade de 90% e 89% sem e com a TFD, respectivamente. Já o nanossistema com o FS e contribuição magnética – NPPMagFt – mostrou a mesma porcentagem de viabilidade (88%) tanto quando protegidos da luz como quando aplicada a TFD e o nanossistema polimérico com o FS – NPPFt – teve 86% de viabilidade com as células protegidas da luz e 88% de células viáveis após aplicação da TFD (Figura 40B, barras lisas e tracejadas). Quando utilizada uma maior concentração dos constituintes dos nanossistemas, esse cenário muda pouco em relação às células que não passaram pela irradiação e, apesar de não apresentarem diferença significativa entre os grupos experimentais nessa condição e nem com o controle, os valores de viabilidade celular caem para 83%, 80%, 78% e 77% para as NPPs, NPPMag, NPPMagFt e NPPFt,

respectivamente (Figura 40B, barras lisas). Logo após a irradiação e mais 24 horas na incubadora, essas células tiveram redução significativa da viabilidade ($p < 0,0001$) quando tratadas com os nanossistemas NPPMag NPPMagFt e NPPFt chegando a valores de 71%, 70% e 66% em relação ao controle, respectivamente. Nessas condições, as células NIH-3T3 também apresentaram queda da viabilidade chegando a 82% e 77% quando expostas à AICIFt livre e às NPPs (Figura 40B, barras tracejadas), respectivamente.

Ao irradiarem células NIH-3T3 após contato por 15 minutos com nanopartículas poliméricas de PVM/MA juntamente com AICIFt na concentração de 2 μM com diferentes densidades de energia, Muehlmann et al. (2014) observaram uma frequência de células viáveis de 25,8% (0,48 J/cm^2) e 29,6% (1,38 J/cm^2 e 3,82 J/cm^2). Mais recentemente, Camargo (2018) desenvolveu o mesmo nanossistema polimérico com base em PVM/MA e observou que as NPs exerciam baixa citotoxicidade após 24 horas de contato com as células NIH-3T3 com uma fluência até oito vezes superior à utilizada no presente estudo. Paula et al. (2013) prepararam nanossistemas poliméricos de PLA, PLGA e PLA-PEG carreando AICIFt em uma concentração de 10 μM , ou seja, a mesma utilizada no presente estudo e testaram a eficácia da TFD sobre fibroblastos murinos NIH-3T3 após quatro horas de incubação das células com os nanossistemas. Os autores verificaram que a citotoxicidade é diferente conforme a dose de luz aplicada ao sistema sendo que a dose de 140 J/cm^2 reduziu a viabilidade celular para 51,3%, 57,5%, 46,4% em PLA, PLGA e PLA-PEG, respectivamente. Enquanto que, na menor dose de energia aplicada às células, a porcentagem de viabilidade reduzia significativamente para 12,9%, 13,7% e 11,3% após tratamento com nanopartículas de PLA, PLGA e PLA-PEG. Ressalta-se que, novamente em pequenas fluências de energia, a viabilidade dessas células quando incubadas com nanossistemas poliméricos foi inferior a 20%; esses resultados diferem dos apresentados no presente estudo uma vez que, para fibroblastos, a viabilidade foi superior a 50% nos dois tempos testados quando a concentração dos constituintes era de 2 mg de PLGA e/ou 10 μM de AICIFt.

Moura (2017) verificou a fototoxicidade de nanoemulsões com AICIFt contendo ou não o ácido fólico e observou que depois de 15 minutos expostas aos nanossistemas, as células não tumorais NIH-3T3 apresentavam perda de viabilidade decorrente do aumento das potências de energia aplicadas na irradiação e que esse efeito também ocorria de maneira dependente da concentração do nanossistema. Na menor e maior potência (10 mW/cm^2 e 100 mW/cm^2) e na maior concentração-teste (0,312 μM), a viabilidade era inferior a 20%, no entanto, na potência intermediária de 50 mW/cm^2 e na mesma concentração acima, essa viabilidade aumentava para 42%, sendo essa a condição que menos matou as células não

tumorais. Monge-Fuentes (2014) desenvolveu uma nanoemulsão com base em óleo de açaí e após 15 minutos de contato com células NIH-3T3 aplicou a TFD com uma fluência de energia de 25 J/cm^2 , próxima à aplicada no presente estudo e obteve uma viabilidade de 70%. Nanopartículas magnéticas contendo AICIFt quando expostas à células NIH-3T3 por 15 minutos e após estas sofrerem irradiação com fluências entre $23\text{-}25 \text{ J/cm}^2$ diminuem a viabilidade celular de acordo com a concentração do FS disperso no nanossistemas (GIANIZELI, 2015). Nesse estudo, nas concentrações a partir de $0,09375 \text{ } \mu\text{g/mL}$ observou-se redução significativa da viabilidade, chegando em torno de 18% e com uma CC_{50} de $0,0108 \text{ } \mu\text{g/mL}$.

A partir dos resultados acima, para células murinas tumorais 4T1 e não tumorais NIH-3T3, observam-se que os nanossistemas preparados por outros pesquisadores foram eficazes na redução da viabilidade de células cancerosas, o que é visto com menor intensidade nos resultados desse estudo. No entanto, ao verificar os valores de citotoxicidade para as células não cancerosas, todos os nanossistemas do presente trabalho não se mostraram altamente danosos nas condições aqui testadas, o que, por sua vez, não se vê ao comparar com os resultados de outros autores. Talvez, em concentrações maiores do FS ou maiores doses de energia, os nanossistemas possam ser tóxicos para as células tumorais murina e com isso, também poderia apresentar perda da viabilidade significativa para células não tumorais.

A partir dos dados de viabilidade celular apresentados para todas as linhagens celulares após os diferentes tempos de exposição aos nanossistemas, bem como nas duas diferentes concentrações dos constituintes deles, observa-se que o perfil de células viáveis foi menor quando a concentração dos nanossistemas era maior e também após a aplicação da TFD. Além disso, as NPPMagFt e NPPFt foram, nessas condições anteriormente citadas, as que mais causaram diminuição na viabilidade celular, principalmente em células MCF-7. As NPPMag também apresentaram efeito na redução de viabilidade em alguns casos na maior concentração dos constituintes. O percentual de células vivas 4T1 e NIH-3T3 demonstra que essas linhagens mostraram-se mais resistentes aos ensaios *in vitro* nas condições aqui propostas, no entanto, os nanossistemas contendo o FS ainda causaram maior perda da viabilidade celular. Quando as células eram tratadas somente com a AICFt livre, pouco tinham sua viabilidade reduzida independente do tempo de exposição ao FS ou concentração dele, isso pode ser devido à hidrofobicidade e agregação das moléculas de AICIFt que, com dificuldade de dispersão em meios aquosos, tendem a perder suas características e, portanto, sua eficácia em induzir diminuição do número de células vivas (LONGO et al., 2009; WANG & THANOU, 2010; RODRIGUES et al., 2015).

A escolha das concentrações utilizadas nesses ensaios *in vitro* de TFD partiram do pressuposto de que sistemas contendo FS em contato com células devem ser inócuos na ausência de luz, porém apresentar citotoxicidade quando irradiados (LONGO et al., 2009; MUEHLMANN et al., 2015; WEIJER et al., 2015). O grau de fototoxicidade observado em estudos aplicando a TFD é coerente e deve estar relacionado a fatores como a estabilidade dos nanossistemas, à dose de energia da irradiação luminosa, ao comprimento de onda do feixe de luz proposto, às linhagens celulares estudadas e a localização intracelular dos nanossistemas (KOLAROVA et al., 2007; FROST et al., 2011; KASTLE et al., 2011).

Segundo Marshall et al. (2007), quando as NPs apresentam boa estabilidade coloidal tendem a preservar as propriedades dos FS carreados uma vez que conferem maior eficiência ao nanossistema por um maior período de tempo. De acordo com os dados de estabilidade após 105 dias dos nanossistemas aqui desenvolvidos, quando acondicionados em geladeira eles apresentaram maior capacidade de manter suas propriedades de DH, PdI e PtZ. As NPPMagFt destacam-se nesse ponto uma vez que, mesmo contendo parte magnética e um FS em sua composição, pouco alteraram seu tamanho após os testes de estabilidade, mostrando uma redução de $228 \pm 1,9$ nm logo após seu preparo para $220 \pm 2,2$ nm ao final dos 105 dias. A população dessas NPs mostrou distribuição homogênea após o período de análise de estabilidade, com valores de PdI em torno de 0,1 e a carga de superfície delas permaneceu negativa durante os mais de 100 dias, sendo ao final de $-32,3 \pm 0,2$. Esse mesmo nanossistema, ao ser acondicionado à temperatura ambiente mostrou estabilidade por mais de dois meses e quando sob uma temperatura de 37 °C manteve-se estável após 45 dias.

Estudos demonstram que quanto maior a dose de energia dissipada, maior o efeito citotóxico (NDHUNDHUMA et al., 2011; WEIJER et al., 2015), no entanto, nesse estudo, não pôde ser realizado uma comparação dessa variável já que apenas uma dose de energia foi aplicada às células. Além disso, no presente estudo, o comprimento de onda utilizado foi de 660 nm e está dentro da faixa espectral que corresponde a comprimentos de onda de baixa excitação e pertence ainda à faixa ótima de absorção de cromóforos tissulares por tecidos biológicos, portanto, esse fator mostrou-se adequado para o emprego da TFD nas linhagens celulares estudadas (MA, 2012).

A localização intracelular dos FS utilizados em TFD está relacionada com a eficiência dessa terapia já que, de acordo com Agostinis et al. (2011), a vida útil do oxigênio singlete é curta e sua difusão celular é no máximo entre 10-55 nm afetando somente as organelas onde o FS estivesse localizado ou poderia depender ainda da quantidade dele incorporado pelas células. Rugolo & Lenaz (1987) e Muehlmann et al. (2015) relatam que no

citoplasma, os FS são capazes de comprometer várias estruturas celulares e no caso da AICIFt, por ser hidrofóbica, pode acumular-se principalmente nas mitocôndrias (KESSEL & LUO 1998). Esses danos, uma vez causados, podem levar a diferentes tipos de morte celular, podendo ser por apoptose, necrose e até mesmo autofagia (GALIMBERTI, 2018). No estudo Muehlmann et al. (2014), células MCF-7 e 4T1 submetidas à TFD induzida por AICIFt apresentaram morte celular por apoptose ou necrose; Ndhundhuma et al. (2011) demonstraram que a AICIFt incorporada nas mitocôndrias de diferentes linhagens celulares levou a uma morte por apoptose, no entanto, quando acumulada nos lisossomos, essa morte ocorreu por necrose e apoptose. Neste presente estudo não foram avaliadas a localização intracelular dos nanossistemas, assim como quais as vias de morte celular envolvidas na queda da viabilidade das células utilizadas, porém, esses ensaios deverão ser realizados para melhor elucidar os mecanismos que estão envolvidos na eficácia da AICIFt quando associada às nanopartículas polimérico-magnéticas desenvolvidas e testadas em TFD.

Esses diferentes perfis de morte celular induzidos depois da utilização da TFD demonstram que as células tumorais e não tumorais têm retenção do FS de maneira inespecífica. De acordo Nichols & Bae (2012), isso é devido à entrega de fármacos aos tumores por meio de nanossistemas ser dependente de alterações fisiológicas nos tecidos cancerosos. Esses tecidos possuem vasos sanguíneos anormais e mais permeáveis em comparação aos tecidos não danificados e a partir do efeito EPR (do inglês *enhanced permeability and retention*) explica-se o aumento da entrega de fármacos a eles (YOKOYAMA, 2005; MAEDA, et al., 2010). Ressalta que, mesmo em estudos *in vitro*, os resultados apresentados nas Figuras 38, 39 e 40 mostram maior sensibilidade das células tumorais ao tratamento com os nanossistemas em comparação aos fibroblastos, mesmo que sem diferença estatística significativa e corroboram com Mroz et al. (2011) ao demonstrarem que distintas linhagens celulares quando são incubadas com o mesmo fármaco e sob mesmas condições de irradiação podem apresentar diferentes respostas à TFD. De acordo com Paula et al. (2013), os fibroblastos são um bom modelo biológico para fornecer indícios de avaliação da biocompatibilidade de novos biomateriais e formulações farmacêuticas.

A avaliação da citotoxicidade após 24 horas da TFD pode ter influenciado na porcentagem de células viáveis após a aplicação da TFD. De acordo com Ma (2012) e Gianizeli (2015), dentre as células vivas detectadas depois da irradiação e do teste colorimétrico de MTT, podem existir uma quantidade de células que é resultante de divisões mitóticas de células que sobreviveram ao tratamento empregado com os nanossistemas, uma vez que células MCF-7 apresentaram divisões a cada 25 horas e as células murinas 4T1 e

NIH-3T3 se dividem em até 12 horas. Com isso, é possível acreditar que o número de células mortas inicialmente pela TFD poderia ser maior do que o detectado ao final do experimento e assim seria interessante avaliar a viabilidade celular em tempos menores que o de 24 horas depois das irradiações aplicadas.

De qualquer forma, os resultados obtidos com esses ensaios de TFD para células tumorais de mama humana são bastante promissores já que a exposição das células MCF-7 por 15 minutos a nanossistemas com 10 μM de AICIFt em uma dose de energia de 23 J/cm^2 promoveu a queda da viabilidade para valores entre 44-53%, estando o FS associado com nanopartículas poliméricas contendo núcleo magnético (NPPMagFt) ou associado somente à nanopartículas poliméricas (NPPFt), respectivamente sem diferença significativa no efeito citotóxico ao compará-los entre si (FIGURA 38A, barras tracejadas); quando o tempo de incubação aumentava para quatro horas, nas mesmas condições de concentração e dose de energia citadas anteriormente, os valores de viabilidade diminuía para 41% para NPPMagFt e NPPFt (FIGURA 38B, barras tracejadas) e mesmo na menor concentração a viabilidade era menor que 45% para esses dois nanossistemas, não diferindo significativamente entre si. Dessa forma, pode-se especular que as nanopartículas magnéticas presentes nas NPPMagFt não alteram a atividade citotóxica do FS e até permite um questionamento: ao ser aplicado, após a TFD, um campo magnético alternado (CMA) e este promovendo calor a partir do movimento das partículas (magnetohipertermia), aumentaria a eficiência da morte de células tumorais? Essas mesmas observações podem ser feitas para as células murinas tumorais ou não – 4T1 e NIH-3T3 – utilizadas no presente estudo mesmo que a perda da viabilidade promovida pelos nanossistemas para essas linhagens, que foi discutida acima, não tenha sido reduzida significativamente entre elas. Portanto, a contribuição magnética utilizada nos nanossistemas do presente estudo mostrou-se inerte nos resultados de citotoxicidade das células e na ativação da AICIFt. Assim, estudar o efeito da viabilidade celular após TFD aplicando um CMA pode aumentar a eficácia de nanossistemas do tipo NPPMagFt no tratamento contra células tumorais a partir da combinação de um FS e de nanopartículas magnéticas que ao gerar calor (magnetohipertermia) podem eliminar um número maior de células.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Foi possível sintetizar um nanossistema polimérico-magnético carregando o fotossensibilizante AICIFt e verificar melhor estabilidade quando acondicionado por 105 dias sob temperatura de 4-8 °C. A carga de superfície para este nanossistema foi negativa.
- Verificou-se que as NPPMagFt exibiram pico de emissão de fluorescência em torno de 680-680 nm, ou seja, dentro da faixa terapêutica de utilização em TFD e que a houve o acoplamento das NPF_{FeO} e do FS às nanopartículas de PLGA por meio de bandas características desses componentes nos espectros de FTIR.
- As NPPMagFt foram eficientes na produção de ERO em proporções similares às aquelas causadas pela AICIFt dispersa em EtOH. Além disso, este nanossistema foi capaz de responder a um campo magnético externo à temperatura de 300 K, tornando-o promissor para utilização em magnetohipertermia.
- Por meio de MET, foi possível observar o recobrimento da superfície das nanopartículas pelo PLGA e também com o contraste do BSA. Quando na presença do elemento magnético, as imagens demonstram sua presença dentro das nanopartículas de PLGA ou próximo às bordas poliméricas com formato esférico.
- Nos ensaios *in vitro* de internalização do nanossistema NPPMagFt, as células tumorais 4T1 capturam o FS em menor tempo (6 horas) quando comparadas às células não tumorais NIH-3T3 (24 horas) na concentração de 10 µM de FS evidenciando uma maior capacidade de células cancerosas em acumular moléculas de AICIFt.
- Nos ensaios de citotoxicidade na ausência de irradiação, não foi observada redução significativa da viabilidade celular de células de câncer de mama humano, MCF-7, em nenhuma concentração-teste em relação ao controle após 24 horas de incubação.
- Nas células murinas, os ensaios de MTT sem aplicação de TFD para células 4T1 tratadas com NPPMag, NPPMagFt e NPPFt, demonstram redução significativa da viabilidade celular em todas as concentrações testadas. Os resultados para a linhagem murina não tumoral NIH-3T3 evidenciam que apenas nas duas menores concentrações-teste, NPPMagFt e NPPFt exerceram diminuições significativas no número de células viáveis.
- A TFD aplicada às células MCF-7 após incubação por 15 minutos e quatro horas com os nanossistemas e com à AICIFt dispersa em meio aquoso demonstra um susceptibilidade significativamente maior das células às NPPMagFt e NPPFt quando comparadas ao controle em ambos os tempos.
- Na linhagem tumoral murina 4T1, esses efeitos na perda da viabilidade pós TFD é menor, porém, depois de incubação por quatro horas com às NPPMagFt e NPPFt, a redução cai significativamente em relação ao controle.

- A citotoxicidade para a linhagem não tumoral NIH-3T3 mostra-se maior quando essas células são expostas nos dois tempos de incubação aos nanossistemas NPPMag, NPPMagFt e NPPFt.
- Vale ressaltar que a AICIFt quando aplicada em sua forma livre não apresentou redução da viabilidade para nenhuma das linhagens celulares, em qualquer que fosse a concentração ou tempo de exposição. Esse resultado justifica a utilização desse FS em sistemas nanoestruturados, com um aumento da sua eficácia citotóxica.
- Após os resultados de citotoxicidade com aplicação de TFD observou-se que o tempo de incubação das células com os nanossistemas, bem como a concentração destes, são fatores importantes na redução ou não da viabilidade. Apenas para as células MCF-7 depois de submetidas à TFD, os nanossistemas na menor concentração causaram redução significativa da viabilidade na menor concentração e nos dois tempos. Esses dados podem indicar menor resistência dessa linhagem tumoral à TFD mediada por nanossistemas polimérico-magnéticos contendo AICIFt
- Visando a utilização futura das NPPMagFt em magnetohipertemia é possível analisar que, em relação às NPPFt, não houveram diferenças significativas em qualquer linhagem celular ou outra condição testada. Dessa maneira, é possível inferir que o elemento magnético presente no nanossistema não interfere nos resultados de citotoxicidade observados e, a indução de um campo magnético alternado nessas células após a TFD pode aumentar a capacidade das NPPMagFt induzir citotoxicidade.
- Esse estudo também trás como perspectivas a determinação da concentração da AICIFt e das NPFeO; a determinação de doses letais capazes de eliminar 50% das células viáveis (CC_{50}) nos ensaios *in vitro*; a aplicação de TFD utilizando diferentes doses de energia a fim de comparar o comportamento e viabilidade celular; a exposição dos nanossistemas a um campo magnético alternado e posterior geração de calor (magnetohipertermia) combinando os efeitos terapêutico da irradiação com as características magnéticas dos constituintes dos nanossistemas; a localização intracelular das nanopartículas e a determinação das vias de morte celular.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDELWAHED, Wassim et al. Freeze-drying of nanoparticles: formulation, process and storage considerations. **Advanced drug delivery reviews**, v. 58, n. 15, p. 1688-1713, 2006.
- ACHARYA, Sarbari; SAHOO, Sanjeeb K. PLGA nanoparticles containing various anticancer agents and tumour delivery by EPR effect. **Advanced drug delivery reviews**, v. 63, n. 3, p. 170-183, 2011.
- ACKROYD, Roger et al. The history of photodetection and photodynamic therapy. **Photochemistry and photobiology**, v. 74, n. 5, p. 656-669, 2001.
- ACS - AMERICAN CANCER SOCIETY. Cancer facts & figures 2013. **Atlanta: american cancer society**; 2013.
- AGGARWAL, Parag et al. Nanoparticle interaction with plasma proteins as it relates to particle biodistribution, biocompatibility and therapeutic efficacy. **Advanced drug delivery reviews**, v. 61, n. 6, p. 428-437, 2009.
- AGOSTINIS, Patrizia et al. Photodynamic therapy of cancer: an update. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 61, n. 4, p. 250-281, 2011.
- AKBARZADEH, Abolfazl et al. Magnetic nanoparticles: preparation, physical properties, and applications in biomedicine. **Nanoscale research letters**, v. 7, n. 1, p. 144, 2012.
- AKTAS, Mustafa et al. Concomitant radiotherapy and hyperthermia for primary carcinoma of the vagina: a cohort study. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 133, n. 1, p. 100-104, 2007.
- ALEX, Rainer; BODMEIER, Roland. Encapsulation of water-soluble drugs by a modified solvent evaporation method. I. Effect of process and formulation variables on drug entrapment. **Journal of Microencapsulation**, v. 7, n. 3, p. 347-355, 1990.
- ALEXIS, Frank et al. Factors affecting the clearance and biodistribution of polymeric nanoparticles. **Molecular Pharmaceutics**, v. 5, n. 4, p. 505-515, 2008.
- ALI, Rajjab et al. Impacts of Ni–Co substitution on the structural, magnetic and dielectric properties of magnesium nano-ferrites fabricated by micro-emulsion method. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 584, p. 363-368, 2014.
- ALIMOHAMMADI, Younes Hanifehpour; JOO, Sang Woo. PLGA-based nanoparticles as cancer drug delivery systems. **Asian Pac J Cancer Prev**, v. 15, p. 517-535, 2014.
- ALLISON, Ron. et al. Photosensitizers in clinical PDT. **Photodiagnosis and photodynamic therapy**, v. 1, n. 1, p. 27-42, 2004.
- ARAÚJO, Henrique Loback Lopes de. **Efeitos de combinações entre o ácido anacárdico derivado da casca da castanha do caju (*Anacardium occidentale*) e o óleo de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.), livres ou nanoestruturados, no tratamento de células de câncer de pele não melanoma, in vitro**. 2017. 107f. Dissertação de Mestrado – Universidade de Brasília, Brasília, 2017.
- ARAÚJO, Robson Teixeira. **Produção de poli (pivalato de vinila) magnético visando aplicações biomédicas**. 2017. 113f. Dissertação de Mestrado – Universidade de Brasília, Brasília, 2017.
- ARAVIND, Athulya et al. Aptamer conjugated paclitaxel and magnetic fluid loaded fluorescently tagged PLGA nanoparticles for targeted cancer therapy. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 344, p. 116-123, 2013.

- ARUMAINAYAGAM, Nimalan et al. Photodynamic therapy for focal ablation of the prostate. **World journal of urology**, v. 28, n. 5, p. 571-576, 2010.
- ASEM, Heba et al. Development and biodistribution of a theranostic aluminum phthalocyanine nanophotosensitizer. **Photodiagnosis and photodynamic therapy**, v. 13, p. 48-57, 2016.
- ASHJARI, Mohsen et al. Controlling the morphology and surface property of magnetic/cisplatin-loaded nanocapsules via W/O/W double emulsion method. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 408, p. 87-96, 2012.
- BAEK, SongYi; NA, Kun. A nano complex of hydrophilic phthalocyanine and polyethylenimine for improved cellular internalization efficiency and phototoxicity. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 101, p. 493-500, 2013.
- BAI, Ling-Yu et al. Multifunctional magnetic-hollow gold nanospheres for bimodal cancer cell imaging and photothermal therapy. **Nanotechnology**, v. 26, n. 31, p. 315701, 2015.
- BANERJEE, Priya et al. Leaf extract mediated green synthesis of silver nanoparticles from widely available Indian plants: synthesis, characterization, antimicrobial property and toxicity analysis. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 1, n. 1, p. 3, 2014.
- BAÑOBRE-LÓPEZ, Manuel et al. Magnetic nanoparticle-based hyperthermia for cancer treatment. **Reports of Practical Oncology & Radiotherapy**, v. 18, n. 6, p. 397-400, 2013.
- BARNES, Laura D. et al. The effect of photodynamic therapy on squamous cell carcinoma in a murine model: evaluation of time between intralesional injection to laser irradiation. **The Veterinary Journal**, v. 180, n. 1, p. 60-65, 2009.
- BECHET, Denise et al. Nanoparticles as vehicles for delivery of photodynamic therapy agents. **Trends in biotechnology**, v. 26, n. 11, p. 612-621, 2008.
- BEDÊ, Pedro Marins. **Produção e caracterização de nanopartículas polimérico-magnéticas para utilização biomédica**. 2010. 73f. Dissertação de Mestrado – Instituto Militar de Engenharia, Rio de Janeiro, 2010.
- BILATI, Ugo et al. Sonication parameters for the preparation of biodegradable nanocapsules of controlled size by the double emulsion method. **Pharmaceutical development and technology**, v. 8, n. 1, p. 1-9, 2003.
- BONNETT, Raymond; MARTINEZ, Gabriel. Photobleaching of sensitizers used in photodynamic therapy. **Tetrahedron**, v. 57, n. 47, p. 9513-9547, 2001.
- BOOTDEE, Kittima et al. Synthesis and encapsulation of magnetite nanoparticles in PLGA: effect of amount of PLGA on characteristics of encapsulated nanoparticles. **Polymer bulletin**, v. 69, n. 7, p. 795-806, 2012.
- BUDHIAN, Avinash et al. Haloperidol-loaded PLGA nanoparticles: systematic study of particle size and drug content. **International journal of pharmaceutics**, v. 336, n. 2, p. 367-375, 2007.
- BYLER, Michael; SUSI, Heino. Examination of the secondary structure of proteins by deconvolved FTIR spectra. **Biopolymers: Original Research on Biomolecules**, v. 25, n. 3, p. 469-487, 1986.
- CAMARGO, Níchollas Serafim. **Desenvolvimento de nanopartículas de polímero sensíveis à oxidação para uso em terapia fotodinâmica combinada a quimioterapia local**. 2018. 74 f. Dissertação de Mestrado – Universidade de Brasília, Brasília, 2018.

- CAMERIN, Monica et al. Delivery of a hydrophobic phthalocyanine photosensitizer using PEGylated gold nanoparticle conjugates for the in vivo photodynamic therapy of amelanotic melanoma. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 15, n. 5, p. 618-625, 2016.
- CARRARO, Talita Cristina Moreira Moraes. **Desenvolvimento, caracterização físico-química e biológica de nanopartículas poliméricas contendo anfotericina B**. 2013. 116f. Dissertação de Mestrado – Universidade Estadual do Centro-Oeste, Guarapuava, Paraná, 2013.
- CASTANO, Ana P. et al. Mechanisms in photodynamic therapy: part one—photosensitizers, photochemistry and cellular localization. **Photodiagnosis and photodynamic therapy**, v. 1, n. 4, p. 279-293, 2004.
- CHAMMAS, Roger et al. Biologia do Câncer: uma breve introdução. In: **Tratado de oncologia**. Atheneu, 2013. p. 3-8.
- CHATTERJEE, Dev Kumar et al. Nanoparticles in photodynamic therapy: an emerging paradigm. **Advanced drug delivery reviews**, v. 60, n. 15, p. 1627-1637, 2008.
- CHAUDHARY, Zanib et al. Lipid polymer hybrid carrier systems for cancer targeting: a review. **International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials**, v. 67, n. 2, p. 86-100, 2018.
- CHOI, Jin-Seok et al. Recent advances in PLGA particulate systems for drug delivery. **Journal of Pharmaceutical Investigation**, v. 42, n. 3, p. 155-163, 2012.
- CIANI, Laura et al. Effect of the preparation procedure on the structural properties of oligonucleotide/cationic liposome complexes (lipoplexes) studied by electron spin resonance and Zeta potential. **Biophysical chemistry**, v. 131, n. 1-3, p. 80-87, 2007.
- CORNELL, Rochelle M.; SCHWERTMANN, Udo. **The iron oxides: structure, properties, reactions, occurrences and uses**. John Wiley & Sons, 2003.
- CORTAZAR, Patricia et al. Pathological complete response and long-term clinical benefit in breast cancer: the CTNeoBC pooled analysis. **The Lancet**, v. 384, n. 9938, p. 164-172, 2014.
- COTRUVUO, Joseph A.; STUBBE, JoAnne. Class I ribonucleotide reductases: metallocofactor assembly and repair in vitro and in vivo. **Annual review of biochemistry**, v. 80, p. 733-767, 2011.
- CRICH, Simonetta Geninatti et al. Magnetic resonance visualization of tumor angiogenesis by targeting neural cell adhesion molecules with the highly sensitive gadolinium-loaded apoferritin probe. **Cancer research**, v. 66, n. 18, p. 9196-9201, 2006.
- CRUCHO, Carina IC; BARROS, Maria Teresa. Polymeric nanoparticles: A study on the preparation variables and characterization methods. **Materials Science and Engineering: C**, v. 80, p. 771-784, 2017.
- CUI, Yanna et al. Transferrin-conjugated magnetic silica PLGA nanoparticles loaded with doxorubicin and paclitaxel for brain glioma treatment. **Biomaterials**, v. 34, n. 33, p. 8511-8520, 2013.
- DA SILVA, Mariana Pereira. **Estudo da síntese e avaliação das propriedades magnetotérmicas de nanopartículas não esféricas de magnetita**. 2015. 91f. Dissertação de Mestrado – Universidade de Brasília, Brasília, 2015.
- DAHMAN, Yaser. **Nanotechnology and Functional Materials for Engineers**. Elsevier, 2017.

- DANHIER, Fabienne et al. PLGA-based nanoparticles: an overview of biomedical applications. **Journal of controlled release**, v. 161, n. 2, p. 505-522, 2012.
- DAVDA, Jasmine; LABHASETWAR, Vinod. Characterization of nanoparticle uptake by endothelial cells. **International journal of pharmaceutics**, v. 233, n. 1-2, p. 51-59, 2002.
- DE PAULA, Leonardo B. et al. Combination of hyperthermia and photodynamic therapy on mesenchymal stem cell line treated with chloroaluminum phthalocyanine magnetic-nanoemulsion. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 380, p. 372-376, 2015.
- DEATSCH, Alison E.; EVANS, Benjamin A. Heating efficiency in magnetic nanoparticle hyperthermia. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 354, p. 163-172, 2014.
- DERESKI, Mary O. et al. The effect of hypothermia and hyperthermia on photodynamic therapy of normal brain. **Neurosurgery**, v. 36, n. 1, p. 141-146, 1995.
- DETTY, Michael R. et al. Current clinical and preclinical photosensitizers for use in photodynamic therapy. **Journal of medicinal chemistry**, v. 47, n. 16, p. 3897-3915, 2004.
- DI CORATO, Riccardo et al. Combining magnetic hyperthermia and photodynamic therapy for tumor ablation with photoresponsive magnetic liposomes. **ACS nano**, v. 9, n. 3, p. 2904-2916, 2015.
- DOLMANS, Dennis et al. Photodynamic therapy for cancer. **Nature reviews cancer**, v. 3, n. 5, p. 380, 2003.
- DUNCAN, Ruth et al. Polymer therapeutics—polymers as drugs, drug and protein conjugates and gene delivery systems: past, present and future opportunities. **Journal of drug targeting**, v. 14, n. 6, p. 337-341, 2006.
- DURMUŞ, Mahmut; AHSEN, Vefa. Water-soluble cationic gallium (III) and indium (III) phthalocyanines for photodynamic therapy. **Journal of inorganic biochemistry**, v. 104, n. 3, p. 297-309, 2010.
- EBLEN, Scott T. Regulation of chemoresistance via alternative messenger RNA splicing. **Biochemical pharmacology**, v. 83, n. 8, p. 1063-1072, 2012.
- EBRAHIMI, Eomolbanin et al. Novel drug delivery system based on doxorubicin-encapsulated magnetic nanoparticles modified with PLGA-PEG1000 copolymer. **Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology**, v. 44, n. 1, p. 290-297, 2016.
- ECKSTEIN, Niels. Platinum resistance in breast and ovarian cancer cell lines. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 30, n. 1, p. 1, 2011.
- EL-NAHASS, MM. et al. Structural and optical properties of nanocrystalline aluminum phthalocyanine chloride thin films. **Materials Science in Semiconductor Processing**, v. 38, p. 177-183, 2015.
- ERBETTA, Cynthia D.'Avila Carvalho et al. Synthesis and characterization of poly (D, L-lactide-co-glycolide) copolymer. **Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology**, v. 3, n. 02, p. 208, 2012.
- ESFANDYARI-MANESH, Mehdi et al. Improved anticancer delivery of paclitaxel by albumin surface modification of PLGA nanoparticles. **DARU Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 23, n. 1, p. 28, 2015.
- ESSA, Sherief et al. Effect of polyethylene glycol (PEG) chain organization on the physicochemical properties of poly (D, L-lactide)(PLA) based nanoparticles. **European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics**, v. 75, n. 2, p. 96-106, 2010.

EUROPEAN COMMISSION. **Definition of a nanomaterial.** Disponível em: <http://ec.europa.eu/environment/chemicals/nanotech/faq/definition_en.htm>. Acesso em 18 de jan. 2019.

FAKRUDDIN, Md et al. Prospects and applications of nanobiotechnology: a medical perspective. **J Nanobiotechnol**, v. 10, n. 1, p. 31, 2012.

FARAJI, Amir H.; WIPF, Peter. Nanoparticles in cellular drug delivery. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 17, n. 8, p. 2950-2962, 2009.

FARAUDO, Jordi; CAMACHO, Juan. Cooperative magnetophoresis of superparamagnetic colloids: theoretical aspects. **Colloid and polymer science**, v. 288, n. 2, p. 207-215, 2010.

FECZKÓ, Tivadar. et al. Influence of process conditions on the mean size of PLGA nanoparticles. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, v. 50, n. 8, p. 846-853, 2011.

FERENC, Peter et al. Breast cancer and current therapeutic approaches: from radiation to photodynamic therapy. In: **Breast Cancer-Current and Alternative Therapeutic Modalities**. InTech, 2011.

FERTIG, Elana J. et al. Analysis of gene expression of secreted factors associated with breast cancer metastases in breast cancer subtypes. **Scientific reports**, v. 5, p. 12133, 2015.

FEUSER, Paulo Emilio et al. Simultaneous encapsulation of magnetic nanoparticles and zinc phthalocyanine in poly (methyl methacrylate) nanoparticles by miniemulsion polymerization and in vitro studies. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 135, p. 357-364, 2015.

FEYNMAN, Richard P. There's plenty of room at the bottom. **Miniaturization**, v. 282, p. 295-296, 1961.

FIGUEROLA, Albert et al. From iron oxide nanoparticles towards advanced iron-based inorganic materials designed for biomedical applications. **Pharmacological Research**, v. 62, n. 2, p. 126-143, 2010.

FOSTER, Beth et al. PFGSE-NMR Study of pH-Triggered Behavior in Pluronic– Ibuprofen Solutions. **Langmuir**, v. 25, n. 12, p. 6767-6771, 2009.

FROST, Georgia A. et al. Photodynamic therapy–induced immunosuppression in humans is prevented by reducing the rate of light delivery. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 131, n. 4, p. 962-968, 2011.

FURLANI, Edward P. Magnetic biotransport: analysis and applications. **Materials**, v. 3, n. 4, p. 2412-2446, 2010.

GAGLIARDI, Mariacristina. Novel biodegradable nanocarriers for enhanced drug delivery. **Therapeutic delivery**, v. 7, n. 12, p. 809-826, 2016.

GALIMBERTI, Gaston Nestor. Daylight Photodynamic Therapy Versus 5-Fluorouracil for the Treatment of Actinic Keratosis: A Case Series. **Dermatology and therapy**, v. 8, n. 1, p. 137-141, 2018.

GAO, Yu et al. Nanotechnology-based intelligent drug design for cancer metastasis treatment. **Biotechnology advances**, v. 32, n. 4, p. 761-777, 2014.

GAONKAR, Raghuvir H. et al. Garcinol loaded vitamin E TPGS emulsified PLGA nanoparticles: preparation, physicochemical characterization, in vitro and in vivo studies. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 530, 2017.

GARG, Abhishek D.; AGOSTINIS, Patrizia. ER stress, autophagy and immunogenic cell death in photodynamic therapy-induced anti-cancer immune responses. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 13, n. 3, p. 474-487, 2014.

GAS, Piotr. Essential Facts on the History of Hyperthermia and their Connections with Electromedicine. **arXiv preprint arXiv:1710.00652**, 2017.

GIANIZELI, Mateus Candeia. **Eficácia da Alumínio-Cloro-Ftalocianina associada a nanopartículas de magnetita na Terapia Fotodinâmica: um estudo in vitro**. 2015. 97f. . Dissertação de Mestrado – Universidade de Brasília, Brasília, 2015.

GIULIANO, Armando E. et al. Axillary dissection vs no axillary dissection in women with invasive breast cancer and sentinel node metastasis: a randomized clinical trial. **Jama**, v. 305, n. 6, p. 569-575, 2011.

GMEINER, William H.; GHOSH, Supratim. Nanotechnology for cancer treatment. **Nanotechnology reviews**, v. 3, n. 2, p. 111-122, 2014.

GOFRIT, Ofer. N. et al. Combined local bladder hyperthermia and intravesical chemotherapy for the treatment of high-grade superficial bladder cancer. **Urology**, v. 63, n. 3, p. 466-471, 2004.

GOLBAMAKI, Nazanin et al. Genotoxicity of metal oxide nanomaterials: review of recent data and discussion of possible mechanisms. **Nanoscale**, v. 7, n. 6, p. 2154-2198, 2015.

GONZÁLEZ FLECHA, F. Luis; LEVI, Valeria. Determination of the molecular size of BSA by fluorescence anisotropy. **Biochemistry and molecular biology education**, v. 31, n. 5, p. 319-322, 2003.

GOSLINSKI, Tomasz et al. Photophysical properties and photocytotoxicity of novel phthalocyanines–potentially useful for their application in photodynamic therapy. **Polyhedron**, v. 30, n. 9, p. 1538-1546, 2011.

GUO, Hua et al. pH-sensitive pullulan-based nanoparticle carrier for adriamycin to overcome drug-resistance of cancer cells. **Carbohydrate polymers**, v. 111, p. 908-917, 2014.

GUPTA, Ram B.; KOMPELLA, Uday B. (Ed.). **Nanoparticle technology for drug delivery**. Informa Health Care, 2006.

HAMNVIK, Ole-Petter Riksfjord et al. Thyroid dysfunction from antineoplastic agents. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 103, n. 21, p. 1572-1587, 2011.

HANAHAN, Douglas et al. Biological hallmarks of cancer. **Holland-Frei Cancer Medicine**, p. 1-10, 2. 2017.

HE, Chuanxin et al. Preparation of Well-Defined Core–Shell Particles by Cu²⁺-Mediated Graft Copolymerization of Methyl Methacrylate from Bovine Serum Albumin. **Langmuir**, v. 24, n. 19, p. 10717-10722, 2008.

HEDAYATNASAB, Ziba et al. Review on magnetic nanoparticles for magnetic nanofluid hyperthermia application. **Materials & Design**, v. 123, p. 174-196, 2017.

HSIEH, Hui-Chen et al. ROS-induced toxicity: exposure of 3T3, RAW264.7, and MCF7 cells to superparamagnetic iron oxide nanoparticles results in cell death by mitochondria-dependent apoptosis. **Journal of nanoparticle research**, v. 17, n. 2, p. 71, 2015.

HU, Yong et al. Effect of PEG conformation and particle size on the cellular uptake efficiency of nanoparticles with the HepG2 cells. **Journal of Controlled Release**, v. 118, n. 1, p. 7-17, 2007.

HUNTER, Kent W et al. Mechanisms of metastasis. **Breast Cancer Research**, v. 10, n. 1, p. S2, 2008.

IARC (International Agency for Research on Cancer). **All Cancers (excluding non-melanoma skin cancer) Estimated Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012**. Disponível em: <https://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx>. Acesso em: 17 de jan. 2018.

IMAM, Syed Z. et al. Iron oxide nanoparticles induce dopaminergic damage: *in vitro* pathways and in vivo imaging reveals mechanism of neuronal damage. **Molecular neurobiology**, v. 52, n. 2, p. 913-926, 2015.

INCAa (Instituto Nacional de Câncer do Brasil). **O que é o câncer?** Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/o-que-e-cancer>>. Acesso em: 17 de jan. 2019.

INCAb (Instituto Nacional de Câncer do Brasil). **Estatísticas de câncer**. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/numeros-de-cancer>>. Acesso em: 17 de jan. 2019.

INCAc (Instituto Nacional de Câncer do Brasil). **Câncer de mama**. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-mama>>. Acesso em: 17 de jan. 2019.

INCAd (Instituto Nacional de Câncer do Brasil). **Sintomas MAMA**. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/mama/sintomas>>. Acesso em: 17 de jan. 2019.

INCAe (Instituto Nacional de Câncer do Brasil). **Estadiamento**. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?ID=54>. Acesso em: 17 de jan. 2019.

ISO TC 229 (INTERNATIONAL, 2010).

ISSA, Bashar et al. Magnetic nanoparticles: surface effects and properties related to biomedicine applications. **International journal of molecular sciences**, v. 14, n. 11, p. 21266-21305, 2013.

ISSELS, Rolf D. Hyperthermia adds to chemotherapy. **European journal of cancer**, v. 44, n. 17, p. 2546-2554, 2008.

JAIN, Jay Prakash; KUMAR, Neeraj. Development of amphotericin B loaded polymersomes based on (PEG) 3-PLA co-polymers: factors affecting size and in vitro evaluation. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 40, n. 5, p. 456-465, 2010.

JAYME, Cristiano Ceron et al. Spectroscopic analysis of aluminum chloride phthalocyanine in binary water/ethanol systems for the design of a new drug delivery system for photodynamic therapy cancer treatment. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 153, p. 178-183, 2016.

JEYANTHI, Reddy. et al. Effect of solvent removal technique on the matrix characteristics of polylactide/glycolide microspheres for peptide delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 38, n. 2-3, p. 235-244, 1996.

JIMENEZ-RUIZ, Aila et al. Nonfunctionalized gold nanoparticles: synthetic routes and synthesis condition dependence. **Chemistry—A European Journal**, v. 21, n. 27, p. 9596-9609, 2015.

JOANITTI, Graziella Anselmo et al. Nanostructured systems for the organelle-specific delivery of anticancer drugs. **Mini reviews in medicinal chemistry**, v. 17, n. 3, p. 224-236, 2017.

- JORDAN, Andreas et al. Inductive heating of ferrimagnetic particles and magnetic fluids: physical evaluation of their potential for hyperthermia. **International Journal of Hyperthermia**, v. 25, n. 7, p. 499-511, 2009.
- KACHKACHI, Hamid. Effects of spin non-collinearities in magnetic nanoparticles. **Journal of magnetism and magnetic materials**, v. 316, n. 2, p. 248-254, 2007.
- KAISER, Jochen et al. Neural correlates of chemotherapy-related cognitive impairment. **Cortex**, v. 54, p. 33-50, 2014.
- KARIMI, Zahra et al. Nano-magnetic particles used in biomedicine: core and coating materials. **Materials Science and Engineering: C**, v. 33, n. 5, p. 2465-2475, 2013.
- KÄSTLE, Marc et al. Combination of PDT and inhibitor treatment affects melanoma cells and spares keratinocytes. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 50, n. 2, p. 305-312, 2011.
- KESSEL, David; LUO, Yu. Mitochondrial photodamage and PDT-induced apoptosis. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 42, n. 2, p. 89-95, 1998.
- KEY, Jaehong; LEARY, James F. Nanoparticles for multimodal *in vivo* imaging in nanomedicine. **International journal of nanomedicine**, v. 9, p. 711, 2014.
- KIM, Wool Lim et al. Biarmed poly (ethylene glycol)-(pheophorbide a) 2 conjugate as a bioactivatable delivery carrier for photodynamic therapy. **Biomacromolecules**, v. 15, n. 6, p. 2224-2234, 2014.
- KOLAROVA, Hana. et al. In vitro photodynamic therapy on melanoma cell lines with phthalocyanine. **Toxicology in Vitro**, v. 21, n. 2, p. 249-253, 2007.
- KONAN, Yvette Niamien et al. Enhanced photodynamic activity of meso-tetra (4-hydroxyphenyl) porphyrin by incorporation into sub-200 nm nanoparticles. **European journal of pharmaceutical sciences**, v. 18, n. 3-4, p. 241-249, 2003.
- KORBKANDI, Hassan. et al. Silver Nanoparticles, The Delivery of Nanoparticles, Dr. Abbass A. **Hashim** (Ed.), ISBN: 978-953-51-0615-9, InTech. 2012.
- KORBELIK, Mladen et al. Calreticulin as cancer treatment adjuvant: combination with photodynamic therapy and photodynamic therapy-generated vaccines. **Frontiers in oncology**, v. 5, p. 15, 2015.
- KUMAR, Rajendra et al. In vivo pharmacokinetic studies and intracellular delivery of methotrexate by means of glycine-tethered PLGA-based polymeric micelles. **International journal of pharmaceuticals**, v. 519, n. 1-2, p. 138-144, 2017.
- KUMARI, Avnesh et al. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. **Colloids and surfaces B: Biointerfaces**, v. 75, n. 1, p. 1-18, 2010.
- LAN, Wen-Liang et al. The effects of formulation and serum albumin on the in vitro photodynamic activity of zinc (II) phthalocyanines substituted with sulfonated quinolineoxy groups. **Dyes and Pigments**, v. 128, p. 215-225, 2016.
- LANGER, Robert; FOLKMAN, Judah. Polymers for the sustained release of proteins and other macromolecules. **Nature**, v. 263, n. 5580, p. 797, 1976.
- LE, Thi Thuy Duong et al. Evaluation of anti-HER2 scFv-conjugated PLGA-PEG nanoparticles on 3D tumor spheroids of BT474 and HCT116 cancer cells. **Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology**, v. 7, n. 2, p. 025004, 2016.

- LEARY, James F. Nanotechnology: what is it and why is small so big?. **Canadian Journal of Ophthalmology**, v. 45, n. 5, p. 449-456, 2010.
- LEE, Hohyeon et al. Combination of chemotherapy and photodynamic therapy for cancer treatment with sonoporation effects. **Journal of controlled release**, v. 283, p. 190-199, 2018.
- LEOPOLD, Ellen. **A darker ribbon: Breast cancer, women, and their doctors in the twentieth century**. Beacon Press, 2000.
- LI, Bing et al. Apoptotic mechanism of MCF-7 breast cells in vivo and in vitro induced by photodynamic therapy with C-phycocyanin. **Acta Biochim Biophys Sin**, v. 42, n. 1, p. 80-89, 2009.
- LIANG, Changyan et al. Improved therapeutic effect of folate-decorated PLGA-PEG nanoparticles for endometrial carcinoma. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 19, n. 13, p. 4057-4066, 2011.
- LIU, Qian et al. Magnetic field enhanced cell uptake efficiency of magnetic silica mesoporous nanoparticles. **Nanoscale**, v. 4, n. 11, p. 3415-3421, 2012.
- LIZOTTE, Patrick. H. et al. In situ vaccination with cowpea mosaic virus nanoparticles suppresses metastatic cancer. **Nature nanotechnology**, v. 11, n. 3, p. 295, 2016.
- LOBBEZOO, Dorien. J. A. et al. Prognosis of metastatic breast cancer: are there differences between patients with de novo and recurrent metastatic breast cancer?. **British journal of cancer**, v. 112, n. 9, p. 1445, 2015.
- LOCATELLI, Erica; FRANCHINI, Mauro Comes. Biodegradable PLGA-b-PEG polymeric nanoparticles: synthesis, properties, and nanomedical applications as drug delivery system. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 14, n. 12, p. 1316, 2012.
- LONGO, João Paulo Figueiró et al. Photodynamic therapy with aluminum-chloro-phthalocyanine induces necrosis and vascular damage in mice tongue tumors. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 94, n. 2, p. 143-146, 2009.
- LORD, Christopher J.; ASHWORTH, Alan. The DNA damage response and cancer therapy. **Nature**, v. 481, n. 7381, p. 287, 2012.
- LOZY, Fred; KARANTZA, Vassiliki. Autophagy and cancer cell metabolism. In: **Seminars in cell & developmental biology**. Academic Press, 2012. p. 395-401.
- LUCKY, Sasidharan Swarnalatha et al. Nanoparticles in photodynamic therapy. **Chemical reviews**, v. 115, n. 4, p. 1990-2042, 2015.
- MA, Beatriz Chiyin. **Eficácia do alumínio-cloro ftalocianina associado a nanopartículas de poli (vinil metil éter-co-anidrido maleico) na terapia fotodinâmica contra células tumorais in vitro**. 2012. 82f. . Dissertação de Mestrado – Universidade de Brasília, Brasília, 2012.
- MACDONALD, Ian J.; DOUGHERTY, Thomas J. Basic principles of photodynamic therapy. **Journal of Porphyrins and Phthalocyanines**, v. 5, n. 02, p. 105-129, 2001.
- MAEDA, Hiroshi. Tumor-selective delivery of macromolecular drugs via the EPR effect: background and future prospects. **Bioconjugate chemistry**, v. 21, n. 5, p. 797-802, 2010.
- MAFTOUM-COSTA, Máira et al. Mitochondria, endoplasmic reticulum and actin filament behavior after PDT with chloroaluminum phthalocyanine liposomal in HeLa cells. **Cell biology international**, v. 32, n. 8, p. 1024-1028, 2008.

- MAIA, Wallace José. **Caracterização de nanopartículas blenda de biopolímeros (PHBV, PCL e PLLA) contendo progesterona**. 2014. 42f. Trabalho de Conclusão de Curso – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba. 2014
- MAINARDES, Rubiana M.; EVANGELISTA, Raul C. PLGA nanoparticles containing praziquantel: effect of formulation variables on size distribution. **International journal of pharmaceutics**, v. 290, n. 1-2, p. 137-144, 2005.
- MAJUMDAR, Poulomi et al. Activatable triplet photosensitizers: magic bullets for targeted photodynamic therapy. **Journal of Materials Chemistry C**, v. 2, n. 30, p. 5982-5997, 2014.
- MAKADIA, Hirenkumar K.; SIEGEL, Steven J. Poly lactic-co-glycolic acid (PLGA) as biodegradable controlled drug delivery carrier. **Polymers**, v. 3, n. 3, p. 1377-1397, 2011.
- MAKLUF, Ana Silvia et al. Quality of life assessment in women with breast cancer. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 52, n. 1, p. 49-58, 2005.
- MANCHANDA, Romila et al. Preparation and characterization of a polymeric (PLGA) nanoparticulate drug delivery system with simultaneous incorporation of chemotherapeutic and thermo-optical agents. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 75, n. 1, p. 260-267, 2010.
- MANDAL, Samir; CHAUDHURI, Keya. Engineered magnetic core shell nanoprobe: Synthesis and applications to cancer imaging and therapeutics. **World journal of biological chemistry**, v. 7, n. 1, p. 158, 2016.
- MANOOCHEHRI, Saeed et al. Surface modification of PLGA nanoparticles via human serum albumin conjugation for controlled delivery of docetaxel. **DARU Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 21, n. 1, p. 58, 2013.
- MARSHALL, Al-Alwan et al. Regulation of B-lymphocyte activation by the PH domain adaptor protein Bam32/DAPP1. **Biochemical Society Transactions**, v. 35, n. 2, p. 181-182, 2007.
- MAVROGENIS, Andreas F. et al. Side effects of radiation in musculoskeletal oncology: clinical evaluation of radiation-induced fractures. **International journal of immunopathology and pharmacology**, v. 24, n. 1_suppl2, p. 29-37, 2011.
- MEDRANO, Jason Jerry Atoche. **Síntese e caracterização de nanopartículas de magnetita recobertas por bicamada de ácido oleico e óleo essencial (Fe₃O₄@AO/OE) visando a aplicação no tratamento de úlceras gástricas**. 2018. 141f. Tese de Doutorado – Universidade de Brasília, Brasília, 2018.
- MELLMAN, Ira et al. Cancer immunotherapy comes of age. **Nature**, v. 480, n. 7378, p. 480, 2011.
- MENG LIN, Meng et al. Iron oxide-based nanomagnets in nanomedicine: fabrication and applications. **Nano reviews**, v. 1, n. 1, p. 4883, 2010.
- MIGNANI, Serge et al. Advances in combination therapies based on nanoparticles for efficacious cancer treatment: an analytical report. **Biomacromolecules**, v. 16, n. 1, p. 1-27, 2014.
- MINKO, Tamara et al. Nanotechnology approaches for personalized treatment of multidrug resistant cancers. **Advanced drug delivery reviews**, v. 65, n. 13-14, p. 1880-1895, 2013.
- MISRA, Ranjita et al. Cancer nanotechnology: application of nanotechnology in cancer therapy. **Drug discovery today**, v. 15, n. 19-20, p. 842-850, 2010.

- MONGE-FUENTES, Victoria. **Terapia fotodinâmica mediada por nanoemulsão à base de óleo de açaí (*Euterpe oleracea* Martius) para o tratamento de melanoma *in vitro* e *in vivo***. 2014. 163f. Tese de Doutorado – Universidade de Brasília, Brasília, 2014.
- MONTEIRO, Gabriela Alves et al. O dilema da decisão de Mastectomia Bilateral como prevenção do Câncer de Mama: aspectos éticos e bioéticos. **Bioethikos**, v. 5, n. 4, p. 443-450, 2011.
- MOORE, Caroline M. et al. Photodynamic therapy for prostate cancer—a review of current status and future promise. **Nature Reviews Urology**, v. 6, n. 1, p. 18, 2009.
- MORA-HUERTAS, Claudia E. et al. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. **International journal of pharmaceutics**, v. 385, n. 1-2, p. 113-142, 2010.
- MOREIRA, José Ranclenison Lopes. **A Nanotecnologia na liberação controlada de fármacos no Tratamento do Câncer de Mama**. 2014.
- MOSAFER, Jafar et al. Preparation and characterization of uniform-sized PLGA nanospheres encapsulated with oleic acid-coated magnetic-Fe₃O₄ nanoparticles for simultaneous diagnostic and therapeutic applications. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 514, p. 146-154, 2017a.
- MOSAFER, Jafar et al. In vitro and in vivo evaluation of anti-nucleolin-targeted magnetic PLGA nanoparticles loaded with doxorubicin as a theranostic agent for enhanced targeted cancer imaging and therapy. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 113, p. 60-74, 2017b.
- MOSER, Frank H.; THOMAS, Arthur L. Phthalocyanine compounds. **Journal of Chemical Education**, v. 41, n. 5, p. 245, 1964.
- MOURA, Ludmilla David de. **Tratamento de câncer de mama utilizando terapia fotodinâmica com nanoemulsões de Ftalocianina de cloro alumínio**. 2017. 150f. Dissertação de Mestrado – Universidade de Brasília, Brasília, 2017.
- MROZ, Pawel et al. Cell death pathways in photodynamic therapy of cancer. **Cancers**, v. 3, n. 2, p. 2516-2539, 2011.
- MUEHLMANN, Luis Alexandre et al. Aluminium-phthalocyanine chloride nanoemulsions for anticancer photodynamic therapy: Development and in vitro activity against monolayers and spheroids of human mammary adenocarcinoma MCF-7 cells. **Journal of nanobiotechnology**, v. 13, n. 1, p. 36, 2015.
- MUEHLMANN, Luis Alexandre et al. Aluminum–phthalocyanine chloride associated to poly (methyl vinyl ether-co-maleic anhydride) nanoparticles as a new third-generation photosensitizer for anticancer photodynamic therapy. **International journal of nanomedicine**, v. 9, p. 1199, 2014.
- MUTHU, Muthu. S. Nanoparticles based on PLGA and its co-polymer: An overview. **Asian Journal of Pharmaceutics (AJP): Free full text articles from Asian J Pharm**, v. 3, n. 4, 2014.
- NAIR, Lakshmi S.; LAURENCIN, Cato T. Biodegradable polymers as biomaterials. **Progress in polymer science**, v. 32, n. 8-9, p. 762-798, 2007.
- NAKAMOTO, Kazuo. Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds. **Handbook of Vibrational Spectroscopy**, 2006.

- NCI (National Cancer Institute). **NCI Alliance for Nanotechnology in Cancer**. National Cancer Institute - NCI, 2011. Disponível em: <<http://nano.cancer.gov/>>. Acesso em: 17 jan. 2019.
- NDHUNDHUMA, Ivy et al. Subcellular co-localization of aluminum (III) phthalocyanine chloride tetrasulphonate with fluorescent markers in the human melanoma cell-line HT-144. **Medical Laser Application**, v. 26, n. 3, p. 93-100, 2011.
- NG, Terence et al. The genetic variants underlying breast cancer treatment-induced chronic and late toxicities: a systematic review. **Cancer treatment reviews**, v. 40, n. 10, p. 1199-1214, 2014.
- NICHOLS, Joseph W.; BAE, You Han. Odyssey of a cancer nanoparticle: from injection site to site of action. **Nano today**, v. 7, n. 6, p. 606-618, 2012.
- NIEMIROWICZ, Katarzyna et al. Pharmacokinetics and Anticancer Activity of Folic Acid-Functionalized Magnetic Nanoparticles. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 13, n. 6, p. 665-677, 2017.
- NIH (National Institute of Health, National Cancer Institute). **What You Need To Know About Breast Cancer**. NIH Publication, n. 09-1556, 2009.
- NILSSON, Greger et al. Distribution of coronary artery stenosis after radiation for breast cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 30, n. 4, p. 380-386, 2012.
- NOORLANDER, Cornelle W. et al. Horizon scan of nanomedicinal products. **Nanomedicine**, v. 10, n. 10, p. 1599-1608, 2015.
- NYMAN, Emma S.; HYNNINEN, Paavo H. Research advances in the use of tetrapyrrolic photosensitizers for photodynamic therapy. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 73, n. 1-2, p. 1-28, 2004.
- O'CONNOR, Aisling E. et al. Porphyrin and nonporphyrin photosensitizers in oncology: preclinical and clinical advances in photodynamic therapy. **Photochemistry and photobiology**, v. 85, n. 5, p. 1053-1074, 2009.
- OKASSA, L. Ngaboni et al. Development and characterization of sub-micron poly (D, L-lactide-co-glycolide) particles loaded with magnetite/maghemite nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 302, n. 1-2, p. 187-196, 2005.
- OLIVEIRA, Lidiane C. et al. Aplicações de nanopartículas lipídicas no tratamento de tumores sólidos: revisão de literatura. **Revista Brasileira de Cancerologia**. V. 58, n. 4, p. 695-701, 2012.
- OLSON, James S.; TARBOX, M. Bathsheba's breast: women, cancer and history. 2004.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Health topics**. Cancer. Disponível em: <<https://www.who.int/topics/cancer/en/>>. Acesso em: 17 de jan. 2019.
- OSUWA, J.; ANUSIONWU, P. Some advances and prospects in nanotechnology: a review. **Asian Journal of Information Technology**, v. 10, p. 96-100, 2011.
- OWENS III, Donald E.; PEPPAS, Nicholas A. Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. **International journal of pharmaceutics**, v. 307, n. 1, p. 93-102, 2006.
- PAL, S. L. et al. Antihypertensive drug loaded PLGA nanoparticles: Impact of formulation variables on particle size distribution. **Der Pharmacia Sinica**, v. 4, p. 40-46, 2013.

- PANKHURST, Quentin A. et al. Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. **Journal of physics D: Applied physics**, v. 36, n. 13, p. R167, 2003.
- PARDOLL, Drew M. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. **Nature Reviews Cancer**, v. 12, n. 4, p. 252, 2012.
- PATEL, Ashaben et al. Recent advances in protein and peptide drug delivery: a special emphasis on polymeric nanoparticles. **Protein and peptide letters**, v. 21, n. 11, p. 1102-1120, 2014.
- PAULA, Carina Silva et al. Chloroaluminium phthalocyanine polymeric nanoparticles as photosensitisers: photophysical and physicochemical characterisation, release and phototoxicity in vitro. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 49, n. 3, p. 371-381, 2013.
- PAUTLER, Michelle; BRENNER, Sara. Nanomedicine: promises and challenges for the future of public health. **International journal of nanomedicine**, v. 5, p. 803, 2010.
- PEER, Dan et al. Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. **Nature nanotechnology**, v. 2, n. 12, p. 751, 2007.
- PENTEADO, Janaína Gomes. **Estudo da eficácia da alumínio-clorofalocianina em micelas aplicada na Terapia Fotodinâmica em células de melanoma murino**. 2016. 116f. Dissertação de Mestrado – Universidade de Brasília, Brasília, 2016.
- PERECIN, Caio José. **Nanopartículas superparamagnéticas encapsuladas com polímeros para tratamento de câncer por hipertermia**. 2016. 92f. Dissertação de Mestrado – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.
- PERES, Carina et al. Poly (lactic acid)-based particulate systems are promising tools for immune modulation. **Acta biomaterialia**, v. 48, p. 41-57, 2017.
- PERRAULT, Steven D. et al. Mediating tumor targeting efficiency of nanoparticles through design. **Nano letters**, v. 9, n. 5, p. 1909-1915, 2009.
- PESTANA, Kelly Chrystina. **Microemulsões biocompatíveis de anfotericina B para administração oral: estudo estrutural, liberação in vitro e farmacocinética pré-clínica**. 2009. 140f. Tese de Doutorado – Universidade Estadual Paulista, Araraquara, São Paulo, 2009.
- PHILLIPS, David. Light relief: photochemistry and medicine. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 9, n. 12, p. 1589-1596, 2010.
- PLAETZER, Kristjan et al. Photophysics and photochemistry of photodynamic therapy: fundamental aspects. **Lasers in medical science**, v. 24, n. 2, p. 259-268, 2009.
- POHLMANN, Paula. R.; SCHWARTSMANN, G. Novas Combinações Terapêuticas. **In Oncologia Molecular**. Ferreira, C. G., Rocha, J.C. (Eds) São Paulo, Brasil. Editora Atheneu. PP 415-427, 2004.
- PORTILHO, Flávia Arruda. **O uso de nanoesferas de albumina na terapia fotodinâmica e magnetohipertermia do tumor de Ehrlich**. 2011. 126f. Tese de Doutorado – Universidade de Brasília, Brasília, 2011.
- POURCELOT, Emmanuel et al. Iron for proliferation of cell lines and hematopoietic progenitors: nailing down the intracellular functional iron concentration. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research**, v. 1853, n. 7, p. 1596-1605, 2015.

PY-DANIEL, Karen Rapp. **Desenvolvimento e aplicação biológica de nanossistemas contendo o fotossensibilizante cloreto de alumínio ftalocianina**. 2017. 166f. Tese de Doutorado – Universidade de Brasília, Brasília, 2017.

QIU, Liping et al. A cell-targeted, size-photocontrollable, nuclear-uptake nanodrug delivery system for drug-resistant cancer therapy. **Nano letters**, v. 15, n. 1, p. 457-463, 2014.

RABE, Michael et al. Understanding protein adsorption phenomena at solid surfaces. **Advances in colloid and interface science**, v. 162, n. 1-2, p. 87-106, 2011.

RAJAN, Balan et al. Synthesis and *in vitro* anticancer evaluation of 2-isopropyl-5-methylphenol Loaded PLGA based iron oxide nanoparticles. **Biomedicine & Preventive Nutrition**, v. 4, n. 2, p. 137-141, 2014.

RAMIMOGHADAM, Donya et al. Progress in electrochemical synthesis of magnetic iron oxide nanoparticles. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 368, p. 207-229, 2014.

RANG, H. P. et al. **Farmacologia**. 5ª edição. Rio de Janeiro: Elsevier, p. 789-809, 2004.

RAO, J. Prasad; GECKELER, Kurt E. Polymer nanoparticles: preparation techniques and size-control parameters. **Progress in polymer science**, v. 36, n. 7, p. 887-913, 2011.

REGINATO, Eleonora et al. Photodynamic therapy plus regulatory T-cell depletion produces immunity against a mouse tumour that expresses a self-antigen. **British journal of cancer**, v. 109, n. 8, p. 2167, 2013.

REIS, Catarina Pinto et al. Preparation of Drug-Loaded Polymeric Nanoparticles. In: **Nanomedicine in Cancer**. Pan Stanford, p. 197-240, 2017.

REN, Xuefeng et al. Comparison of proliferation and genomic instability responses to WRN silencing in hematopoietic HL60 and TK6 cells. **PLoS one**, v. 6, n. 1, p. e14546, 2011.

RICO, Ci et al. Skin permeation and biodistribution of chloroaluminum phthalocyanine (CIAIPc) nanoemulsion applied topically in Wistar rats. **Rev. argent. dermatol**, v. 94, n. 2, 2013.

ROBERTSON, Claudine A. et al. Photodynamic therapy (PDT): a short review on cellular mechanisms and cancer research applications for PDT. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 96, n. 1, p. 1-8, 2009.

RODRIGUES, Mosar C. et al. Photodynamic therapy based on *Arrabidaea chica* (Crajiuru) extract nanoemulsion: *in vitro* activity against monolayers and spheroids of human mammary adenocarcinoma MCF-7 cells. **Journal of Nanomedicine & Nanotechnology**, v. 6, n. 3, p. 1, 2015.

RODRIGUES, Mosar Corrêa. **Indução de morte celular imunogênica da terapia fotodinâmica mediada por cloreto de alumínio-ftalocianina associado a nanoemulsão em células de câncer de mama murino *in vitro* e *in vivo***. 2018. 132f. Tese de Doutorado – Universidade de Brasília, Brasília, 2018.

RODRIGUES, Mosar Corrêa. **Terapia fotodinâmica mediada por extrato de crajiuru e cloreto de alumínio-ftalocianina em nanoemulsões no tratamento de câncer de mama *in vitro***. 2014. 139f. Dissertação de Mestrado – Universidade de Brasília, Brasília, 2014.

ROMERO, Gabriela et al. Surface Engineered Poly (lactide-co-glycolide) Nanoparticles for Intracellular Delivery: Uptake and Cytotoxicity: A Confocal Raman Microscopic Study. **Biomacromolecules**, v. 11, n. 11, p. 2993-2999, 2010

- ROZ, Alessandra Luzia da et al. Nanoestruturas: princípios e aplicações. **Coleção Nanociência e Nanotecnologia**, v. 1, 2015.
- RUDDON, Raymond W. **Cancer biology**. Oxford University Press, 2007.
- RUGOLO, Michela; LENZA, Giorgio. Monitoring of the mitochondrial and plasma membrane potentials in human fibroblasts by tetraphenylphosphonium ion distribution. **Journal of bioenergetics and biomembranes**, v. 19, n. 6, p. 705-718, 1987.
- SAENGRUENGRIT, Chalathan et al. The combined magnetic field and iron oxide-PLGA composite particles: Effective protein antigen delivery and immune stimulation in dendritic cells. **Journal of colloid and interface science**, v. 520, p. 101-111, 2018.
- SAHOO, Sanjeeb K. et al. Nanoparticles: a boon to drug delivery, therapeutics, diagnostics and imaging. In: **Nanomedicine in Cancer**. Pan Stanford, 2017. p. 73-124.
- SALUNKHE, Ashwini B. et al. Magnetic hyperthermia with magnetic nanoparticles: a status review. **Current topics in medicinal chemistry**, v. 14, n. 5, p. 572-594, 2014.
- SANTOS, Guilherme Pinheiro. **Uso da terapia fotodinâmica no tratamento do paciente oncológico: revisão da literatura**. 2018. 51f. Trabalho de conclusão de curso. Universidade Federal de Goiás, Jataí, Goiás, 2018.
- SANTOS, Priscilla Crispiniano dos. **Nanopartículas: toxicidade biológica**. 2014. 55f. Trabalho de conclusão de curso. Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2014.
- SCHERLUND, Marie et al. Micellization and gelation in block copolymer systems containing local anesthetics. **International journal of pharmaceutics**, v. 211, n. 1-2, p. 37-49, 2000.
- SCULLY, Olivia Jane et al. Breast cancer metastasis. **Cancer Genomics-Proteomics**, v. 9, n. 5, p. 311-320, 2012.
- SHAKWEH, Monjed et al. Poly (lactide-co-glycolide) particles of different physicochemical properties and their uptake by Peyer's patches in mice. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 61, n. 1-2, p. 1-13, 2005.
- SHARMA, Shweta et al. PLGA-based nanoparticles: a new paradigm in biomedical applications. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 80, p. 30-40, 2016.
- SHEN, Jian-Min et al. Surface charge-switchable polymeric magnetic nanoparticles for the controlled release of anticancer drug. **ACS applied materials & interfaces**, v. 5, n. 15, p. 7014-7024, 2013
- SHEN, Shiyang et al. Recent progress in nanomedicine-based combination cancer therapy using a site-specific co-delivery strategy. **Biomaterials science**, v. 5, n. 8, p. 1367-1381, 2017.
- SHEPARD, H. M. et al. Herceptin. In: **Therapeutic Antibodies**. Springer, Berlin, Heidelberg, 2008. p. 183-219.
- SILVA, Malintha et al. Prolonged breastfeeding reduces risk of breast cancer in Sri Lankan women: A case-control study. **Cancer epidemiology**, v. 34, n. 3, p. 267-273, 2010.
- SILVA, Marcela Fernandes et al. Optimization of maghemite-loaded PLGA nanospheres for biomedical applications. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 49, n. 3, p. 343-351, 2013.
- SILVA, Renata Carvalho. **Fototoxicidade de nanoemulsão de extrato de cajuru (*Arrabidaea chica*) em linhagem de células de adenocarcinoma mamário murino (4T1)**. 2013. 125f. Tese de Doutorado – Universidade de Brasília, Brasília, 2013.

- SINGH, Abhalaxmi; SAHOO, Sanjeeb K. Magnetic nanoparticles: a novel platform for cancer theranostics. **Drug discovery today**, v. 19, n. 4, p. 474-481, 2014.
- SINGH, Ashwani Kumar et al. Biosynthesis of gold and silver nanoparticles by natural precursor clove and their functionalization with amine group. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 12, n. 5, p. 1667-1675, 2010.
- SINGH, Gurpreet et al. Recent biomedical applications and patents on biodegradable polymer-PLGA. **Int J Pharmacol Pharm Sci**, v. 1, p. 30-42, 2014.
- SOLIMAN, Hatem. Immunotherapy strategies in the treatment of breast cancer. **Cancer Control**, v. 20, n. 1, p. 17-21, 2013.
- SONAM et al. Effect of physicochemical properties of biodegradable polymers on nano drug delivery. **Polymer Reviews**, v. 53, n. 4, p. 546-567, 2013.
- SOUKOS, Nikolaos S. et al. The Effect of Charge on Cellular Uptake and Phototoxicity of Polylysine Chlorine6Conjugates. **Photochemistry and photobiology**, v. 65, n. 4, p. 723-729, 1997.
- SOUSA, Diana et al. Nanotechnology in Targeted Drug Delivery and Therapeutics. In: **Applications of Targeted Nano Drugs and Delivery Systems**. Elsevier, 2019. p. 357-409.
- SRIRAMAN, Shravan Kumar et al. Barriers to drug delivery in solid tumors. **Tissue barriers**, v. 2, n. 3, p. e29528, 2014.
- STAN, Daniela et al. Breast cancer survivorship issues. **Hematology/Oncology Clinics**, v. 27, n. 4, p. 805-827, 2013.
- SU, Shishuai et al. Integration of photothermal therapy and synergistic chemotherapy by a porphyrin self-assembled micelle confers chemosensitivity in triple-negative breast cancer. **Biomaterials**, v. 80, p. 169-178, 2016.
- SUGANYA, KS Uma et al. Blue green alga mediated synthesis of gold nanoparticles and its antibacterial efficacy against Gram positive organisms. **Materials Science and Engineering: C**, v. 47, p. 351-356, 2015.
- TAO, Yu Tai. Structural comparison of self-assembled monolayers of n-alkanoic acids on the surfaces of silver, copper, and aluminum. **Journal of the American Chemical Society**, v. 115, n. 10, p. 4350-4358, 1993.
- TATAR, Andra-Sorina et al. Nanomedicine approaches in acute lymphoblastic leukemia. **Journal of Controlled Release**, v. 238, p. 123-138, 2016.
- TEDESCO, Antonio C. et al. Synthesis, photophysical and photochemical aspects of phthalocyanines for photodynamic therapy. **Current Organic Chemistry**, v. 7, n. 2, p. 187-196, 2003.
- TINKOV, Steliyan et al. New doxorubicin-loaded phospholipid microbubbles for targeted tumor therapy: in-vivo characterization. **Journal of Controlled Release**, v. 148, n. 3, p. 368-372, 2010.
- TOMAZINI, Marília Vannuchi et al. Terapia fotodinâmica com ftalocianina de zinco tópica: avaliação da intensidade de fluorescência, absorção cutânea, alterações histológicas e imunohistoquímicas na pele do modelo animal. **An Bras Dermatol**, v. 82, n. 6, p. 535-41, 2007.
- TORRE, Lindsey A. et al. Global cancer statistics, 2012. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 65, n. 2, p. 87-108, 2015.

- TSUBONE, Tayana M. et al. Aggregation of aluminum phthalocyanine hydroxide in water/ethanol mixtures. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 25, n. 5, p. 890-897, 2014.
- VAKILINEZHAD, Molood Alsadat et al. Fabrication and in vitro evaluation of magnetic PLGA nanoparticles as a potential Methotrexate delivery system for breast cancer. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 44, p. 467-474, 2018.
- VAN DE VEN, Andrew H. et al. PLGA nanoparticles loaded with the antileishmanial saponin β -aescin: Factor influence study and in vitro efficacy evaluation. **International journal of pharmaceutics**, v. 420, n. 1, p. 122-132, 2011.
- VAN DE WEERT, Marco et al. The effect of a water/organic solvent interface on the structural stability of lysozyme. **Journal of controlled release**, v. 68, n. 3, p. 351-359, 2000.
- VAN KEUREN, Edward et al. Phthalocyanine nanoparticle formation in supersaturated solutions. **Langmuir**, v. 24, n. 12, p. 6079-6084, 2008.
- VANCE, Marina E. et al. Nanotechnology in the real world: Redeveloping the nanomaterial consumer products inventory. **Beilstein Journal of Nanotechnology**, v. 6, n. 1, p. 1769-1780, 2015.
- VANDERHOFF, John W. et al. **Polymer emulsification process**. U.S. Patent n. 4,177,177, 4 dez. 1979.
- VASANTHAN, Arumugam et al. Regional hyperthermia combined with radiotherapy for uterine cervical cancers: a multi-institutional prospective randomized trial of the international atomic energy agency. **International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics**, v. 61, n. 1, p. 145-153, 2005.
- VASSILIOU, Alexandros. A. et al. Facile synthesis of polyester-PEG triblock copolymers and preparation of amphiphilic nanoparticles as drug carriers. **Journal of Controlled Release**, v. 148, n. 3, p. 388-395, 2010.
- VAUTHIER, Christine; BOUCHEMAL, Kawthar. Methods for the preparation and manufacture of polymeric nanoparticles. **Pharmaceutical research**, v. 26, n. 5, p. 1025-1058, 2009.
- VECCHIO, Mary M. Breast cancer screening in the high-risk population. **Asia-Pacific journal of oncology nursing**, v. 5, n. 1, p. 46, 2018.
- VITTAR, Natalia B. Rumie et al. Caspase-independent apoptosis, in human MCF-7c3 breast cancer cells, following photodynamic therapy, with a novel water-soluble phthalocyanine. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 42, n. 7, p. 1123-1131, 2010.
- WANG, Maya.; THANOU, Maya. Targeting nanoparticles to cancer. **Pharmacological Research**, v. 62, n. 2, p. 90-99, 2010.
- WEIJER, Ruud et al. Enhancing photodynamic therapy of refractory solid cancers: Combining second-generation photosensitizers with multi-targeted liposomal delivery. **Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews**, v. 23, p. 103-131, 2015.
- WEINBERG, Robert Allan. **The Biology of Cancer**. Garland Science. 2° Ed. 796, 2014.
- WINSLOW, Sofia et al. Prognostic stromal gene signatures in breast cancer. **Breast Cancer Research**, v. 17, n. 1, p. 23, 2015.

- WOJTONISZAK, Malgorzata. et al. Graphene oxide functionalized with methylene blue and its performance in singlet oxygen generation. **Materials Research Bulletin**, v. 48, n. 7, p. 2636-2639, 2013.
- WU, Wei et al. Recent progress on magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, surface functional strategies and biomedical applications. **Science and technology of advanced materials**, v. 16, n. 2, p. 023501, 2015.
- WUST, Peter. et al. Hyperthermia in combined treatment of cancer. **The lancet oncology**, v. 3, n. 8, p. 487-497, 2002.
- XIANG, Liangzhong et al. Real-time optoacoustic monitoring of vascular damage during photodynamic therapy treatment of tumor. **Journal of biomedical optics**, v. 12, n. 1, p. 014001, 2007.
- YAMAMOTO, Kelly Reis. **Desenvolvimento de nanomaterial de referência e estudo de citotoxicidade em *Saccharomyces cerevisiae*: Nanopartículas de ferro**. 2014. Trabalho de Conclusão de Curso – Universidade de Brasília, Brasília, 2014
- YANO, Shigenobu et al. Current states and future views in photodynamic therapy. **Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews**, v. 12, n. 1, p. 46-67, 2011.
- YHEE, Ji Young et al. Cancer-targeted MDR-1 siRNA delivery using self-cross-linked glycol chitosan nanoparticles to overcome drug resistance. **Journal of Controlled Release**, v. 198, p. 1-9, 2015.
- YOKOYAMA, Masayuki. Drug targeting with nano-sized carrier systems. **Journal of Artificial Organs**, v. 8, n. 2, p. 77-84, 2005.
- YU, Dahai et al. Influence of surface coating of PLGA particles on the internalization and functions of human endothelial cells. **Biomacromolecules**, v. 13, n. 10, p. 3272-3282, 2012.
- YU, Mi Kyung et al.. Targeting strategies for multifunctional nanoparticles in cancer imaging and therapy. **Theranostics**, v. 2, n. 1, p. 3, 2012.
- YUSHU, Huang; VENKATRAMAN, Subbu. The effect of process variables on the morphology and release characteristics of protein-loaded PLGA particles. **Journal of applied polymer science**, v. 101, n. 5, p. 3053-3061, 2006.
- ZHANG, Ling et al. Oleic acid coating on the monodisperse magnetite nanoparticles. **Applied Surface Science**, v. 253, n. 5, p. 2611-2617, 2006.
- ZHAO, Yanyan et al. Synthesis and characterization of gallium oxide nanostructures via a soft-chemistry route. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 111, n. 44, p. 16290-16299, 2007.
- ZHEN, Zipeng et al. Tumor vasculature targeted photodynamic therapy for enhanced delivery of nanoparticles. **ACS nano**, v. 8, n. 6, p. 6004-6013, 2014.
- ZHENG, Yuanhong et al. Photodynamic-therapy activates immune response by disrupting immunity homeostasis of tumor cells, which generates vaccine for cancer therapy. **International journal of biological sciences**, v. 12, n. 1, p. 120, 2016.
- ZHOU, Jie et al. Polyelectrolyte coated PLGA nanoparticles: templation and release behavior. **Macromolecular bioscience**, v. 9, n. 4, p. 326-335, 2009.