

LUIS ALEXANDRE MUEHLMANN

CLORETO DE ALUMÍNIO-FTALOCIANINA ASSOCIADO A  
NANOPARTÍCULAS DE POLI(VINIL,METIL-ÉTER-CO-ANIDRIDO MALEICO)  
COMO POTENCIAL FOTOSSENSIBILIZANTE DE TERCEIRA GERAÇÃO  
PARA TERAPIA FOTODINÂMICA ANTINEOPLÁSICA

Brasília, 2011

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

LUIS ALEXANDRE MUEHLMANN

CLORETO DE ALUMÍNIO-FTALOCIANINA ASSOCIADO A  
NANOPARTÍCULAS DE POLI(VINIL,METIL-ÉTER-CO-ANIDRIDO MALEICO)  
COMO POTENCIAL FOTOSSENSIBILIZANTE DE TERCEIRA GERAÇÃO  
PARA TERAPIA FOTODINÂMICA ANTINEOPLÁSICA

Tese apresentada como requisito parcial  
para a obtenção do título de Doutor em  
Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-  
Graduação em Ciências da Saúde da  
Universidade de Brasília.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Bentes de  
Azevedo

Brasília

2011

LUIS ALEXANDRE MUEHLMANN

CLORETO DE ALUMÍNIO-FTALOCIANINA ASSOCIADO A  
NANOPARTÍCULAS DE POLI(VINIL,METIL-ÉTER-CO-ANIDRIDO MALEICO)  
COMO POTENCIAL FOTOSSENSIBILIZANTE DE TERCEIRA GERAÇÃO  
PARA TERAPIA FOTODINÂMICA ANTINEOPLÁSICA

Tese apresentada como requisito parcial  
para a obtenção do título de Doutor em  
Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-  
Graduação em Ciências da Saúde da  
Universidade de Brasília.

Aprovada em 28 de novembro de 2011

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Ricardo Bentes de Azevedo - (presidente)

Universidade de Brasília

Prof. Dr. Arnóbio Antônio da Silva Júnior

Universidade Federal do Rio Grande do Norte

Prof. Dra. Mônica Valero da Silva

Universidade de Brasília

Dra. Jaqueline Rodrigues da Silva

Universidade de Brasília

Prof. Dr. Cláudio Eduardo de Oliveira Cavalcanti

Universidade Federal de Alagoas

Aos meus mestres, especialmente à Professora Anita Nishiyama e aos Professores Jamesson e Maurino.

## **AGRADECIMENTOS**

À minha irmã Anna Paula, ao meu irmão Paulo Miguel, à minha mãe Marlene e ao meu pai João Carlos, por terem moldado a pessoa que sou. A base do meu pensamento, dos meus conceitos de moral, da definição que tenho acerca do que realmente é sucesso na vida, veio destas pessoas.

Ao meu orientador, mestre e amigo, Professor Ricardo. Além da sua grande capacidade técnica e científica, creio que sua melhor qualidade é enxergar o ser humano que está por trás do título de aluno. Não foi à toa que o presenteei até no dia das mães!

Ao meu amigo e colega de trabalho, João Paulo, por ter ajudado no desenho e no desenvolvimento deste trabalho.

Àqueles que participaram diretamente no desenvolvimento de importantes etapas deste trabalho, especialmente Renata, Ludmilla, Khéllida, Beatriz, Graziella, Professor Wilson e Professora Maria de Fátima.

A todos que fazem parte da equipe do Laboratório de Nanobiotecnologia e do Departamento de Genética e Morfologia por terem tornado o nosso lugar de trabalho um ambiente harmonioso.

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

Ao Laboratório de Biofísica, especialmente à Professora Sônia Freitas e seus orientados, especialmente Mary-Ann, pelo auxílio na avaliação das características coloidais das formulações.

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

"Eu jamais iria para a fogueira por uma opinião minha, afinal, não tenho certeza alguma. Porém, eu iria pelo direito de ter e mudar de opinião, quantas vezes eu quisesse."

**Friedrich Nietzsche**

## RESUMO

A terapia fotodinâmica tem se apresentado como uma alternativa segura e altamente eficaz ao tratamento de diversos tipos de câncer. A sua alta eficácia decorre da indução direta de morte das células neoplásicas, da destruição da microvasculatura tumoral e do reforço da imunidade antitumoral. Todos estes efeitos derivam do estresse oxidativo resultante dos processos fotodinâmicos que se seguem à combinação de oxigênio molecular, luz de comprimento de onda específico e um fotossensibilizante, na célula-alvo. Apesar das vantagens da terapia fotodinâmica, os fotossensibilizantes disponíveis, marcadamente o cloreto de alumínio-ftalocianina, apresentam importantes inconvenientes, tais como perda de atividade fotodinâmica em meios aquosos e propriedades farmacocinéticas desfavoráveis à sua concentração nas células-alvo. Neste contexto, a nanotecnologia permite o desenvolvimento de fotossensibilizantes, ditos de 3ª geração, que contornam tais inconvenientes. Assim, este trabalho objetivou desenvolver um novo fotossensibilizante de 3ª geração com atividade fotodinâmica antineoplásica, composto por cloreto de alumínio-ftalocianina associado a nanopartículas. As nanopartículas foram produzidas com poli(vinil,metil-éter-co-anidrido maleico) e apresentaram diâmetro hidrodinâmico de  $201,1 \pm 4,9$  nm. Este copolímero possui grupamentos anidrido que permitem a fácil conjugação de moléculas diversas à superfície das nanopartículas, abrindo a possibilidade de funcionalização destas para o direcionamento ativo a células tumorais. Os resultados obtidos com estas nanopartículas indicaram que a formulação possui atividade fotodinâmica em meio aquoso, já que apresentou intensa fluorescência e promoveu a geração de oxigênio singlete quando irradiada com laser, enquanto o cloreto de alumínio-ftalocianina livre em meio aquoso, conforme o esperado, praticamente não apresentou atividade fotodinâmica. Este resultado é associado à manutenção do fotossensibilizante no seu estado desagregado pelas nanopartículas. Nos ensaios biológicos, observou-se que células neoplásicas murinas 4T1 captaram avidamente o fotossensibilizante associado às nanopartículas. A formulação nanoestruturada apresentou citotoxicidade fotodinâmica contra estas células, um evento acompanhado de intensa fragmentação

de DNA. Estes resultados, somados ao fato de o copolímero poli(vinil,metil-éter-co-anidrido maleico) permitir a fácil conjugação de moléculas diversas à superfície das nanopartículas, indicam que este novo fotossensibilizante de 3ª geração, baseado em cloreto de alumínio-ftalocianina, é um potencial agente antineoplásico e que pode ser utilizado em pesquisas futuras que visem direcionar o fotossensibilizante à massa tumoral.

Palavras-chave: PVM/MA; cloreto de alumínio-ftalocianina; terapia fotodinâmica antineoplásica; fotossensibilizante de terceira geração; nanotecnologia.

## ABSTRACT

Photodynamic therapy has shown to be a safe and highly effective choice for the treatment of several cancer types. Its high effectiveness results from the direct triggering of neoplastic cell death, destruction of the tumor microvasculature and boosting of antitumor immunity. These effects are due to the oxidative stress in the target cell resulting from the photodynamic processes following the combination of molecular oxygen, light of specific wavelength and a photosensitizer. However, despite the advantages shown by photodynamic therapy, the available photosensitizers – markedly the aluminium-phthalocyanine chloride – show important drawbacks, such as the loss of photodynamic activity in aqueous media and pharmacokinetic properties that are not favorable to their concentration in target cells. In this context, nanotechnology allows for the development of new photosensitizers, the so called 3<sup>rd</sup> generation photosensitizers, which circumvent such drawbacks. Thus, this work aimed to develop a new 3<sup>rd</sup> generation photosensitizer endowed with antineoplastic photodynamic activity, composed by aluminium-phthalocyanine chloride associated to nanoparticles. The nanoparticles used in the present study had a mean hydrodynamic diameter of 201 nm and were based on poly(methyl,vinyl,ether-co-maleic anhydride). This copolymer presents anhydride groups that allow for the easy conjugation of several molecules to the nanoparticles surface, enabling the functionalization of the nanoparticles for active targeting to neoplastic cells. The results show that the formulation possesses photodynamic activity in aqueous media, since it presented intense fluorescence and triggered the generation of singlet oxygen when irradiated, while the free aluminium-phthalocyanine chloride showed almost no photodynamic activity in aqueous media, as expected. This finding is related to the ability of the nanoparticles to keep the photosensitizer as disaggregated molecules. Biological tests indicated a strong uptake of the nanoparticle-associated photosensitizer by murine neoplastic 4T1 cells. The nanostructured formulation showed photodynamic cytotoxicity and promoted intense DNA fragmentation in 4T1 cells. These results, along with the fact that the poly(methyl,vinyl,ether-co-maleic anhydride) copolymer allows for the easy conjugation

of several molecules to the nanoparticles' surface, show that this new aluminium-phthalocyanine chloride-based 3<sup>rd</sup> generation photosensitizer is a potential antineoplastic agent which can be used in future researches aiming to achieve tumor specific targeting.

Keywords: PVM/MA; aluminium-phthalocyanine chloride; antineoplastic photodynamic therapy; third generation photosensitizers; nanotechnology.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fotorreações do tipo I e do tipo II.....	24
Figura 2. Geração fotodinâmica de oxigênio singlete ( $^1\text{O}_2$ ) a partir de oxigênio triplete ( $^3\text{O}_2$ ) .....	25
Figura 3. Diagrama de Jablonski representando a excitação e o relaxamento de um FS e os processos fotodinâmicos que levam às reações do tipo I e do tipo II. ....	26
Figura 4. Representação dos três estados energéticos mais baixos do oxigênio molecular.....	27
Figura 5. Esquemas de importantes reações envolvendo o oxigênio singlete ( $^1\text{O}_2$ ) e moléculas biológicas .....	28
Figura 6. Transmitância de tecido biológico – epitélio de saco escrotal humano com 7mm de espessura.....	30
Figura 7. Principais FS porfirínicos e não porfirínicos .....	33
Figura 8. A alteração da hidrofiliicidade das moléculas de ftalocianinas não é a melhor forma de aproximá-las do conceito de FS ideal .....	42

Figura 9. Estrutura básica de nanopartículas: nanoesfera (A) e nanocápsula (B). ..... 44

Figura 10. Número de publicações contendo todos os termos “nanoparticles”, “photodynamic therapy”. Pesquisa realizada em 15 de setembro de 2011 (71)..... 45

Figura 11. Método de preparo de nanopartículas de poli(vinil,metil-éter-co-anidrido maleico) (PVM/MA) associadas ao cloreto de alumínio-ftalocianina (AlFtCl). AlFtCl-NP = nanopartículas de PVM/MA associadas ao AlFtCl. .... 49

Figura 12. Índice de polidispersão (PDI) e diâmetro hidrodinâmico médio de partículas formadas através do método de nanoprecipitação (método Ouzo) em função da concentração inicial de PVM/MA na solução acetônica. .... 64

Figura 13. Espectros de fluorescência (excitação em 350 nm) do cloreto de alumínio-ftalocianina 10  $\mu\text{M}$  em diversos solventes. .... 66

Figura 14. Influência da concentração de Tween 20 no meio precipitante sobre a agregação e a perda após centrifugação do cloreto de alumínio-ftalocianina (AlFtCl), na ausência de nanopartículas de PVM/MA. .... 67

Figura 15. Rendimento quântico de fluorescência (excitação em 350 nm, emissão em 690 nm) da suspensão final de nanopartículas em função da concentração de Tween 20 utilizada no meio precipitante durante o seu preparo. .... 69

Figura 16. Efeito da concentração do cloreto de alumínio-ftalocianina (AlFtCl) utilizada no meio precipitante sobre a eficiência de associação de AlFtCl às nanopartículas (a) e sobre o rendimento quântico de fluorescência (excitação em 350 nm, emissão em 690 nm) da suspensão final de nanopartículas contendo 1  $\mu$ M de AlFtCl (b). ..... 70

Figura 17. Distribuição de valores de diâmetro hidrodinâmico para a formulação de cloreto de alumínio-ftalocianina associado a nanopartículas de PVM/MA (AlFtCl-NP). 72

Figura 18. Foeletromicrografias de varredura de nanopartículas de PVM/MA recobertas com ouro. .... 73

Figura 19. Espectros de absorvância (“a” e “b”) e fluorescência (“c” e “d”, excitação em 350 nm), obtidos antes (“a” e “c”) e depois (“b” e “d”) da desintegração de nanopartículas de PVM/MA associadas ao cloreto de alumínio-ftalocianina (AlFtCl-NP/PBS) ou puras (NP pura/PBS), ambas suspensas em PBS..... 74

Figura 20. Perfil de desintegração e de variação de fluorescência (excitação em  $\lambda$  de 350 nm, emissão em  $\lambda$  de 690 nm) em função do tempo para nanopartículas de PVM/MA associadas ao cloreto de alumínio-ftalocianina (AlFtCl-NP) suspensas em PBS a 25 °C. .... 76

Figura 21. Espectros de transmitância no infravermelho para as amostras de PVM/MA, de cloreto de alumínio-ftalocianina puro (AlFtCl), e de AlFtCl associado a nanopartículas de PVM/MA (AlFtCl-NP) após exposição à água por 1 ou 6 h, , em função do número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ). ..... 77

Figura 22. Produção de oxigênio singlete pela irradiação (0,5 J/cm<sup>2</sup>) do cloreto de alumínio-ftalocianina (AlFtCl) em diferentes composições. .... 78

Figura 23. Estabilidade nanoscópica e fotodinâmica da formulação de cloreto de alumínio-ftalocianina associado a nanopartículas de PVM/MA suspensas em PBS e mantidas por até 60 dias congeladas a -20 °C. .... 79

Figura 24. Perfil de incorporação, *in vitro*, de cloreto de alumínio-ftalocianina (AlFtCl) por células 4T1 e NIH 3T3 expostas ao AlFtCl associado a nanopartículas de PVM/MA por diferentes tempos. .... 80

Figura 25. Internalização de cloreto de alumínio-ftalocianina (AlFtCl) em células 4T1 expostas à formulação de AlFtCl (0,25 µM) associado a nanopartículas de PVM/MA por 15 minutos, *in vitro* ..... 82

Figura 26. Citotoxicidade fotodinâmica (TFD 3 J/cm<sup>2</sup>) e no escuro pelo cloreto de alumínio-ftalocianina associado a nanopartículas de PVM/MA (AlFtCl-NP), em várias concentrações, em células 4T1 e NIH 3T3 mantidas *in vitro*. .... 83

Figura 27. Porcentagem de células 4T1 apresentando DNA fragmentado após serem expostas ao cloreto de alumínio-ftalocianina associado a nanopartículas (AlFtCl-NP) apenas ou ao AlFtCl-NP mais irradiação com laser de  $\lambda$  de 670 nm com densidade de energia de 3, 9 ou 27 J/cm<sup>2</sup>. .... 84

Figura 28. Ilustração das possíveis formas sob as quais o cloreto de alumínio-ftalocianina (AlFtCl) poderia estar associado às nanopartículas de PVM/MA. .... 93

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Indicações clínicas já aprovadas ou em testes pré-aprovação para diversos FS porfirínicos e relacionados à porfirina (26)..... 31

Tabela 2. Características das nanopartículas associadas ou não ao cloreto de alumínio-ftalocianina, antes e depois do congelamento..... 71

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

<b>Sigla, abreviatura ou símbolo</b>	<b>Significado</b>
$^1\text{FS}$	Fotossensibilizante em seu estado singlete fundamental
$^1\text{O}_2$	Oxigênio singlete
$^1\Delta_g$	Primeiro estado singlete do oxigênio molecular
$^1\Sigma_g^+$	Segundo estado singlete do oxigênio molecular
$^3\Sigma_g^-$	Oxigênio molecular em seu estado triplete fundamental
$^3\text{FS}^*$	Fotossensibilizante em seu estado triplete excitado
$^3\text{O}_2$	oxigênio em seu estado triplete fundamental
Abs	Absorbância da substância no comprimento de onda de excitação
ADPM	Azidipirrometenos
ALA	Ácido 5-aminolevulínico
AIFtCl	Cloreto de alumínio-ftalocianina
AIFtCl-NP	cloreto de alumínio-ftalocianina associado a nanopartículas de poli(vinil,metil-éter-co-anidrido maleico)
ANOVA	Análise de variância
ATR	Atenuador de refletância total
BChl	Clorofila bacteriana
CIS	Cruzamento intersistemas
D.O.	Densidade óptica
DBF	1,3-difenil-isobenzofurano
DH	Diâmetro hidrodinâmico
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Meio de Eagle Modificado por Dulbecco)
DMSO	Dimetilsulfóxido

E.P.M.	Erro padrão da média
EDTA	Ácido etilenodiaminotetraacético
EPR	Permeação e retenção aumentadas
ERO	Espécie reativa de oxigênio
$E_T$	Energia de transição
F	Intensidade de fluorescência
$F_{max}$	Maior intensidade de fluorescência para uma série de medidas deste parâmetro
FS	Fotossensibilizante
$F_x$	Intensidade de fluorescência de uma amostra x
G	fator da geometria do sistema óptico, sempre menor que 1, decorrente do fato de que nem toda a fluorescência é detectada
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
Hp	Hematoporfirina
HpD	Derivado de hematoporfirina
$h\nu$	Fóton
I	Intensidade da luz de excitação
m:v	Proporção massa volume
mTHCP	meso-tetra(hidroxifenil)clorina
MTT	brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
NP	Nanopartícula de poli(vinil,metil-éter-co-anidrido maleico)
$O_2^{\cdot-}$	Ânion superóxido
OH $\cdot$	Radical hidroxila
P.A.	Pro analysi
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PDI	Índice de polidispersão
PLA	poli(ácido láctico)
PLGA	poli(ácido láctico-co-glicólico)

PpIX	Protoporfirina IX
PVM/MA	poli(vinil,metil-éter-co-anidrido maleico)
RE	Retículo endoplasmático
RJBC	Banco de células do Rio de Janeiro
S	Substrato orgânico
S(O)	substrato oxigenado
S <sub>0</sub>	Estado fundamental singlete
S <sub>1</sub>	Primeiro estado excitado singlete
S <sub>2</sub>	Segundo estado excitado singlete
T <sub>0</sub>	Estado fundamental triplete
T <sub>1</sub>	Primeiro estado excitado triplete
TAT	Transativador de transcrição
TFD	Terapia fotodinâmica
U.A.	Unidade arbitrária
UI	Unidade internacional
v:v	Proporção volume:volume
$\epsilon$	Coefficiente de extinção molar
$\lambda$	Comprimento de onda
$\tau_T$	Vida média
$\Phi_F$	Rendimento quântico de fluorescência
$\Phi_T$	Rendimento quântico para conversão ao estado triplete

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	24
1.1 PRINCÍPIOS FOTOFÍSICOS E FOTOQUÍMICOS DA TERAPIA FOTODINÂMICA .....	24
1.1.1 Geração Fotodinâmica de Oxigênio Singlete e Reações Envolvendo esta Espécie e Moléculas Biológicas .....	25
1.2 MECANISMOS BIOLÓGICOS DA TERAPIA FOTODINÂMICA ANTINEOPLÁSICA.....	29
1.3 FOTOSSENSIBILIZANTES PARA TERAPIA FOTODINÂMICA .....	29
1.3.1 Fotossensibilizantes Não Porfirínicos .....	34
1.3.2 Fotossensibilizantes Porfirínicos de 1ª Geração .....	35
1.3.3 Fotossensibilizantes Porfirínicos de 2ª Geração .....	36
1.3.3.1 Metaloporfirinas (ou Texafirinas).....	37
1.3.3.2 Porfírenos .....	37
1.3.3.3 Feoforbídeos.....	38
1.3.3.4 Purpurinas .....	38
1.3.3.5 Clorinas.....	39
1.3.3.6 Precursores de Protoporfirina IX.....	39
1.3.3.7 Ftalocianinas.....	39
1.3.4. Fotossensibilizantes Porfirínicos de 3ª Geração .....	42
1.4 PLATAFORMAS NANOTECNOLÓGICAS PARA TERAPIA FOTODINÂMICA .....	43
2 OBJETIVOS.....	47
3 MATERIAIS E MÉTODOS .....	48
3.1 MATERIAIS .....	48

3.2 DESCRIÇÃO GERAL DO PROTOCOLO DE PREPARO DE AIFtCl ASSOCIADO A NANOPARTÍCULAS DE PVM/MA .....	48
3.3 PADRONIZAÇÃO DO PROTOCOLO DE PREPARO DAS NANOPARTÍCULAS .....	50
3.3.1 Dosagem de AIFtCl .....	50
3.3.2 Espectros de Fluorescência e de Absorbância na Região Visível do Espectro Eletromagnético .....	50
3.3.3 Efeito da Concentração de PVM/MA sobre o Diâmetro Hidrodinâmico, o Potencial Zeta e a Polidispersão das Nanopartículas .....	51
3.3.4 Influência da Concentração do Surfactante Tween 20 no Meio Precipitante sobre a Fluorescência e a Perda de AIFtCl durante o Processo de Preparo das Nanopartículas .....	52
3.3.5 Eficiência de Associação e Rendimento Quântico de Fluorescência em Função da Concentração de AIFtCl no Meio Precipitante .....	52
3.3.6 Rendimento Quântico de Fluorescência em Função da Concentração de Tween 20 no Meio Precipitante .....	54
3.4 FORMULAÇÃO FINAL DE AIFtCl ASSOCIADO ÀS NANOPARTÍCULAS DE PVM/MA (AIFtCl-NP) .....	55
3.4.1 Preparo .....	55
3.4.2 Eficiência do Processo .....	55
3.5 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS .....	56
3.5.1 Perfil de Desintegração de Nanopartículas e Variação da Fluorescência em Suspensão de AIFtCl-NP em Função do Tempo .....	56
3.5.2 Espectroscopia de Transmitância na Região do Infravermelho .....	57
3.5.3 Produção de Oxigênio Singlete .....	57
3.5.4 Características Coloidais e Morfológicas das Nanopartículas .....	58
3.5.5 Estabilidade Fotodinâmica e Coloidal da Formulação de AIFtCl-NP .....	58

3.6 ATIVIDADE FOTODINÂMICA DE AIFtCl-NP EM SISTEMAS BIOLÓGICOS....	59
3.6.1 Cultivo Celular .....	59
3.6.2 Perfil de Incorporação de AIFtCl por Células 4T1 e NIH 3T3 Expostas ao AIFtCl-NP In Vitro .....	59
3.6.3 Visualização da Incorporação do AIFtCl-NP por Células Neoplásicas ao Microscópio Confocal .....	60
3.6.4 Citotoxicidade Fotodinâmica do AIFtCl-NP, In Vitro, contra Células 4T1 e NIH 3T3 .....	60
3.6.5 Teste de Fragmentação de DNA em Células Expostas à Formulação AIFtCl-NP .....	62
3.7 TESTES ESTATÍSTICOS .....	62
4 RESULTADOS.....	64
4.1 PADRONIZAÇÃO DO PROTOCOLO DE PREPARO DE AIFtCl-NP.....	64
4.1.1 O Diâmetro Hidrodinâmico e o Índice de Polidispersão, PDI, são Afetados pela Concentração de Copolímero PVM/MA Empregada no Preparo das Nanopartículas .....	64
4.1.2 O Surfactante Tween 20 Aumenta Significativamente a Fluorescência do AIFtCl em Meio Aquoso.....	65
4.1.3 A agregação de AIFtCl durante o preparo de AIFtCl-NP é significativamente reduzida pelo Tween 20 .....	66
4.1.4 O Rendimento Quântico de Fluorescência da Formulação AIFtCl-NP Aumenta em Função do Emprego de Tween 20 no Meio Precipitante.....	68
4.1.5 A Eficiência de Associação e o Rendimento Quântico de Fluorescência da Formulação AIFtCl-NP Diminuem com o Aumento da Concentração do AIFtCl no Meio Precipitante.....	69
4.2 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS.....	71
4.2.1 AIFtCl-NP é Composto por Nanopartículas Monodispersas e com Carga Negativa em pH Fisiológico .....	71

4.2.2 Nanopartículas de PVM/MA são Esféricas .....	72
4.2.3 AIFtCI-NP Apresenta Pico de Absorção de Luz na Região do Vermelho e Forte Fluorescência em Meio Aquoso, Antes e Após a sua Desintegração .....	73
4.2.4 A Desintegração de AIFtCI-NP em PBS não Extingue a Fluorescência do AIFtCI.....	75
4.2.5 A Desintegração de AIFtCI-NP Ocorre por Hidrólise dos Grupamentos Anidrido do PVM/MA .....	76
4.2.6 AIFtCI-NP Gera Oxigênio Singlete por Fotoativação em Meio Aquoso .....	77
4.2.7 AIFtCI-NP Congelada Apresenta Estabilidade Fotodinâmica e Nanoscópica .....	78
4.3 ATIVIDADE FOTODINÂMICA DE AIFtCI-NP EM SISTEMAS BIOLÓGICOS.....	80
4.3.1 Células Neoplásicas Murinas 4T1 Incorporam mais Intensamente o AIFtCI-NP em Relação a Fibroblastos Não Neoplásicos NIH 3T3.....	80
4.3.2 O AIFtCI-NP Incorporado por Células Neoplásicas 4T1 Concentra-se no Citoplasma.....	81
4.3.3 AIFtCI-NP Exerce Citotoxicidade Fotodinâmica contra Células Neoplásicas 4T1 .....	83
4.3.4 TFD com AIFtCI-NP Promove Fragmentação de DNA em Células 4T1 .....	84
5 DISCUSSÃO .....	85
6 CONCLUSÕES.....	102
REFERÊNCIAS.....	103

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 PRINCÍPIOS FOTOFÍSICOS E FOTOQUÍMICOS DA TERAPIA FOTODINÂMICA

A terapia fotodinâmica, TFD, é um método de promoção de citotoxicidade que envolve processos fotoquímicos que se seguem à excitação luminosa de fotossensibilizantes (FS), levando ao desencadeamento de dois tipos de fotorreações principais (Figura 1) (1). Ambos os tipos de fotorreação ocasionam danos oxidativos às moléculas circunvizinhas.

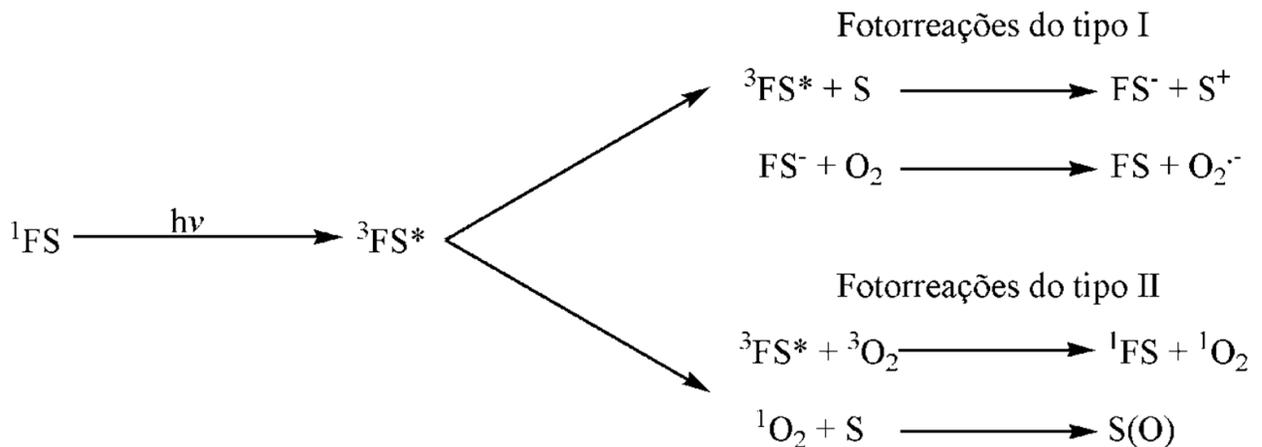


Figura 1. Fotorreações do tipo I e do tipo II.  ${}^1\text{FS}$  = fotossensibilizante em seu estado singlete fundamental;  $h\nu$  = fóton;  ${}^3\text{FS}^*$  = fotossensibilizante em seu estado triplete excitado;  $\text{FS}^\cdot$  = fotossensibilizante reduzido; S = substrato orgânico;  $\text{O}_2$  = oxigênio molecular;  $\text{O}_2^{\cdot-}$  = ânion superóxido;  ${}^3\text{O}_2$  = oxigênio em seu estado triplete fundamental;  ${}^1\text{O}_2$  = oxigênio em seu estado singlete; S(O) = substrato oxigenado;  $\text{S}^+$  = substrato oxidado. Adaptado de (1).

Em ambientes hipóxicos, o FS excitado pode oxidar diretamente substratos orgânicos (S), gerando seu estado reduzido ( $\text{FS}^\cdot$ ) (1, 2). Na sequência, o  $\text{O}_2$  pode reagir com o  $\text{FS}^\cdot$ , convertendo-se em ânion superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), o qual pode ser convertido a radical hidroxila ( $\text{OH}^\cdot$ ), um agente altamente oxidante (1, 2). Estas fotorreações são classificadas como do tipo I (1, 2).

As fotorreações do tipo II são aquelas que envolvem a produção de  ${}^1\text{O}_2$  e predominam em ambientes oxigenados (1). Neste caso, as moléculas do FS funcionam como verdadeiros catalisadores fotoativados da produção de  ${}^1\text{O}_2$  (Figura 2) e estima-se

que cada uma delas pode produzir, através dos processos fotodinâmicos, entre  $10^3$  e  $10^5$  moléculas de  $^1\text{O}_2$  antes de ser fotodegradada (3). Apesar de as reações do tipo II estarem geralmente associadas à geração de  $^1\text{O}_2$ , outros compostos também têm seu estado fundamental na configuração triplete e podem, portanto, ser envolvidos neste tipo de fotorreação (1). Importantes exemplos biológicos destes compostos são o óxido nítrico e os carotenóides (1, 2).

O oxigênio singlete ( $^1\text{O}_2$ ) é um agente com alto potencial oxidante, capaz de reagir com a maioria das moléculas biológicas (4). A reação fotoquímica que leva à produção do  $^1\text{O}_2$  a partir do oxigênio triplete em seu estado fundamental ( $^3\text{O}_2$ ) está representada na Figura 2. Esta reação exige três componentes básicos:  $^3\text{O}_2$  – presente em tecidos biológicos aeróbicos metabolicamente ativos –, luz de comprimento de onda apropriado e um FS capaz de absorver e utilizar energia luminosa para excitar o  $^3\text{O}_2$  ao seu estado singlete (3).

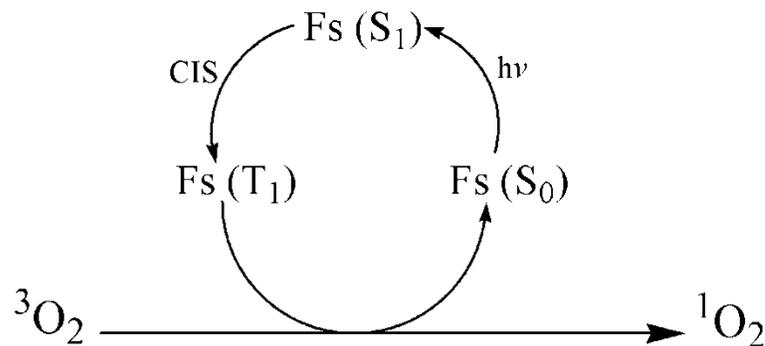


Figura 2. Geração fotodinâmica de oxigênio singlete ( $^1\text{O}_2$ ) a partir de oxigênio triplete ( $^3\text{O}_2$ ). Fs = fotossensibilizante;  $S_1$  = primeiro estado excitado singlete;  $T_1$  = primeiro estado excitado triplete;  $S_0$  = estado fundamental singlete;  $h\nu$  = energia de um fóton; CIS = cruzamento intersistemas.

### 1.1.1 Geração Fotodinâmica de Oxigênio Singlete e Reações Envolvendo esta Espécie e Moléculas Biológicas

Basicamente, a geração fotodinâmica de  $^1\text{O}_2$  depende de um FS capaz de absorver luz com comprimento de onda entre 400 e 800 nm, cuja dinâmica de excitação e relaxamento pode ser representada pelo diagrama de Jablonski (Figura 3)

(5). A luz absorvida excita o FS, que passa do estado fundamental singlete ( $S_0$ ) para o primeiro estado excitado singlete ( $S_1$ ) (5). Em geral, excitações por um único fóton são utilizadas para promover esta transição em TFD, apesar de existir a possibilidade de ser utilizada a excitação de dois fótons (3). O FS no estado  $S_1$  pode, por meio do fenômeno conhecido como “cruzamento intersistemas”, passar ao estado triplete ( $T_1$ ) (5). O tempo médio de vida do FS no estado triplete é, geralmente, cerca de 1000 vezes maior do que no estado singlete, possibilitando que o FS no estado  $T_1$  reaja com o  $^3O_2$  antes de ser convertido a um estado menos energético (3).

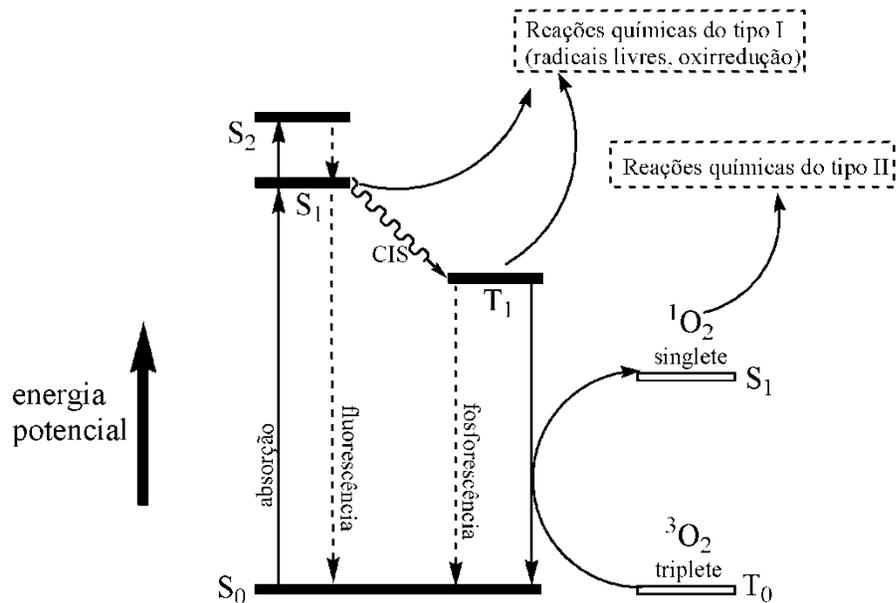


Figura 3. Diagrama de Jablonski representando a excitação e o relaxamento de um fotossensibilizante e os processos fotodinâmicos que levam às reações do tipo I e do tipo II. As barras horizontais representam os níveis energéticos dos diferentes estados de excitação do fotossensibilizante (barras cheias) e do oxigênio molecular (barras vazias).  $S_0$  = estado fundamental singlete;  $S_1$  = primeiro estado excitado singlete;  $S_2$  = segundo estado excitado singlete;  $T_0$  = estado fundamental triplete;  $T_1$  = primeiro estado excitado triplete; CIS = cruzamento intersistemas. Adaptado de (6).

A configuração eletrônica do  $^3O_2$  em seu estado fundamental, representado como  $T_0$  ou  $^3\Sigma_g^-$ , é tal que dois elétrons de mesmo spin ocupam os dois orbitais antiligantes mais externos (Figura 4) (7). Esse estado é o mais estável para o  $O_2$  (3, 7). Quando o  $O_2$  é excitado, dois níveis energéticos mais próximos do fundamental podem

ser atingidos, ambos do tipo singleto, i.e., com elétrons de spins opostos (3). O  $O_2$  singleto em seu estado  $^1\Delta_g$  possui um tempo de vida relativamente longo, sendo a forma de oxigênio singleto com maior potencial para reagir com moléculas vizinhas. Em meios aquosos, tais como o citosol de uma célula, este tempo de vida varia de nano- a microssegundos, o suficiente para que, uma vez gerado, o  $^1O_2$  reaja com moléculas vizinhas em um raio entre 10 e 50 nm (1, 8). Por ser uma espécie mais eletrofílica, com maior potencial oxidante em relação ao  $^3O_2$ , o  $^1O_2$  é capaz de oxidar substratos que em geral não reagem com o  $^3O_2$  (3).

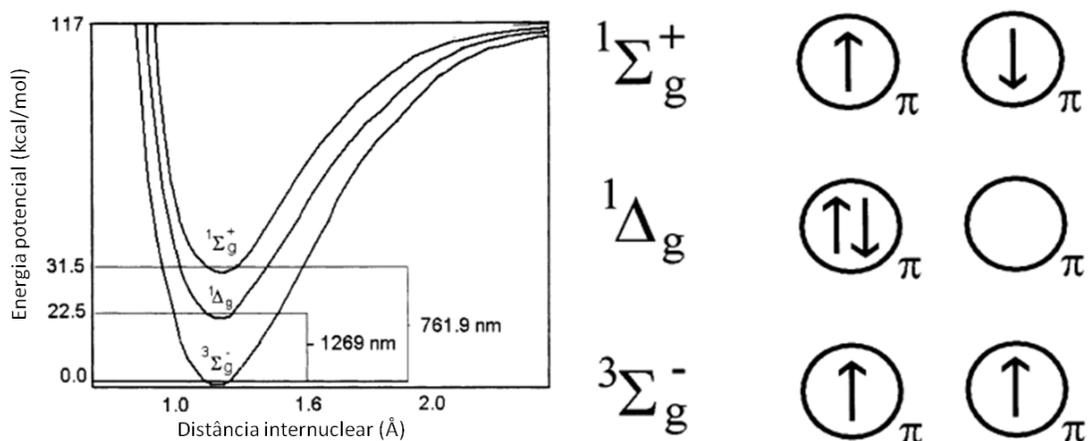


Figura 4. Representação dos três estados energéticos mais baixos do oxigênio molecular (3). À esquerda é mostrado, o gráfico de energia potencial para os três estados energéticos mais baixos do oxigênio molecular e, à direita, representações para os elétrons e seus spins nos dois orbitais antiligantes envolvidos nas transições entre os mesmos três estados. Os dois estados singletes estão representados como  $^1\Delta_g$  (menos energético,  $22.5 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) e  $^1\Sigma_g^+$  (mais energético,  $31.5 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ ), o estado tripleto é representado como  $^3\Sigma_g^-$ .

O  $^1O_2$  reage prontamente com grupamentos nucleofílicos, tais como insaturações carbono-carbono, sulfetos, aminas e ânions, entre outros (3). Assim, são várias as moléculas biológicas suscetíveis às fotorreações do tipo II (Figura 5).



## 1.2 MECANISMOS BIOLÓGICOS DA TERAPIA FOTODINÂMICA ANTINEOPLÁSICA

Durante a aplicação da TFD antineoplásica, os danos oxidativos sofridos pelas células neoplásicas em decorrência das fotorreações induzidas pela TFD (Figuras 1 e 5) não são os únicos responsáveis pela eficácia da TFD (9). Já foi observado que é possível obter células neoplásicas viáveis, clonogênicas, do tecido tumoral imediatamente após este ser submetido à aplicação da TFD (9, 10). Qual, então, a explicação para o alto percentual de cura observado com o tratamento de determinados tumores com a TFD – próximo a 100% em algumas situações (11) –? A resposta vem da complexidade da resposta biológica às fotorreações envolvidas na TFD antineoplásica.

O efeito antineoplásico da TFD é decorrente de três tipos diferentes, mas interrelacionados, de mecanismos biológicos (10): 1) morte da célula neoplásica, por apoptose, necrose ou autofagia, diretamente decorrente dos danos oxidativos gerados pelas fotorreações da TFD; 2) oclusão da vasculatura tumoral, levando ao infarto do tecido neoplásico; e 3) ativação de resposta imunitária contra as células neoplásicas.

## 1.3 FOTOSSENSIBILIZANTES PARA TERAPIA FOTODINÂMICA

Fotosensibilizantes, genericamente, são substâncias que absorvem luz de determinado comprimento de onda e a convertem em energia útil a fotorreações (12). Os FS projetados à TFD devem, especificamente, utilizar essa energia para a produção de agentes citotóxicos. Como o  $^1\text{O}_2$  é o principal agente citotóxico da TFD (4), o desenvolvimento de FS foi, em grande medida, norteado pela produção eficiente daquele agente.

De acordo com DeRosa e Crutchley (2002) (3), o FS ideal para a produção de  $^1\text{O}_2$  deve apresentar as seguintes propriedades: 1) alto coeficiente de extinção molar ( $\epsilon$ ) na região espectral da luz de excitação; 2) no estado tripleto, energia suficiente para excitar o  $^3\text{O}_2$  ao seu estado  $^1\text{O}_2$  ( $E_T \geq 21,5 \text{ kcal.mol}^{-1}$ ); 3) alto rendimento quântico para

a produção do seu estado excitado triplete ( $T_1$ ) ( $\Phi_T > 0,4$ ); 4) vida média longa ( $\tau_T \geq 1 \mu s$ ) no estado triplete excitado; e 5) fotoestabilidade.

No caso da TFD, como o FS é utilizado em sistemas biológicos, além das características citadas acima, o FS ideal deve apresentar ainda (12-14): 1) capacidade de se acumular no sítio-alvo (e.g., tumor); 2) ausência de toxicidade no escuro; 3) alta taxa de depuração do organismo após a aplicação da TFD; 4) ausência de fotossensibilização dérmica; 5) manutenção de suas propriedades fotofísicas e fotoquímicas em meio aquoso; e 6) pureza química.

Outra importante característica esperada para um FS ideal é moldada tanto pelas limitações ópticas de tecidos biológicos quanto pela energia necessária para a ocorrência das fotorreações; o FS deve sofrer excitação com luz de comprimento de onda entre 600 e 800 nm (12, 14). A limitação óptica imposta por tecidos biológicos (Figura 6) decorre tanto da dispersão da luz quanto da presença de altas concentrações de moléculas como a hemoglobina e a mioglobina, as quais absorvem intensamente a luz visível com comprimento de onda inferior a 600 nm (6).

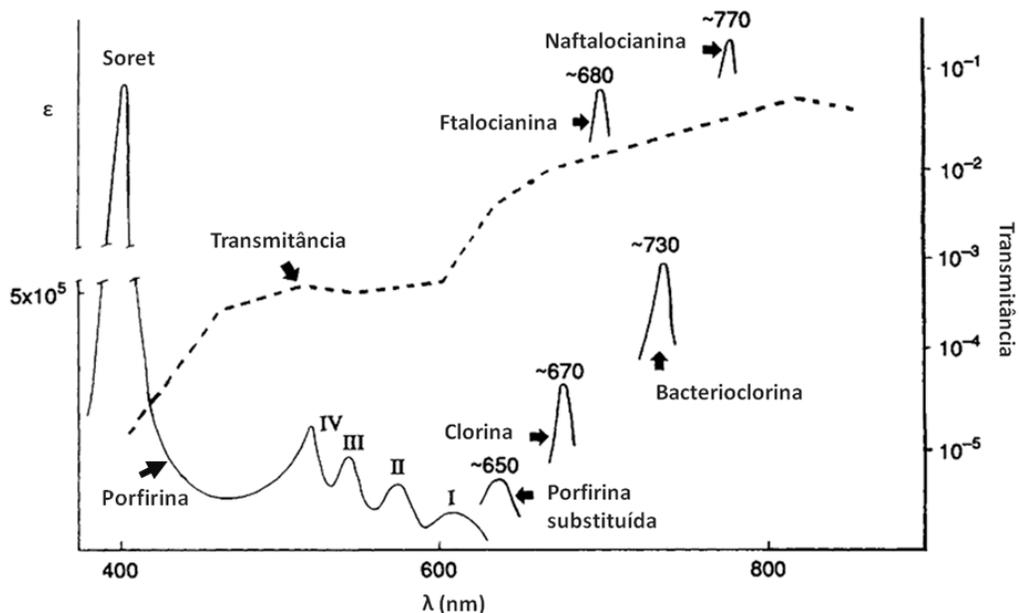


Figura 6. Transmitância de tecido biológico – epitélio de saco escrotal humano, com sete milímetros de espessura – (linha descontinua plotada no eixo Y direito) (15) e coeficiente de extinção molar ( $\epsilon$ ) de diversos fotossensibilizantes (linhas contínuas plotadas no eixo Y esquerdo) em função do comprimento de onda da luz (eixo X) (6). Estão apresentados os máximos de absorção de cada fotossensibilizantes, de maneira esquemática; a única exceção é o espectro de absorção geral da porfirina. Adaptado de (6).

Um experimento elucidativo acerca desta característica óptica de tecidos biológicos mostrou, utilizando músculo bovino, que 37% da luz incidente penetram cerca de quatro milímetros quando o seu comprimento de onda está entre 500 e 600 nm, enquanto que para o comprimento de onda de 800 nm a penetração dobra – oito milímetros – na mesma intensidade de luz (16). O limite superior da janela espectral útil à TFD decorre da energia mínima necessária às fotorreações do tipo II: a energia de fótons de comprimento de onda superiores a 800 nm não é suficiente para produzir  $^1O_2$ , no caso de o FS ser excitado por um único fóton (5). Apesar de não existir uma substância que reúna todas as características ideais listadas acima, existem vários FS para uso em TFD nas diversas fases de testes clínicos (Tabela 1), suportados por resultados encorajadores (12, 13, 17).

Tabela 1 - Indicações clínicas já aprovadas ou em testes pré-aprovação para diversos fotossensibilizantes porfirínicos e relacionados à porfirina para terapia fotodinâmica antineoplásica (18)

Fotossensibilizante	Geração	Indicações e status de aprovação
Photofrin® (porfimerato de sódio)	1ª	Aprovadas: cânceres pulmonares iniciais e avançados, carcinoma estomacal, adenocarcinoma esofágico, displasia e câncer cervicais, carcinoma de bexiga, esôfago de Barrett. Testes Clínicos: câncer intraperitoneal, coloangiocarcinoma, reestenose
ALA (ácido 5-aminolevulínico)	2ª	Aprovadas: queratose actínica, carcinoma basocelular. Testes clínicos: câncer de bexiga, câncer de pênis, gliomas, acne.
Foscan® [meta-tetra(hidroxifenil)clorina]	2ª	Aprovadas: cânceres de cabeça e de pescoço (tratamento paliativo)
Lutex® [texafirina de lutécio(III)]	2ª	Testes clínicos: câncer de próstata e aterosclerose coronariana
NPe6 (clorina-e6, mono-L-aspartila)	2ª	Aprovada: câncer pulmonar inicial
Pc4 (silício-ftalocianina)	2ª	Testes clínicos: linfoma de células T, lesões cutâneas, esterilização de hemoderivados
Photochlor® (pirofeoforbidil-a-hexil-éter)	2ª	Testes clínicos: carcinoma pulmonar, carcinomas do tipo basocelular, esôfago de Barrett
Purlytin (etiopurpurina de estanho)	2ª	Testes clínicos: câncer de próstata, câncer de mama metastático, sarcoma de Kaposi (em pacientes aidéticos)
Tookad (bacteriofeoforbida-a de paládio)	2ª	Testes clínicos: câncer de próstata

Na literatura, os FS são classificados genericamente como não porfirínicos ou porfirínicos (13, 17). Os principais FS de ambas as classes são apresentados na Figura 7. Os FS não porfirínicos são diversos quanto às suas estruturas moleculares, tendo em comum apenas a presença de múltiplas ligações  $\pi$  conjugadas. Os porfirínicos, por sua vez, possuem em comum a presença de 18 a 22 elétrons em ligações  $\pi$  conjugadas em um macrociclo formado por quatro grupos pirrol ligados entre si por pontes metínicas; no caso das ftalocianinas, o macrociclo é formado por quatro grupos isoindol ligados entre si por átomos de nitrogênio (13).



### 1.3.1 Fotossensibilizantes Não Porfirínicos

O desenvolvimento desta classe de FS para a aplicação clínica está consideravelmente defasado em comparação ao dos porfirínicos (17). Abaixo são apresentados os FS mais importantes desta classe.

#### 1.3.1.1 Fenotiazinas

Os principais representantes desta classe são o azul de metileno e o azul de toluidina. O azul de metileno é conhecido na medicina há muito tempo e possui alto rendimento quântico para a produção de  $^1\text{O}_2$ . Entretanto, a dificuldade em fazê-lo atingir altas concentrações em tecidos tumorais é um ponto negativo (19). O azul de toluidina, por outro lado, apresenta significativa seletividade por células tumorais e, apesar de ter sido pouco estudado, as características deste FS o tornam um candidato promissor à TFD antineoplásica (17).

#### 1.3.1.2 Cianinas

Estes FS possuem alta seletividade por células neoplásicas frente a tecidos saudáveis (20). Seu representante mais estudado é a merocianina 540, um FS que apresenta grande eficácia na TFD contra células leucêmicas e de linfoma, sendo bem tolerada por células-tronco e progenitoras hematopoiéticas normais (21).

#### 1.3.1.3 Azidipirrometenos (ou ADPMs)

Este promissor grupo de FS está sendo desenvolvido para o uso em TFD (22). Seus representantes contendo um grupamento do tipo quelato  $\text{BF}_2$  possuem alto

coeficiente de extinção – ca.  $8,0 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  – e absorção máxima entre 650 e 700 nm, comprimentos de onda úteis à TFD (22). Uma característica interessante deste grupo é a possibilidade de modular as propriedades fotofísicas para adequá-las às necessidades do protocolo específico de TFD (17). Por exemplo, foi observado que determinados grupamentos adicionados aos anéis fenila deslocam a banda de absorção de ADPMs, enquanto que a adição de átomos de bromo aos anéis pirrol aumenta o rendimento quântico de produção de  $^1\text{O}_2$  (17).

#### 1.3.1.4 Hipericina

Esta quinona que ocorre naturalmente na planta *Hypericum perforatum* – erva-de-são-jão – apresentou atividade antineoplásica em TFD aplicada em modelos animais (17). Apesar de seu pico de absorção ser em comprimento de onda baixo à TFD – 590 nm –, o alto coeficiente de extinção e a baixa indução de fotossensibilização dérmica apresentados por esta substância a tornam um potencial FS para terapias antineoplásicas (23). No entanto, ainda há carência de estudos clínicos com a hipericina (17).

#### 1.3.2 Fotossensibilizantes Porfirínicos de 1ª Geração

A hematoporfirina (Hp), uma mistura complexa de compostos porfirínicos, foi o primeiro FS desta classe a ser descrito (17). Mais tarde, passos adicionais de purificação e modificação química da Hp levaram à obtenção de um derivado denominado HpD, que apresenta maior afinidade por tecidos neoplásicos e induz menor fotossensibilização dérmica em relação à Hp (6, 24). Posteriormente, uma mistura de dímeros e oligômeros de porfirinas com melhores características para TFD foi isolada a partir do HpD, os quais são conhecidos genericamente como porfimerato de sódio e comercializados sob o nome de Photofrin<sup>®</sup> (6, 24). Hp, HpD e Photofrin<sup>®</sup> são os FS de 1ª geração, dentre os quais o último é o mais conhecido.

O Photofrin<sup>®</sup> é aprovado para o tratamento de diversos tipos de câncer (Tabela 1) e ainda é considerado o padrão-ouro dos FS para TFD (17). Porém, alguns importantes pontos negativos do Photofrin<sup>®</sup> o afastam significativamente das características de um FS ideal, tais quais:

- 1) ao invés de ser uma única molécula, o Photofrin<sup>®</sup> é uma mistura de mais de 60 substâncias, muitas das quais ainda nem sequer foram caracterizadas, tornando a padronização desta mistura difícil;
- 2) seu uso é associado à indução de fotossensibilização dérmica intensa e duradoura, entre 2 e 3 meses, efeito colateral relacionado principalmente ao seu longo tempo de meia-vida, cerca de 452 h;
- 3) baixo coeficiente de extinção molar ( $1,17 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ), o que torna necessária a administração de altas doses para que este FS seja eficaz;
- 4) seu pico de absorção útil à TFD – 630 nm – é muito próximo ao limite inferior imposto pela absorbância de tecidos biológicos (12, 17, 25, 26).

Esses pontos negativos apresentados pelo Photofrin<sup>®</sup> fizeram com que a busca por novos FS fosse intensa, originando a 2ª geração de FS (12, 17), apresentados na sequência.

### 1.3.3 Fotossensibilizantes Porfirínicos de 2ª Geração

A partir da década de 1980 foi iniciada uma busca sistemática por compostos que não apresentassem as características indesejáveis das porfirinas de 1ª geração (6, 12). Os critérios então utilizados para desenvolver novos FS foram muito bem descritos por Bonnett, um dos principais envolvidos neste evento (6). As características dos compostos que foram frutos destes esforços seminais, quando comparadas às de seus antecessores, se aproximam significativamente do esperado para um FS ideal (6, 13, 17). Em geral, os compostos de 2ª geração apresentam as seguintes características (12, 13, 17):

- 1) pureza química;

- 2) picos de absorção mais próximos ao vermelho/infravermelho próximo;
- 3) alto coeficiente de extinção;
- 4) alta fotoestabilidade;
- 5) alto rendimento quântico para produção de  $^1\text{O}_2$ ;
- 6) propriedades farmacocinéticas que reduzem os efeitos colaterais.

Alguns deles estão sendo utilizados em testes clínicos até fase III enquanto outros já foram aprovados para TFD em humanos (Tabela 1) (13, 18). Abaixo são descritos alguns representantes dessa classe, com maior ênfase ao grupo das ftalocianinas.

#### 1.3.3.1 Metaloporfirinas (ou Texafirinas)

Este grupo é constituído por compostos formados por um macrociclo porfirínico e um átomo metálico grande, tais como o gadolínio ou o lutécio, complexado em seu centro (27). O principal representante deste grupo é a texafirina de lutécio (III), comercialmente conhecida como Lutrin<sup>®</sup> ou Lutex<sup>®</sup>, um FS hidrossolúvel com grande afinidade por tecidos tumorais e que possui um pico de absorção de luz em 732 nm (13). Um ponto negativo deste FS é o seu baixo rendimento quântico para produção de  $^1\text{O}_2$  (13).

#### 1.3.3.2 Porfícenos

Esta classe é constituída por isômeros de porfirina obtidos pela modificação do arranjo das porções metínicas e pirrólicas do macrociclo porfirínico (28). Possuem características fotofísicas e fotoquímicas semelhantes às das porfirinas de 1ª geração, mas por terem uma estrutura que permite a sua funcionalização com grupamentos diversos, suas propriedades farmacocinéticas podem ser reguladas de maneira a evitar os efeitos adversos relacionados àquelas – tais como a fotossensibilização dérmica –

(17). Um representante desta classe é o tetra-n-propilporfíceno, um FS que possui grande afinidade por células neoplásicas e baixo potencial de fotossensibilização dérmica (29).

#### 1.3.3.3 Feoforbídeos

Estes FS são macrociclos porfirínicos obtidos de clorofila ou de moléculas similares à clorofila, tais como a clorofila bacteriana – BChl – (17). O bacteriofeoforbídeo comercialmente conhecido como Tookad<sup>®</sup> é o composto mais estudado deste grupo. O seu alto coeficiente de extinção em comprimento de onda de luz de 732 nm, a sua grande afinidade por células tumorais e a sua rápida depuração do organismo, além de resultados positivos em testes pré-clínicos, estimularam o desenvolvimento de ensaios clínicos com TFD utilizando este composto, especialmente contra câncer de próstata (17, 30, 31). Os resultados mostram que o Tookad<sup>®</sup> possui grande potencial para ser utilizado em TFD antineoplásica.

#### 1.3.3.4 Purpurinas

Os FS deste grupo possuem um macrociclo porfirínico conjugado com um anel ciclopentenílico, o que faz estas substâncias absorverem fortemente luz em comprimentos de onda entre 650 e 715 nm (32). Um importante exemplo de FS derivado de purpurina é a etiopurpurina de estanho, comercialmente conhecida como Purlytin<sup>®</sup> (13, 17). Uma característica marcante do Purlytin<sup>®</sup> é o seu alto rendimento quântico para a produção de  $^1\text{O}_2$  – aproximadamente 20 vezes maior que o do Photofrin<sup>®</sup> (13). Este FS vem sendo testado em diferentes estudos clínicos quanto à sua atividade antineoplásica (17).

#### 1.3.3.5 Clorinas

Em comparação às porfirinas, as clorinas são reduzidas, pois possuem uma dupla ligação a menos em seu macrociclo tetrapirrólico básico (32), uma característica que provoca um deslocamento batocrômico em seu pico de absorção na janela espectral útil à TFD em relação às primeiras (6). Um importante representante desta classe, a meso-tetra(hidroxifenil)clorina (mTHCP, Foscan®), é um dos mais potentes FS de 2ª geração, aprovado na Europa para o tratamento paliativo de cânceres de cabeça e de pescoço (18), mas que, tal como o Photofrin®, induz prolongada fotossensibilização dérmica (17).

#### 1.3.3.6 Precusores de Protoporfirina IX

Estes fármacos, quando na célula-alvo, entram na rota biossintética do heme, sendo então convertidos ao FS protoporfirina IX (PpIX) (13). Dois fármacos desta classe estão aprovados para o uso em humanos: ácido 5-aminolevulínico (Levulan®) e o aminolevulinato de metila (Metvix®) (17). Quando estes precursores são aplicados em células neoplásicas epidérmicas, o FS PpIX resultante se acumula preferencialmente nestas (17). Além disto, células epidérmicas neoplásicas produzem PpIX mais intensamente em relação às células epidérmicas normais (17). A TFD baseada nestes fármacos aplicados topicamente vem sendo a principal linha de tratamento de cânceres de pele não-melanomas em um número crescente de países (13, 33).

#### 1.3.3.7 Ftalocianinas

Estes FS de 2ª geração, estruturalmente relacionados às porfirinas, foram descritos pela primeira vez há mais de um século, e são utilizados há muito tempo pelas indústrias de produtos têxteis, eletrônicos e fotográficos (6, 17). Nas últimas

décadas, porém, as ftalocianinas vêm atraindo muita atenção na área de TFD devido às suas excepcionais propriedades fotoquímicas e fotofísicas (6, 17).

Além das características inerentes aos FS de 2ª geração, as ftalocianinas apresentam ainda (14, 17, 34, 35):

- 1) coeficiente de extinção molar maior que  $2,5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  – cerca de 100 vezes maior em relação ao apresentado por FS de 1ª geração e até 10 vezes maior em relação ao apresentado pelos de 2ª geração –;
- 2) eficiente e rápida captação por células neoplásicas;
- 3) longo tempo de retenção por células neoplásicas;
- 4) estado triplete de longa vida.

Apesar de vários estudos pré-clínicos e clínicos com TFD antineoplásica baseada em ftalocianinas terem apresentado resultados promissores (17), inclusive para o tratamento de linfoma cutâneo de células T (36), a sua aplicação em sistemas biológicos tem sido limitada por uma de suas características químicas mais marcantes, a alta hidrofobia.

Essa característica confere às ftalocianinas propriedades farmacocinéticas inconvenientes e leva à formação de agregados em ambientes aquosos, reduzindo consideravelmente a sua atividade fotodinâmica por meio do efeito de extinção (*quenching*, em inglês) (37, 38). Desta maneira, têm sido procuradas soluções para contornar estes problemas (17).

Uma alternativa na qual vários pesquisadores têm investido seus esforços é a obtenção de derivados hidrossolúveis de ftalocianinas por meio da ligação de grupos hidrofílicos ou anfifílicos à estrutura destas, com o intuito de tornar estes derivados compatíveis com meios biológicos e reduzir a sua propensão em formar agregados (37). Porém, o problema da agregação em meios aquosos não foi totalmente resolvido com esta abordagem (37, 38). Além disso, a velocidade/grau de captação e o tempo de retenção destes derivados hidrofílicos de ftalocianinas em células neoplásicas são sensivelmente inferiores se comparados às de seus análogos hidrofóbicos, o que prejudica a eficácia destes compostos na TFD (6, 34).

Um estudo muito elucidativo quanto ao efeito da redução da hidrofobia de ftalocianinas sobre a sua farmacocinética e captação/retenção celular foi publicado em 1990 por Chan e colaboradores, os quais utilizaram derivados sulfonados de alumínio-ftalocianina (35). Nesse estudo, foi observado que os derivados de ftalocianina menos sulfonados – mais hidrofóbicos – apresentavam tanto a eficiência quanto a velocidade de captação por células neoplásicas (Colo 26), *in vitro*, maiores em relação aos derivados mais sulfonados (35). Porém, nos ensaios *in vivo*, após administração intravenosa, a maior hidrofobia dos derivados menos sulfonados fazia com que estes fossem captados do sangue mais rapidamente, principalmente pelo fígado e pelo baço. Os autores sugeriram que este evento é uma consequência da ação de macrófagos (35), visto que células da linhagem monocítica têm grande capacidade de captar ftalocianinas hidrofóbicas (39).

Outros estudos demonstraram resultados similares aos expostos acima (40-43). Desta maneira, a modificação da molécula de ftalocianina traz novos problemas enquanto soluciona outros (Figura 8). O caráter altamente hidrofóbico das ftalocianinas faz com que elas se agreguem em meio aquoso com perda de atividade fotodinâmica (37, 38) e ainda se distribuam amplamente pelo organismo, podendo atingir concentrações maiores em tecidos saudáveis, tais como o do fígado e do baço, do que no tecido neoplásico (35, 43). Por outro lado, é a própria hidrofobia que faz com que as ftalocianinas sejam rápida e intensamente captadas e, retidas por longo tempo, por células neoplásicas (35, 41).

Assim, devido à necessidade de manter, em uma mesma composição, a hidrofobia das ftalocianinas, uma alta atividade fotodinâmica em ambiente aquoso e ainda uma maior captação destes FS pelo tecido neoplásico, foi iniciada uma busca por transportadores, carreadores, deste fármaco (44). Essa busca também aconteceu para muitos outros FS de 2ª geração que apresentavam as mesmas características das ftalocianinas, dando origem à 3ª geração de FS (44).

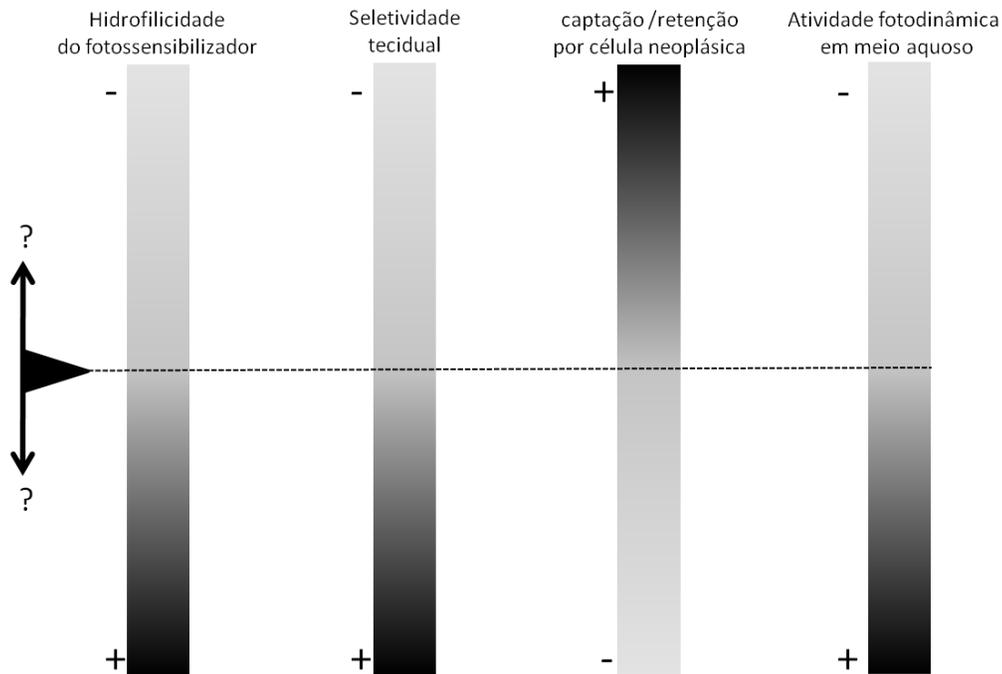


Figura 8. A alteração da hidrofiliicidade das moléculas de ftalocianinas não é a melhor forma de aproximá-las do conceito de fotossensibilizante ideal. Algumas características desejáveis emergem de sua hidrofobia, marcadamente a captação e a retenção por células neoplásicas. Por outro lado, a hidrofobia é responsável pela extinção de sua atividade fotodinâmica em meios aquosos e pela biodistribuição desfavorável aos protocolos de terapia fotodinâmica antineoplásica.

#### 1.3.4. Fotossensibilizantes Porfirínicos de 3ª Geração

Esta classe consiste de FS associados, covalentemente ou não, a carreadores que mantêm a atividade destes fármacos em meio aquoso e que aumentam o seu direcionamento ao sítio-alvo da TFD (17). Diferentes estratégias foram utilizadas para dar origem a estes novos compostos. Entre elas a conjugação de FS a anticorpos anti-antígenos tumorais (45), a ligantes de receptores super-expressos em células neoplásicas, a peptídeos catiônicos – como o peptídeo TAT – (13), ou mesmo a associação desses FS a carreadores nanoestruturados, como lipossomos e micelas poliméricas (46, 47). Exemplos destas composições são as clorinas conjugadas a imunoglobulinas G ou ao ácido fólico, as porfirinas conjugadas ao peptídeo TAT do HIV, as ftalocianinas associadas a lipossomos e as ftalocianinas dendriméricas associadas a micelas poliméricas (13, 17, 34, 47-49).

Conforme será exposto na sequência, dentre as várias plataformas utilizadas para originar os compostos desta classe, as nanotecnológicas têm possibilitado a melhora simultânea de algumas propriedades dos FS, marcadamente as suas propriedades fotofísicas e fotoquímicas em meio aquoso e o direcionamento sítio-específico.

#### 1.4 PLATAFORMAS NANOTECNOLÓGICAS PARA TERAPIA FOTODINÂMICA

Algumas importantes limitações apresentadas por determinados fármacos podem ser solucionadas com abordagens nanotecnológicas, sem necessariamente envolver mudanças químicas na estrutura destes. Desta maneira, as nanopartículas vêm sendo alvo de pesquisas que visam ao aprimoramento farmacodinâmico e farmacocinético de moléculas bioativas já há muito tempo conhecidas na medicina (50). Vários carreadores de fármaco nanoestruturados foram aprovados para o uso clínico, inclusive para terapias antineoplásicas (51).

As nanopartículas usadas com propósitos farmacêuticos são definidas pela *Encyclopedia of pharmaceutical technology* (52) e pela *Encyclopedia of nanoscience and nanotechnology* (53) como partículas coloidais sólidas com diâmetro que varia entre 1 e 1000 nm, sendo mais comuns as que têm diâmetro em torno de 200 nm (54). Estas nanoestruturas são materiais macromoleculares aos quais fármacos podem ser incorporados sob diferentes maneiras – dissolvidos, encapsulados, adsorvidos, ligados, etc. – (50). A *Encyclopedia of pharmaceutical technology* classifica as nanopartículas como nanoesferas ou nanocápsulas (Figura 9) (54).

As primeiras nanopartículas foram desenvolvidas na década de 1970 (54) e empregadas como carreadores de fármacos em terapias antineoplásicas experimentais a partir do início da década de 1980 (55). Já nesses primeiros experimentos foi demonstrado que estes sistemas nanoestruturados possibilitavam aumentar a eficácia e a eficiência de fármacos clássicos, além de reduzir os seus efeitos colaterais (50, 55, 56). Naquela época, esses achados foram prontamente relacionados ao então já

conhecido fenômeno de “permeação e retenção aumentadas” (EPR, sigla inglesa), que propicia o acúmulo passivo de nanopartículas em células tumorais (57).

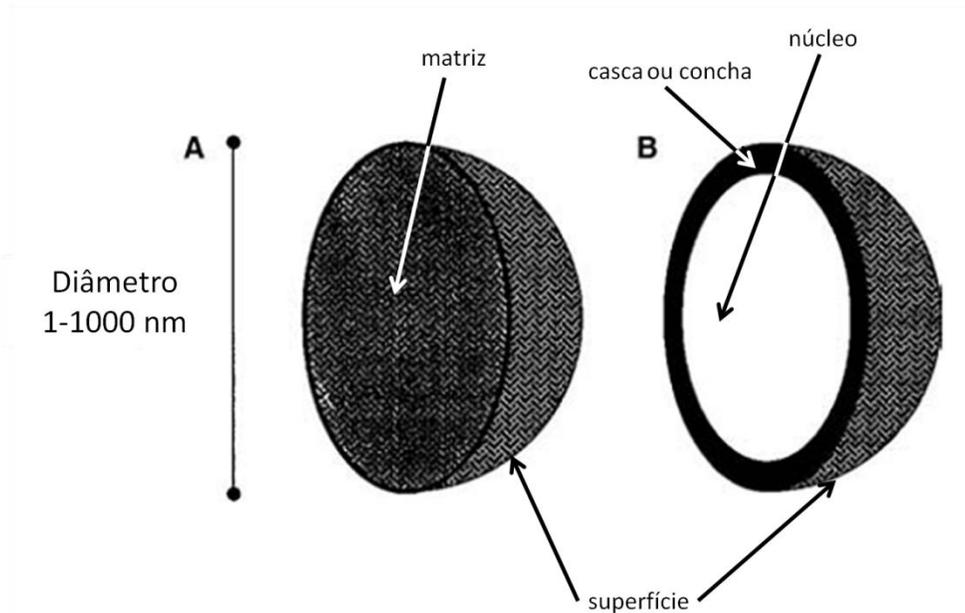


Figura 9. Estrutura básica de nanopartículas: nanoesfera (A) e nanocápsula (B). As setas indicam os diferentes sítios destas estruturas (54).

Mais recentemente, têm sido aplicados esforços no sentido de desenvolver carreadores dotados da propriedade de acumular-se ativamente nos sítios-alvo das terapias antineoplásicas (58). Desta maneira, as nanopartículas podem aumentar a eficiência da captação de fármacos pelo tumor como decorrência de dois principais eventos:

- *O direcionamento passivo pelo tamanho da nanopartícula*, que é possível graças ao fenômeno de EPR, devido a defeitos na arquitetura microvascular de tecidos tumorais (59). Os capilares sanguíneos tumorais possuem fenestras com diâmetro entre 200 e 780 nm (59), muito maiores do que as dos capilares de tecidos saudáveis, com diâmetro em torno de 6 nm (60). Desta maneira, foi experimentalmente observado que a vasculatura tumoral permite o acúmulo de nanopartículas com diâmetro até 400 nm no tecido tumoral (61). Além disso, a drenagem linfática tumoral é ineficiente, o que aumenta o tempo de permanência de nanopartículas no tecido tumoral (58).

- *O direcionamento ativo de nanopartículas ao sítio tumoral*, já que nanopartículas podem ter sua superfície modificada de maneira a aumentar a sua afinidade por células neoplásicas (58). Dependendo da sua estrutura química de superfície, as nanopartículas podem ser recobertas com moléculas direcionadoras, que aumentam a afinidade da nanoestrutura às células tumorais, tais como anticorpos, peptídeos catiônicos e ligantes de receptores de membrana (49, 58, 62).

Além da entrega de fármacos ao sítio-alvo, os sistemas nanoestruturados oferecem ainda a possibilidade de melhorar a compatibilidade de fármacos hidrofóbicos com meios aquosos, prolongar o seu tempo de circulação na corrente sanguínea, minimizar a sua degradação após a administração em sistemas biológicos, regular a sua biodisponibilidade, através da liberação controlada, por exemplo, além de reduzir efeitos colaterais do fármaco (51, 59, 62).

O desenvolvimento de FS de 3ª geração baseados em plataformas nanotecnológicas surgiu há apenas duas décadas (59). Contudo, apenas nos últimos 5 anos é que a busca por nanoestruturas para TFD vem experimentando um crescimento exponencial (Figura 10) (63). O interesse é crescente porque o uso de plataformas nanotecnológicas para TFD antineoplásica propicia vantagens que não são observadas com as plataformas convencionais até então utilizadas para o desenvolvimento de FS de 3ª geração.

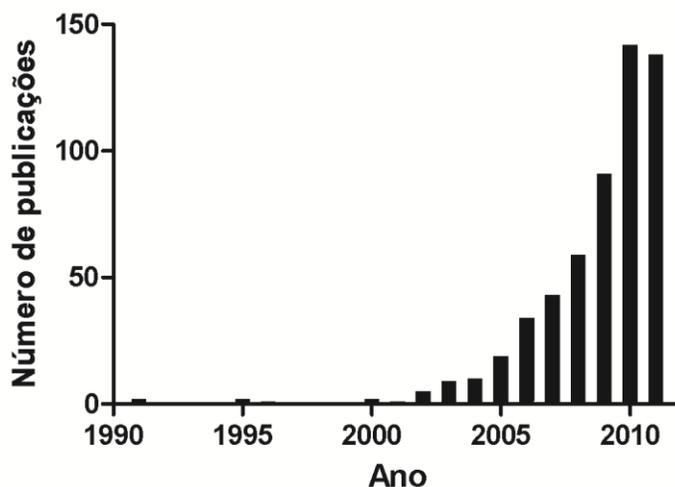


Figura 10. Número de publicações contendo todos os termos “nanoparticles”, “photodynamic therapy”. Pesquisa realizada em 19 de outubro de 2011 (63).

Os sistemas nanoestruturados oferecem, além de todas as vantagens acima descritas, a possibilidade de manter a atividade dos FS em meios aquosos (49, 59, 64); FS têm sido associados com sucesso a diferentes nanopartículas, tais como nanopartículas de ouro (65), nanopartículas de sílica (66) ou nanopartículas poliméricas (67). Os resultados obtidos com essas nanoestruturas mostram que é possível, com a nanotecnologia, melhorar tanto a farmacocinética quanto as características fotofísicas e fotoquímicas de FS que até então apresentavam limitações à sua aplicação clínica em TFD antineoplásica (47, 49, 58, 66, 68-70).

Apesar de os lipossomos serem as plataformas nanotecnológicas mais estudadas em TFD (49), a dificuldade em promover a captação de FS com estas nanoestruturas (70) têm promovido estudos com outras nanopartículas. Dentre essas, as nanopartículas poliméricas têm demonstrado características que as colocam no rol de potenciais carreadores ideais de FS. Dentre suas características, podem ser destacadas:

- 1) a capacidade de manter a atividade fotodinâmica de FS altamente hidrofóbicos, tais como as ftalocianinas (71) e as clorinas (68), em meio aquoso;
- 2) a possibilidade de controlar finamente a liberação do FS (70);
- 3) a maleabilidade da sua estrutura química e tridimensional dos polímeros, o que possibilita adaptá-las a FS com diferentes graus de hidrofobicidade, massas moleculares ou cargas iônicas (70);
- 4) apresentar uma superfície maleável, que permite maior bioadesividade e/ou direcionamento ativo ao sítio-alvo (49, 51, 59, 70).

Até o momento, poliésteres tais como o poli(ácido lático-co-glicólico) (PLGA) e o poli(ácido lático) (PLA) têm sido os mais utilizados para produzir nanopartículas a serem utilizadas na TFD (59, 70, 72), apresentando bons resultados.

Porém, mesmo as nanopartículas poliméricas convencionais têm apresentado alguns inconvenientes, tais como a perda de atividade fotodinâmica após a desintegração da nanopartícula e a dificuldade em promover a captação do FS pela célula-alvo (59, 73). Assim, a necessidade de desenvolver novos fotossensibilizantes de 3ª geração justifica esta pesquisa.

## 2 OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo geral o desenvolvimento de uma formulação constituída de cloreto de alumínio-ftalocianina associado a nanopartículas poliméricas, com potencial para ser utilizada como fotossensibilizante de terceira geração para terapia fotodinâmica antineoplásica.

Os objetivos específicos foram os seguintes:

- desenvolver nanopartículas bioadesivas, funcionalizáveis, cuja matriz seja composta por poli(vinil,metil-éter-co-anidrido maleico) (PVM/MA), e com diâmetro hidrodinâmico menor que 400 nm, útil ao direcionamento passivo a tumores;
- associar às nanopartículas o cloreto de alumínio-ftalocianina, AIFtCl, de maneira a manter a sua atividade fotodinâmica em meio aquoso;
- avaliar as características coloidais – potencial zeta, diâmetro hidrodinâmico e índice de polidispersão – e morfológicas – forma e aspecto da superfície –;
- avaliar as propriedades fotofísicas – espectros de fluorescência e absorvância – e fotoquímicas – produção fotoativada de oxigênio singlete –, do AIFtCl associado às nanopartículas, AIFtCl-NP;
- verificar o perfil e o mecanismo de desintegração do AIFtCl-NP;
- avaliar a estabilidade do AIFtCl-NP congelado;
- verificar o perfil de incorporação do AIFtCl-NP por células neoplásicas e não neoplásicas;
- analisar o perfil de distribuição celular do AIFtCl-NP em células neoplásicas;
- verificar a citotoxicidade fotodinâmica do AIFtCl-NP em células neoplásicas e não neoplásicas;
- avaliar se a TFD com AIFtCl-NP induz fragmentação de DNA em células neoplásicas.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 MATERIAIS

O copolímero poli(vinil,metil-éter-co-anidrido maleico) (PVM/MA; Gantrez AN 119<sup>®</sup>) foi gentilmente doado pela ISP Brasil (ISP Corporation<sup>®</sup>, Brasil). Meio de cultura DMEM (HyClone<sup>®</sup>, Logan, Utah, USA); penicilina, estreptomicina e soro fetal bovino (Gibco<sup>®</sup>, USA). Mistura para o preparo de solução salina tamponada com fosfato (PBS, Laborclin<sup>®</sup>, Brasil). Dimetilsulfóxido (DMSO), acetona P.A., etanol P.A. e etanol 99 % (Vetec<sup>®</sup>, Brasil). Linhagem celular de fibroblasto (NIH 3T3, obtida da coleção do banco de células do Rio de Janeiro, RJBC, Brasil) e linhagem de células neoplásicas de mama murina (4T1, cedidas por Dra. Suzanne Ostrand-Rosenberg, Maryland, EUA). Os outros materiais utilizados neste trabalho foram obtidos da Sigma (Brasil).

#### 3.2 DESCRIÇÃO GERAL DO PROTOCOLO DE PREPARO DE AIFtCI ASSOCIADO A NANOPARTÍCULAS DE PVM/MA

As nanopartículas foram obtidas por meio do processo de nanoprecipitação, também conhecido como método da dessolvatação ou método ouzo, descrito por Gomez e colaboradores (74), cujas etapas estão didaticamente apresentadas na Figura 11 e descritas a seguir.

Na etapa 1, a uma solução do copolímero PVM/MA em acetona foram adicionados etanol, água e Tween 20, nesta sequência e sob agitação branda. Os volumes de etanol e de água adicionados eram o dobro da quantidade inicial de acetona, para que o PVM/MA fosse insolúvel no meio formado; esta mistura de solventes é chamada, ao longo do texto, de meio precipitante. Assim, para uma faixa específica de concentração inicial do copolímero, formou-se um colóide levemente opaco composto de nanoprecipitados de PVM/MA; as nanopartículas formadas nesta etapa são denominadas, ao longo deste trabalho, de nanopartículas puras.

Na etapa 2, foi adicionado ao colóide de nanopartículas puras, sob agitação branda, uma solução etanólica de AIFtCl. Na etapa seguinte, etapa 3, esta mistura foi mantida por dez minutos sob agitação branda e temperatura ambiente, para que ocorresse a associação do AIFtCl às nanopartículas. Na etapa 4 os solventes orgânicos foram removidos por destilação a pressão reduzida, restando assim uma suspensão aquosa de nanopartículas associadas ao AIFtCl, formando o AIFtCl-NP. Na sequência, etapa 5, para eliminar resíduos tais como o AIFtCl livre e o Tween 20, a suspensão foi centrifugada, o decantado foi ressuspenso com água destilada. Na sequência a suspensão foi novamente centrifugada e o decantado foi ressuspenso em PBS (solução aquosa de NaCl 0,80 %, KCl 0,02 %,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,012 % e  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  0,23 %, pH 7,4). Desse modo restou apenas o colóide de AIFtCl em PBS, AIFtCl-NP/PBS.

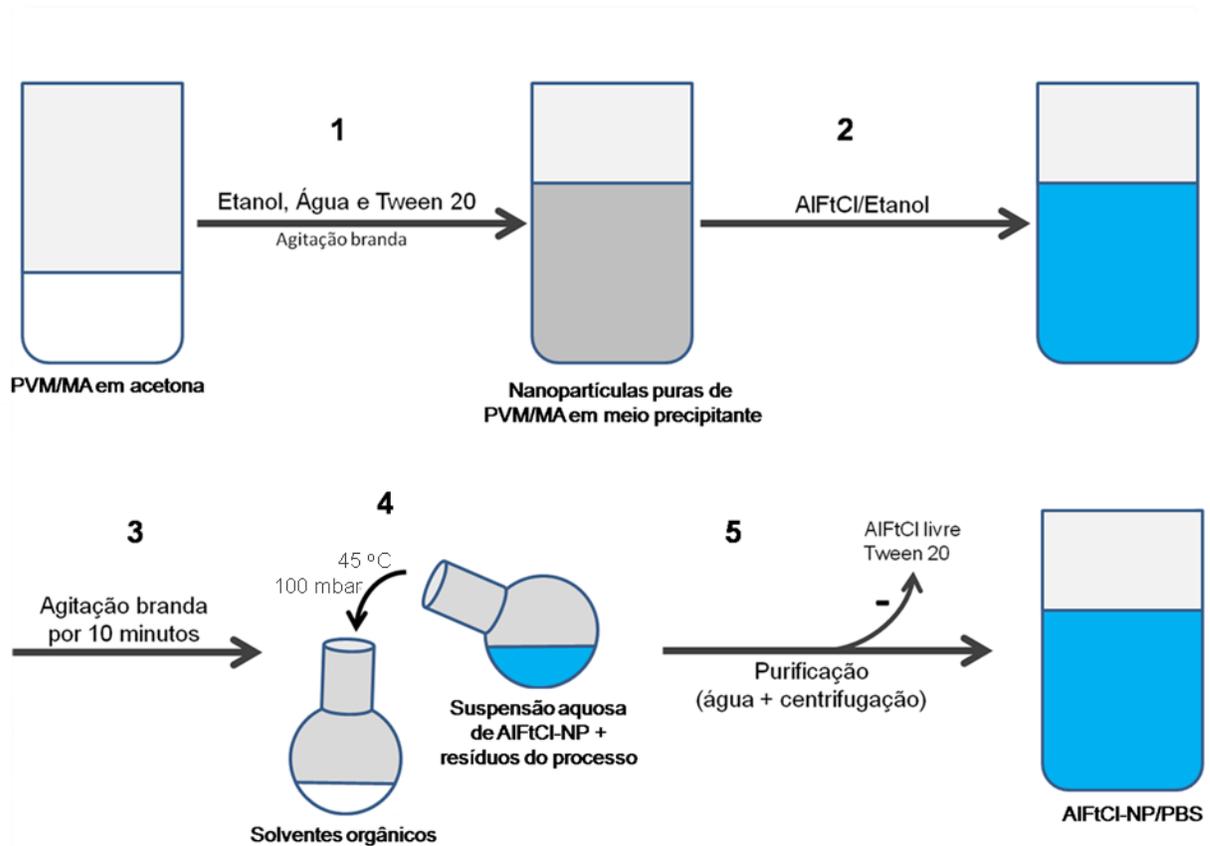


Figura 11. Método de preparo de nanopartículas de poli(vinil,metil-éter-co-anidrido maleico) (PVM/MA) associadas ao cloreto de alumínio-ftalocianina (AIFtCl). AIFtCl-NP = AIFtCl associado a nanopartículas de PVM/MA.

### 3.3 PADRONIZAÇÃO DO PROTOCOLO DE PREPARO DAS NANOPARTÍCULAS

Foram analisadas as influências exercidas por algumas importantes variáveis do processo de preparo descrito acima sobre as características da formulação. Essas variáveis relacionam-se às propriedades coloidais, fotoquímicas e fotofísicas da formulação final, AIFtCl-NP. Os testes realizados com estas variáveis estão descritos nesta seção.

#### 3.3.1 Dosagem de AIFtCl

Para mensurar a concentração do AIFtCl em amostras de nanopartículas, o AIFtCl foi extraído com etanol na proporção de 1:20 nanossuspensão/PBS:etanol (v:v) por 15 minutos, sob temperatura ambiente, e a fluorescência da solução resultante foi determinada com comprimento de onda de luz ( $\lambda$ ) de excitação de 350 nm e  $\lambda$  de emissão de 680 nm. Este valor de fluorescência foi utilizado para calcular a concentração de AIFtCl com a fórmula da curva-padrão, obtida com diversas concentrações de AIFtCl em etanol 99 % ( $r^2 > 0,999$  entre 0,15 e 5,0  $\mu\text{M}$ ).

#### 3.3.2 Espectros de Fluorescência e de Absorbância na Região Visível do Espectro Eletromagnético

Os espectros de fluorescência e absorbância na região visível do espectro eletromagnético foram traçados com o AIFtCl livre ou associado às nanopartículas de PVM/MA. Para tanto, 200  $\mu\text{L}$  de solução ou suspensão de AIFtCl 10  $\mu\text{M}$  foram colocados em microplacas de 96 poços, transparentes (para absorbância) ou pretos opacos (para fluorescência). A absorbância foi mensurada entre os  $\lambda$  de 360 e 750 nm, com resolução de 2 nm. A fluorescência foi mensurada sob excitação com  $\lambda$  de 350 nm e emissão entre  $\lambda$  de 360 e 750 nm ou 600 e 750 nm, com resolução de 2 nm. Todas

as medidas foram realizadas sob temperatura de 25 °C em espectrofotômetro leitor de microplacas (SpectraMax M2®).

O PBS foi utilizado como suspensor para as nanopartículas, enquanto as soluções de AlFtCl foram preparadas em diferentes solventes: etanol, água destilada, meio precipitante (acetona:etanol:água, 1:2:2, v:v:v), Tween 20 puro, Tween 80 puro ou soluções aquosas de Tween 20 (10,0, 4,0 ou 1,4 %, m:v). Os resultados foram expressos como unidades arbitrárias de fluorescência (U.A.) ou como fluorescência normalizada – obtida por tratamento matemático que consiste da divisão de todos os valores de fluorescência, em U.A., pelo maior valor dentre as populações de dados –.

### **3.3.3 Efeito da Concentração de PVM/MA sobre o Diâmetro Hidrodinâmico, o Potencial Zeta e a Polidispersão das Nanopartículas**

A concentração inicial do copolímero em solução afeta sobremaneira algumas importantes propriedades do colóide obtido pelo método de nanoprecipitação (75, 76). Assim, para testar o efeito desta variável sobre o processo, a nanoprecipitação foi conduzida conforme o representado na Figura 11, sob diferentes concentrações iniciais do copolímero. O PVM/MA foi dissolvido em acetona P.A. em diferentes concentrações: 10, 20, 30, 40, 60 e 80 mg/mL. Na sequência, a 2 mL de cada uma destas soluções de copolímero foram adicionados 4 mL de etanol, 3 mL de água destilada e 1 mL de Tween 20 14 % (m:v, em água), nesta sequência e sob agitação branda. Neste passo foram formadas suspensões coloidais do copolímero, às quais foram então adicionados 330 µL de etanol. As suspensões foram mantidas sob agitação branda por 10 minutos e, logo após, os solventes orgânicos foram removidos sob pressão reduzida e a 45 °C em rota-evaporador (Rotavapor RII®, Büchi). O volume da suspensão foi completado com água destilada para 4 mL e as nanopartículas foram lavadas duas vezes com 4 mL de água destilada por meio de centrifugação (22000 × *g* por 20 minutos). Finalmente, as nanopartículas foram ressuspensas em 2 mL de PBS e imediatamente analisadas quanto ao seu potencial zeta, índice de polidispersão (PDI) e diâmetro hidrodinâmico (seção 3.5.4). Estas variáveis foram representadas graficamente em função da concentração de PVM/MA (mg/mL) em acetona.

### **3.3.4 Influência da Concentração do Surfactante Tween 20 no Meio Precipitante sobre a Fluorescência e a Perda de AIFtCl durante o Processo de Preparo das Nanopartículas**

O presente ensaio foi realizado com o intuito de verificar qual a melhor faixa de concentração de Tween 20 para a associação do AIFtCl às nanopartículas. Para isolar o efeito do Tween 20, este ensaio foi realizado na ausência do copolímero PVM/MA.

Para este experimento, amostras de 10 mL do meio precipitante (acetona:etanol:água, 1:2:2, v:v:v) sem copolímero PVM/MA foram preparadas com diferentes concentrações finais de Tween 20 (entre 0 e 4 %, m:v). Sob agitação branda foram adicionados, a cada amostra, 330  $\mu$ L de solução etanólica de AIFtCl 300  $\mu$ M. Após dez minutos sob agitação, 200  $\mu$ L das soluções resultantes foram separados para mensuração da fluorescência (excitação em 350 nm, emissão em 690 nm). Os solventes orgânicos foram removidos do volume restante sob pressão reduzida e temperatura de 45 °C. O volume foi então completado com água para 3,8 mL, homogeneizado, e uma alíquota de 200  $\mu$ L foi separada para mensuração da fluorescência (excitação em  $\lambda$  de 350 nm, emissão em  $\lambda$  de 690). O volume restante foi centrifugado (22000  $\times$  g por 20 minutos a 4 °C), o sobrenadante foi descartado e o AIFtCl decantado foi dissolvido em 2 mL de etanol e dosado de acordo com o procedimento descrito na seção 3.3.1. Tanto a porcentagem de AIFtCl decantado após a centrifugação quanto os valores de intensidade de fluorescência foram plotados em função da concentração de Tween 20 no meio precipitante.

### **3.3.5 Eficiência de Associação e Rendimento Quântico de Fluorescência em Função da Concentração de AIFtCl no Meio Precipitante**

Este ensaio foi realizado para verificar o efeito da concentração do AIFtCl sobre a eficiência de associação do AIFtCl às nanopartículas de PVM/MA e sobre a intensidade de fluorescência da formulação final. Para tanto, amostras de 5 mL de suspensão de nanopartículas puras em meio precipitante foram preparadas de acordo

com o procedimento descrito na seção 3.4.1 e na sequência foi adicionado, sob agitação branda, 0,5 mL de solução etanólica de AlFtCl em diferentes concentrações (12, 24, 48, 96, 192 e 384  $\mu\text{M}$ ). Após 10 minutos de agitação, os solventes orgânicos foram removidos, o volume foi completado para 2 mL com água destilada e as nanopartículas lavadas duas vezes com água destilada. Finalmente, as nanopartículas foram ressuspensas em 0,5 mL de PBS e a concentração de AlFtCl foi mensurada nesta suspensão de acordo com o procedimento descrito na seção 3.3.1. Todas as amostras foram então diluídas com PBS para a concentração final de 1  $\mu\text{M}$  de AlFtCl e 200  $\mu\text{L}$  destas suspensões foram utilizados para medir a intensidade de fluorescência (excitação em  $\lambda$  de 350 nm, emissão em  $\lambda$  de 690 nm). Os resultados estão apresentados como eficiência de incorporação e como rendimento quântico de fluorescência ( $\Phi\text{F}$ ) normalizado, ambos em função da concentração inicial de AlFtCl no meio precipitante.

O  $\Phi\text{F}$  normalizado foi calculado a partir da intensidade de fluorescência, de acordo com o seguinte procedimento:

$$1) \quad \Phi\text{F} = F \times (I.\text{Abs}.G)^{-1}$$

onde,

$F$  = intensidade de fluorescência

$I$  = intensidade da luz de excitação

$\text{Abs}$  = absorvância da substância no comprimento de onda de excitação

$G$  = fator da geometria do sistema, sempre menor que 1, decorrente do fato de que nem toda a fluorescência é detectada

- 2) Como o  $\Phi\text{F}$  de uma amostra  $x$ , obtido a partir de sua intensidade de fluorescência  $F_x$ , foi normalizado em relação ao maior valor obtido no experimento,  $F_{\text{max}}$ , tem-se:

$$\frac{\Phi\text{F}_x}{\Phi\text{F}_{\text{max}}} = \frac{F_x \times (I.\text{Abs}.G)^{-1}}{F_{\text{max}} \times (I.\text{Abs}.G)^{-1}}$$

- 3) Como o termo  $(I.Abs.G)^{-1}$  é igual para substâncias sob a mesma concentração e mesmo solvente, tem-se:

$$\frac{\Phi F_x}{\Phi F_{\max}} = \frac{F_x}{F_{\max}}$$

onde os valores variam entre zero e um.

### 3.3.6 Rendimento Quântico de Fluorescência em Função da Concentração de Tween 20 no Meio Precipitante

Dez mililitros de suspensão de nanopartículas puras em meio precipitante foram preparados de acordo com o procedimento descrito na seção 3.4.1 sob diferentes concentrações de Tween 20, entre 0 e 2 % (m:v). Logo após, 330  $\mu$ L de solução etanólica de AlFtCl 300  $\mu$ M foram adicionados lentamente, sob agitação branda, à suspensão. Após dez minutos de agitação, os solventes orgânicos foram removidos sob pressão reduzida e a temperatura de 45 °C. O volume foi completado com água destilada para 4 mL, as nanopartículas foram então lavadas duas vezes por centrifugação (22000  $\times g$  por 20 minutos a 4 °C) com 4 mL de água destilada e por fim ressuspensas em 2 mL de PBS. Na sequência, alíquotas de 15  $\mu$ L foram recolhidas de cada amostra para a dosagem de AlFtCl, de acordo com a seção 3.3.1. Na sequência, todas as suspensões foram diluídas com PBS para a concentração de 1  $\mu$ M de AlFtCl e a fluorescência (excitação de  $\lambda$  de 350 nm, emissão de  $\lambda$  de 690 nm) foi determinada em alíquotas de 200  $\mu$ L. Os resultados estão expressos como  $\Phi F$  normalizado em função da concentração de Tween 20 no meio precipitante.

### 3.4 FORMULAÇÃO FINAL DE AIFtCl ASSOCIADO ÀS NANOPARTÍCULAS DE PVM/MA (AIFtCl-NP)

#### 3.4.1 Preparo

O protocolo apresentado aqui é o resultado dos testes realizados com variáveis específicas do processo, descritos em seções anteriores. Esta formulação é denominada, ao longo do texto, de AIFtCl-NP. A formulação preparada na ausência de AIFtCl é denominada simplesmente de NP. As etapas citadas na descrição abaixo estão representadas na Figura 11. Para o preparo da formulação de AIFtCl-NP, na etapa 1, a 5 mL de solução de PVM/MA 20 mg/mL em acetona foram adicionados, nesta sequência e sob agitação branda, 10 mL de etanol, 7,5 mL de água e 2,5 mL de Tween 20 14 % (m:v, em água). Na etapa 2, o AIFtCl foi associado às nanopartículas puras. Para tanto, foram adicionados, lentamente e sob agitação branda, 833  $\mu$ L de solução etanólica de AIFtCl 300  $\mu$ M às nanopartículas ainda em meio precipitante. Na etapa 3, a suspensão foi mantida sob agitação por dez minutos, sob temperatura ambiente. Na etapa 4, os solventes orgânicos foram totalmente removidos sob pressão reduzida (100 mbar) e temperatura de 45 °C. Na etapa 5, o volume foi completado com água destilada para 10 mL e as nanopartículas presentes nesta suspensão foram lavadas 2 vezes por centrifugação (22000  $\times$  g por 20 minutos a 4 °C) com 10 mL de água para remover os resíduos. Finalmente, na última etapa, as nanopartículas foram ressuspensas em 5 mL de PBS. Três alíquotas de 15  $\mu$ L foram recolhidas para a dosagem de AIFtCl, de acordo com o procedimento descrito na seção 3.3.1, e o volume restante foi mantido congelado a -20 °C até o momento do uso. As formulações foram utilizadas para os experimentos dentro do prazo de dois meses após o seu preparo.

#### 3.4.2 Eficiência do Processo

A eficiência de associação foi estimada pela dosagem de AIFtCl de acordo com o procedimento descrito na seção 3.3.1 em suspensões de nanopartículas preparadas conforme o procedimento apresentado na seção 3.4.1. A porcentagem do AIFtCl

associado foi então calculada com base na concentração teórica máxima esperada. Este procedimento foi realizado em amostras de seis lotes diferentes.

A mensuração do rendimento do processo de produção das nanopartículas foi realizada por gravimetria. Para tanto, quatro alíquotas de 1 mL de suspensão de nanopartículas, massa teórica de PVM/MA equivalente a 10 mg, foram desidratadas por liofilização (liofilizador Liotop L101<sup>®</sup>). A massa desidratada destas amostras foi mensurada em balança analítica. O valor do rendimento foi obtido pelo cálculo da porcentagem da massa desidratada em relação à massa teórica. Esta análise foi realizada em amostras de três lotes diferentes.

A carga de AIFtCl nas nanopartículas foi calculada dividindo-se a concentração de AIFtCl na nanossuspensão pela concentração de PVM/MA na suspensão correspondente.

### 3.5 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS

#### **3.5.1 Perfil de Desintegração de Nanopartículas e Variação da Fluorescência em Suspensão de AIFtCl-NP em Função do Tempo**

Como o colóide formado pelo AIFtCl-NP é levemente opaco, devido à presença das nanopartículas, e a desintegração destas aumenta a transparência do meio, a desintegração do AIFtCl-NP foi acompanhada por turbidimetria. Desta maneira, 200  $\mu$ L da suspensão de AIFtCl-NP (equivalente a 10  $\mu$ M de AIFtCl), em PBS, foram mantidos em microplaca transparente e a absorbância em  $\lambda$  de 510 nm foi lida a cada cinco minutos, em espectrofotômetro, por 11 horas, a 25 °C.

Para verificar se ocorria variação da fluorescência, 200  $\mu$ L da suspensão de AIFtCl-NP (equivalente a 10  $\mu$ M de AIFtCl), em PBS, foram mantidos em microplaca de cor preta e opaca. A fluorescência (excitação em  $\lambda$  de 350 nm, emissão em  $\lambda$  de 690 nm) foi lida a cada cinco minutos, em espectrofotômetro, por 11 horas, a 25 °C.

Ambos, a turbidez (densidade óptica) e a fluorescência normalizada, foram graficamente plotados em função do tempo.

### 3.5.2 Espectroscopia de Transmitância na Região do Infravermelho

Os espectros de transmitância na região do infravermelho do espectro eletromagnético foram obtidos em espectrômetro de infravermelho com transformada de Fourier (FT/IR 4100<sup>®</sup>, Jasco). Foram testadas as amostras AIFtCl-NP após 1 e 6 h de exposição à água, bem como o AIFtCl e PVM/MA isolados. As amostras liofilizadas foram colocadas diretamente no acessório atenuador de refletância total (ATR) e os espectros foram obtidos com resolução de 4 cm<sup>-1</sup>, na faixa entre 4000-500 cm<sup>-1</sup> e velocidade de 32 varreduras por minuto. A análise dos espectros obtidos foi realizada com base em estudo previamente publicado (77).

### 3.5.3 Produção de Oxigênio Singlete

Este ensaio foi realizado com base no protocolo descrito por He e colaboradores (2009). A detecção do <sup>1</sup>O<sub>2</sub> ocorre indiretamente, pelo uso de 1,3-difenil-isobenzofurano (DBF), uma molécula que reage pronta e irreversivelmente com o <sup>1</sup>O<sub>2</sub>, extinguindo a sua absorbância característica em  $\lambda$  de 414 nm.

Desta maneira, a 600  $\mu$ L de suspensão de AIFtCl-NP ou solução de AIFtCl, na concentração de AIFtCl equivalente a 1  $\mu$ M, foram adicionados 5  $\mu$ L de solução etanólica de DBF 5,5 mM. Esta mistura foi colocada em cubeta de quartzo e levada ao espectrofotômetro. A leitura da absorbância foi imediatamente realizada em 414 nm – o branco consistiu da solução ou do colóide sem DBF –. Logo depois, a mistura na cubeta foi irradiada com laser de  $\lambda$  de 670 nm e densidade de energia equivalente a 0,5 J/cm<sup>2</sup>. Este procedimento foi realizado com soluções etanólica e aquosa de AIFtCl, bem como com o colóide de nanopartículas associadas ou não à AIFtCl. A redução na absorbância em 414 nm após a irradiação foi utilizada como indicador semi-quantitativo da produção de <sup>1</sup>O<sub>2</sub> e os resultados foram expressos como porcentagem de geração de <sup>1</sup>O<sub>2</sub> em relação à obtida com solução etanólica de AIFtCl. Este experimento foi realizado em amostras de três lotes diferentes de AIFtCl-NP.

### 3.5.4 Características Coloidais e Morfológicas das Nanopartículas

O diâmetro hidrodinâmico, o potencial zeta e o índice de polidispersão (variáveis coloidais) das suspensões de nanopartículas foram quantificados em aparelho de dispersão dinâmica de luz (Zetasizer ZS90, Malvern®). As formulações foram analisadas logo após o seu preparo (frescas) ou logo após o seu descongelamento (neste caso foram congeladas por cinco horas, descongeladas e analisadas). Esta análise foi realizada em amostras de três lotes diferentes.

Para a avaliação morfológica das nanopartículas, as formulações foram preparadas de acordo com a seção 3.4.1 e, logo após, diluídas em água de modo a obter a concentração de nanopartículas de 0,1 mg/mL. Cinco  $\mu\text{L}$  desta suspensão foram espalhados sobre suporte metálico de amostras para microscopia eletrônica de varredura (*stub*), o qual foi então mantido em placa de Petri contendo sílica ativada, sob temperatura ambiente, para a secagem do material. A secagem rápida das nanopartículas de PVM/MA é crucial, visto que a água erode rapidamente sua superfície. Após sua secagem, as nanopartículas foram recobertas com ouro (metalizadas) e então visualizadas em microscópio eletrônico de varredura (JEOL JSM 7001-F®). Esta análise foi realizada em amostras de três lotes diferentes.

### 3.5.5 Estabilidade Fotodinâmica e Coloidal da Formulação de AIFtCl-NP

Alíquotas de 1,5 mL do colóide de nanopartículas de PVM/MA associadas ao AIFtCl, dispersas em PBS, foram mantidas congeladas a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Em determinados tempos de congelamento, uma alíquota foi descongelada e diluída em PBS para  $1\text{ }\mu\text{M}$  de AIFtCl. Na sequência, esta foi testada quanto à fluorescência (excitação em  $\lambda$  de 350 nm, emissão em  $\lambda$  de 690 nm), à capacidade de geração de  $^1\text{O}_2$  (de acordo com a seção 3.5.3) e às características coloidais (diâmetro hidrodinâmico, potencial zeta e índice de polidispersão, de acordo com a seção 3.5.4). A primeira alíquota testada foi preparada, imediatamente congelada e, cinco horas após, descongelada para a realização destes testes. A última alíquota foi testada 60 dias após o seu preparo.

## 3.6 ATIVIDADE FOTODINÂMICA DE AIFtCl-NP EM SISTEMAS BIOLÓGICOS

### 3.6.1 Cultivo Celular

Neste estudo foram utilizadas duas linhagens celulares murinas: a linhagem derivada de carcinoma mamário 4T1 e a linhagem não tumoral NIH 3T3 derivada de fibroblastos.

As condições descritas nesta seção foram utilizadas para cultivar estas células. Como meio de cultivo foi utilizado o DMEM estéril tamponado com bicarbonato de sódio, pH 7,2, e suplementado com soro fetal bovino a 10 % (v:v), penicilina 100 UI/mL e estreptomicina 100 µg/mL. As células foram mantidas neste meio de cultivo, em incubadora a 37 °C em atmosfera de 5 % CO<sub>2</sub> e 80 % de umidade.

### 3.6.2 Perfil de Incorporação de AIFtCl por Células 4T1 e NIH 3T3 Expostas ao AIFtCl-NP *In Vitro*

As células 4T1 e NIH 3T3 foram dispostas em microplacas de 96 poços, na concentração de  $5 \times 10^3$  células/poço. Após 24 horas de cultivo nas condições descritas na seção 3.6.1, o meio de cultivo foi removido e as células aderidas à placa foram expostas a 200 µL de suspensão de AIFtCl-NP em meio de cultivo, na concentração equivalente a 0,25 µM de AIFtCl. Nos tempos de 5, 10, 15, 30, 60, 90 e 120 minutos, a suspensão de AIFtCl-NP foi removida de 8 poços contendo as células, as quais foram então lavadas duas vezes com PBS. O AIFtCl incorporado pelas células foi extraído com 200 µL de DMSO por 15 minutos e a fluorescência foi lida em placa de cor preta (excitação em  $\lambda$  de 350 nm, emissão em  $\lambda$  de 680 nm). Controles negativos consistiram de células não expostas ao AIFtCl-NP e de meio de cultura sem células e com AIFtCl-NP; o valor de fluorescência deste último foi subtraído dos resultados dos testes. Os resultados estão expressos como intensidade de fluorescência normalizada em função do tempo de incubação. Este ensaio foi realizado duas vezes.

### 3.6.3 Visualização da Incorporação do AIFtCI-NP por Células Neoplásicas ao Microscópio Confocal

Para este ensaio, as células 4T1 foram mantidas sob condições de cultivo (ver seção 3.6.1) em placas de 24 poços com lamínulas, na concentração de  $2,0 \times 10^4$  células/poço, por 24 horas antes dos tratamentos, para adesão das células à lamínula. Na sequência, as células foram incubadas na presença de AIFtCI-NP (equivalente a AIFtCI 0,25  $\mu$ M) por 15 min, a 37 °C. Na sequência, foram lavadas duas vezes com PBS e então incubadas com o fluorocromo Hoechst 33342 (10  $\mu$ g/mL) por 15 min em incubadora, a 37 °C, para a marcação do núcleo. Logo após, as células foram lavadas duas vezes com PBS, fixadas com paraformaldeído 4 % (m:v), lavadas duas vezes com PBS e montadas em lâminas para análise ao microscópio confocal. Foram feitas duas preparações de células controle: 1) somente células 4T1 sem Hoechst 33342 nem AIFtCI-NP, e 2) células 4T1 apenas com Hoechst 33342. Para a visualização da marcação com Hoechst 33342, foram usados os  $\lambda$  de excitação e emissão de 405 e 458 nm, respectivamente. Para visualizar a localização da AIFtCI, foram usados os  $\lambda$  de excitação e emissão de 405 e 633 nm, respectivamente.

### 3.6.4 Citotoxicidade Fotodinâmica do AIFtCI-NP, *In Vitro*, contra Células 4T1 e NIH 3T3

Células 4T1 e NIH 3T3 foram mantidas sob as condições de cultivo descritas na seção 3.6.1 por 24 h em microplacas de 96 poços, na concentração de  $5 \times 10^3$  células/poço, para que estas aderissem aos poços. Após este período de incubação, o meio de cultura foi descartado e as células foram lavadas duas vezes com PBS.

As células foram então expostas a 200  $\mu$ L de suspensão de AIFtCI-NP em meio de cultivo, em diversas concentrações de AIFtCI, entre 0 e 2  $\mu$ M. As microplacas foram imediatamente recobertas com folha de alumínio e deixadas em incubadora a 37 °C, sob atmosfera de 5 % de CO<sub>2</sub> e umidade relativa de 80 %, por 15 minutos. Após este tempo, as células foram lavadas duas vezes com PBS e deu-se prosseguimento ao experimento de acordo com os procedimentos abaixo.

As células tratadas com AlFtCl-NP foram separadas em dois grupos: não irradiadas (escuro) e irradiadas sob densidade de energia de 3 J/cm<sup>2</sup> (TFD 3 J/cm<sup>2</sup>). No grupo de células não irradiadas, as células foram imediatamente recobertas com meio de cultivo e as placas foram embaladas em folha de alumínio para mantê-las no escuro. Para o teste de TFD 3 J/cm<sup>2</sup>, as células foram recobertas com PBS e irradiadas sob densidade de energia de 3 J/cm<sup>2</sup> com laser de  $\lambda$  de 670 nm. Logo após, o PBS foi removido e as células de ambos os testes (escuro e TFD) foram cultivadas sob as condições descritas na seção 3.6.1, por 24 horas. Na sequência foi realizado o ensaio de viabilidade celular conforme o descrito na próxima seção.

#### 3.6.4.1 Avaliação da Viabilidade das Células pelo Método Colorimétrico do Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio

O brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio – MTT – é uma substância amarela que, quando internalizada por células eucarióticas, é reduzida por enzimas mitocondriais – especialmente pela succinil desidrogenase – ao formazam, uma substância insolúvel em meio aquoso e que possui coloração púrpura intensa (78). Vale ressaltar que apenas células eucarióticas viáveis, com mitocôndrias ativas, reduzem o MTT, de maneira que a colorimetria do formazam permite estimar a viabilidade celular.

Para este ensaio, após passarem pelo tratamento experimental (seção 3.6.4), as células foram expostas a 200  $\mu$ L de meio de cultivo contendo MTT (0,25 mg/mL) e mantidas por três horas em condições de cultivo (seção 3.6.1). Na sequência o meio de cultivo foi removido e os cristais de formazam presentes nas células foram solubilizados com 200  $\mu$ L de DMSO por três minutos. A absorbância foi então mensurada em  $\lambda$  de 600 nm. Os resultados estão expressos como porcentagem de células viáveis em relação ao controle sem tratamento.

### 3.6.5 Teste de Fragmentação de DNA em Células Expostas à Formulação AIFtCl-NP

Este ensaio foi realizado de acordo com o procedimento descrito por Joanitti e colaboradores (79), desse modo, células 4T1 foram mantidas sob as condições de cultivo apresentadas na seção 3.6.1 por 24 horas em microplacas de 96 poços, na concentração de  $5 \times 10^3$  células/poço. Após esta incubação, o meio de cultura foi removido e as células foram lavadas duas vezes com PBS.

Na sequência, as células foram expostas ao AIFtCl-NP 0,25  $\mu$ M em PBS por 15 minutos. Logo após, as células foram lavadas duas vezes com PBS, recobertas com PBS e irradiadas sob densidade de energia de 3, 9 ou 27 J/cm<sup>2</sup> com laser de  $\lambda$  de 670 nm e mantidas em incubadora sob condições de cultivo por 24 horas. Após este tempo, as células foram lavadas duas vezes com PBS e recobertas com meio de cultivo com tripsina 0,25 % (m:v) e EDTA 0,038% (m:v). Na sequência, após centrifugação (900  $\times$  g por dois minutos) as células foram ressuspensas, na concentração de  $1 \times 10^3$  células/mL, em 200  $\mu$ L de solução tamponada de iodeto de propídio 20  $\mu$ g/mL (iodeto de propídio dissolvido em PBS suplementado com citrato de sódio 0,1 % m:v, Triton X 0,1 % m:v, pH 7,4). O iodeto de propídio marca o DNA, possibilitando a semi-quantificação deste ácido nucléico em cada célula.

Na sequência, as células foram levadas ao citômetro de fluxo (FACSCalibur<sup>®</sup>, Becton & Dickenson, EUA) para a quantificação de DNA. Foram contados dez mil eventos por amostra. As células que apresentaram redução na quantidade de DNA em relação à esperada para células normais foram consideradas como positivas para fragmentação de DNA.

## 3.7 TESTES ESTATÍSTICOS

Para as variáveis cujas populações de dados foram distribuídas em grupos, foi realizada a análise de variância, ANOVA, de um fator ou ANOVA de dois fatores com pós-teste de Bonferroni. As correlações entre variáveis dependentes e independentes (gráficos XY) foram analisadas por meio do teste de Spearman. Para todas as análises,

o nível de significância ( $\alpha$ ) utilizado foi de 0,05. As análises e os gráficos foram realizados com o programa Graphpad Prism<sup>®</sup> 5 para Windows.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 PADRONIZAÇÃO DO PROTOCOLO DE PREPARO DE AIFtCl-NP

#### 4.1.1 O Diâmetro Hidrodinâmico e o Índice de Polidispersão, PDI, são Afetados pela Concentração de Copolímero PVM/MA Empregada no Preparo das Nanopartículas

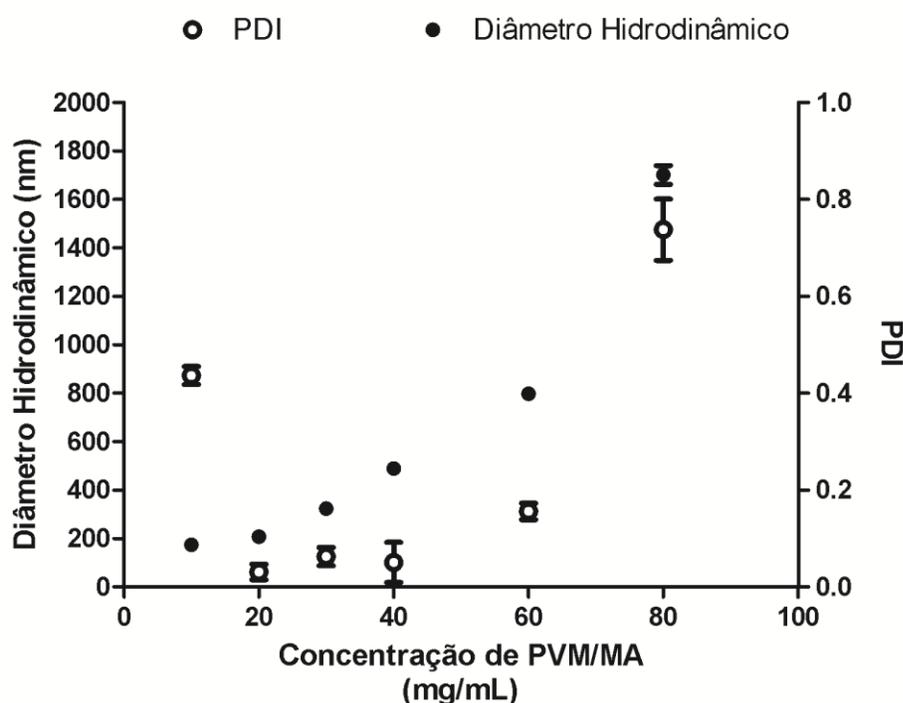


Figura 12. Índice de polidispersão (PDI) e diâmetro hidrodinâmico médio de partículas formadas através do método de nanoprecipitação (método Ouzo) em função da concentração inicial de PVM/MA na solução acetônica. Resultado expresso como média  $\pm$  E.P.M. para triplicata.  $r_{\text{Spearman}} = 1,0$  com  $p < 0,01$  para diâmetro hidrodinâmico;  $r_{\text{Spearman}} = 0,37$ , correlação não significativa, para PDI.

Conforme ilustra a Figura 12, a concentração do PVM/MA na solução inicial em acetona afeta importantes características do colóide formado, pois houve um aumento do diâmetro hidrodinâmico diretamente proporcional à concentração de copolímero ( $r_{\text{Spearman}} = 1,0$ ;  $p < 0,01$ ), enquanto o PDI foi maior nos extremos de concentração testados. O diâmetro hidrodinâmico variou entre  $174,3 \pm 21,9$  e  $1701,3 \pm 38,3$  nm entre as concentrações de PVM/MA de 10 e 80 mg/mL. Para as concentrações entre 20 e 40 mg/mL, o PDI ficou abaixo de 0,100, mostrando que os colóides formados neste

intervalo de concentrações de PVM/MA eram formados por populações de nanopartículas monodispersas.

A média do potencial zeta das nanopartículas foi de  $-20,3 \pm 0,9$  mV e não apresentou correlação significativa com a concentração de PVM/MA.

#### **4.1.2 O Surfactante Tween 20 Aumenta Significativamente a Fluorescência do AIFtCl em Meio Aquoso**

A Figura 13 ilustra os espectros de fluorescência (excitação em 350 nm) do AIFtCl 10  $\mu$ M em diversos solventes. A mesma figura (Figura 13a) mostra que o AIFtCl praticamente não fluoresce em água, enquanto que apresenta intensa fluorescência em etanol com pico de emissão em 680 nm. Esta figura mostra ainda que a fluorescência do AIFtCl é mantida em meio precipitante (mistura de acetona:etanol:água 1:2:2, v:v:v), mas que há um deslocamento batocrômico do pico de emissão para 690 nm.

A fluorescência do AIFtCl foi mensurada também em Tween 20 e Tween 80 puros, sendo que, conforme apresentado na Figura 13b, o primeiro foi o que propiciou a maior intensidade de fluorescência ao AIFtCl. Em Tween 20 foi verificado um valor correspondente a 55 % do obtido em etanol, enquanto que em Tween 80 chegou a apenas 26 %.

Na sequência, o Tween 20 foi testado em meio aquoso e o resultado mostra que este surfactante intensificou a fluorescência do AIFtCl, conforme apresentado na Figura 13c.

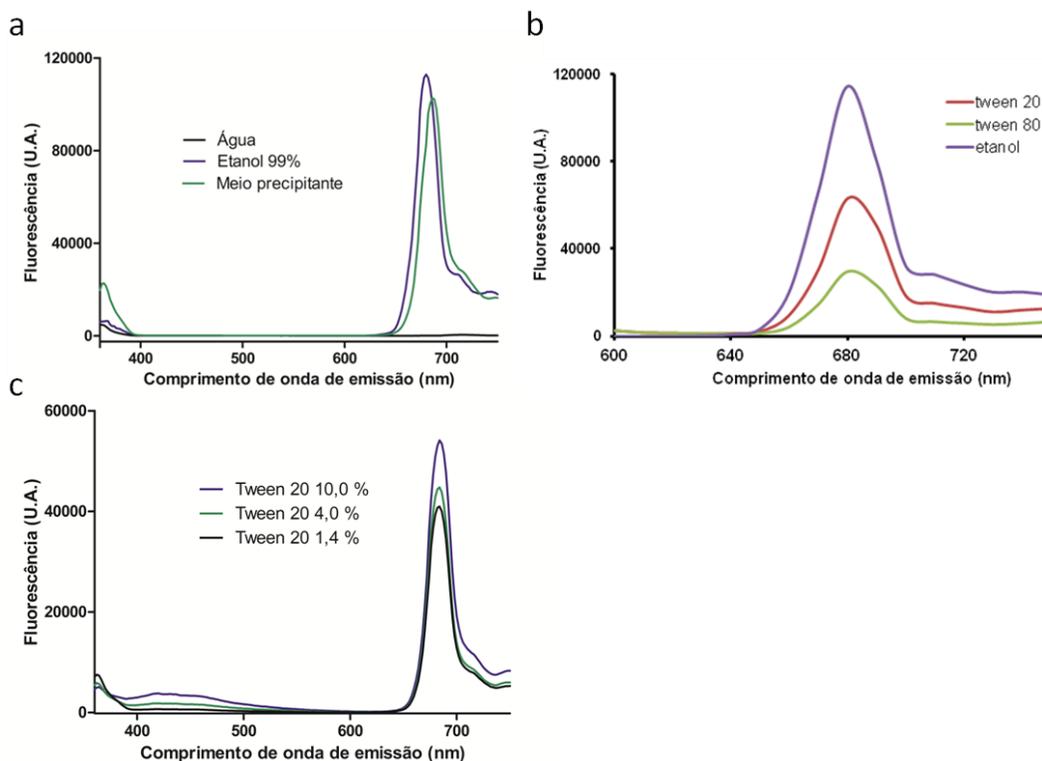


Figura 13. Espectros de fluorescência (excitação em 350 nm) do cloreto de alumínio-ftalocianina 10  $\mu\text{M}$  em diversos solventes: a) água, etanol 99 % e meio precipitante (acetona:etanol:água, 1:2:2, v:v:v); b) em Tween 20, Tween 80 e etanol 99 %; c) em soluções aquosas de Tween 20 sob diferentes concentrações. Resultados expressos como unidades arbitrárias (U.A.) de fluorescência em função do comprimento de onda de emissão.

#### 4.1.3 A agregação de AlFtCl durante o preparo de AlFtCl-NP é significativamente reduzida pelo Tween 20

Os resultados apresentados na Figura 13 são corroborados pelos resultados apresentados nesta seção. A Figura 14a mostra a intensidade de fluorescência do AlFtCl (excitação em 350 nm, emissão em 690 nm) no meio precipitante e no meio aquoso que resta após a destilação dos solventes orgânicos que compõem o meio precipitante.

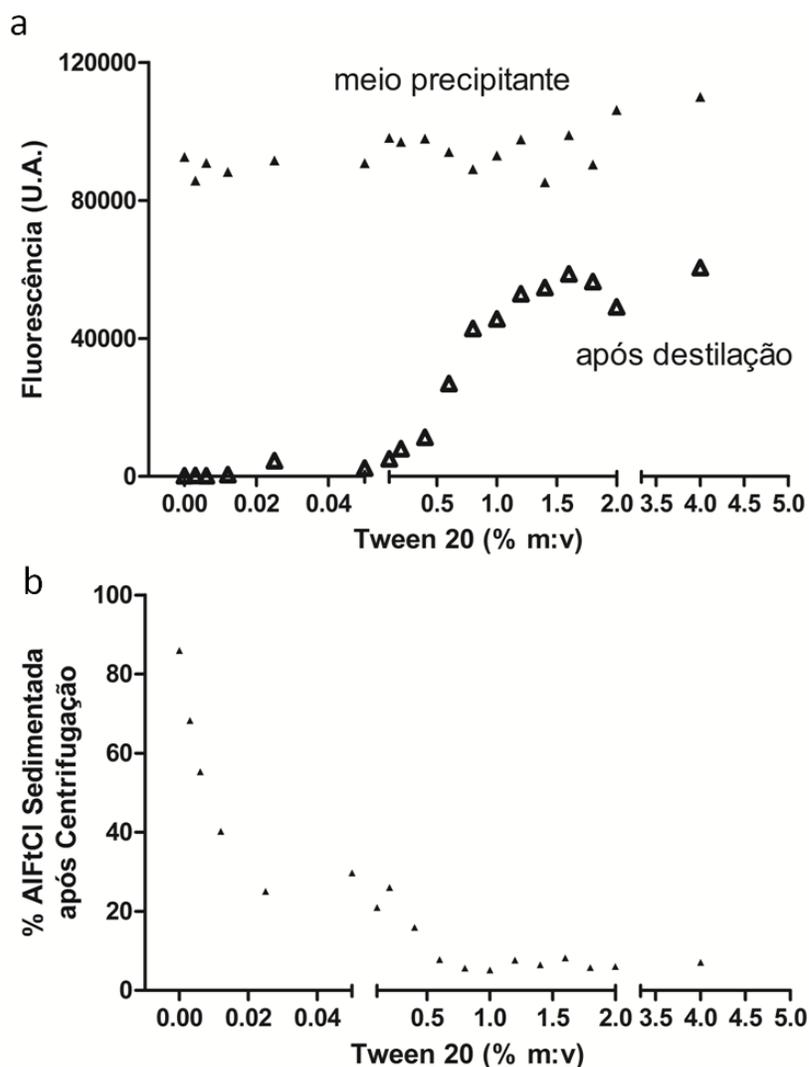


Figura 14. Influência da concentração de Tween 20 no meio precipitante sobre a agregação e a perda após centrifugação do cloreto de alumínio-ftalocianina (AIFtCl), na ausência de nanopartículas de PVM/MA. a) fluorescência (excitação em 350 nm, emissão em 690 nm) do AIFtCl no meio precipitante (triângulo cheio;  $r_{\text{Spearman}} = 0,44$ , correlação não significativa) e na solução aquosa formada após a destilação dos solventes orgânicos (triângulo vazio;  $r_{\text{Spearman}} = 0,97$ ,  $p < 0,001$ ); b) porcentagem de AIFtCl sedimentada pela centrifugação da solução aquosa formada após a destilação do meio precipitante ( $r_{\text{Spearman}} = -0,89$ ,  $p < 0,001$ ). Para todos os pontos, a concentração inicial de AIFtCl no meio precipitante foi de  $10 \mu\text{M}$ .

De acordo com os resultados apresentados na Figura 14a, a concentração de Tween 20 não afeta significativamente a intensidade de fluorescência do AIFtCl no meio precipitante ( $r_{\text{Spearman}} = 0,44$ , correlação não significativa), que se mantém alta graças à presença de etanol em concentração de 40 % (m:v). Por outro lado, após a destilação dos solventes orgânicos do meio precipitante, a fluorescência é praticamente

anulada na ausência de Tween 20 e aumenta de maneira diretamente proporcional à concentração de Tween 20 ( $r_{\text{Spearman}} = 0,97$ ,  $p < 0,001$ ), tendo a curva gráfica um perfil sigmóide.

Como grandes agregados de AIFtCl podem ser decantados por centrifugação, a perda de AIFtCl por decantação após a centrifugação do meio aquoso restante após a destilação dos solventes orgânicos foi dosada e plotada em função da concentração de Tween 20. O resultado está expresso na Figura 14b e reflete aquele mostrado na Figura 14a. A perda de AIFtCl após a centrifugação chega a 86 % na ausência de Tween 20. Esta perda é reduzida pela adição de Tween 20, mesmo em baixas concentrações ( $r_{\text{Spearman}} = -0,86$ ,  $p < 0,001$ ). Desde 0,6 % (m:v) de Tween 20, a perda foi praticamente anulada (5 %).

#### **4.1.4 O Rendimento Quântico de Fluorescência da Formulação AIFtCl-NP Aumenta em Função do Emprego de Tween 20 no Meio Precipitante**

O Tween 20 aumenta significativamente o rendimento quântico de fluorescência ( $\Phi F$ ) da formulação final. O resultado está expresso na Figura 15. Como pode ser observado, há uma correlação positiva entre a concentração de Tween 20 utilizada no meio precipitante e o  $\Phi F$  obtido com a formulação final ( $r_{\text{Spearman}} = 0,96$ ,  $p < 0,01$ ). Com concentrações acima de 1,2 % foi possível dobrar este parâmetro em relação à formulação preparada na ausência de Tween 20.

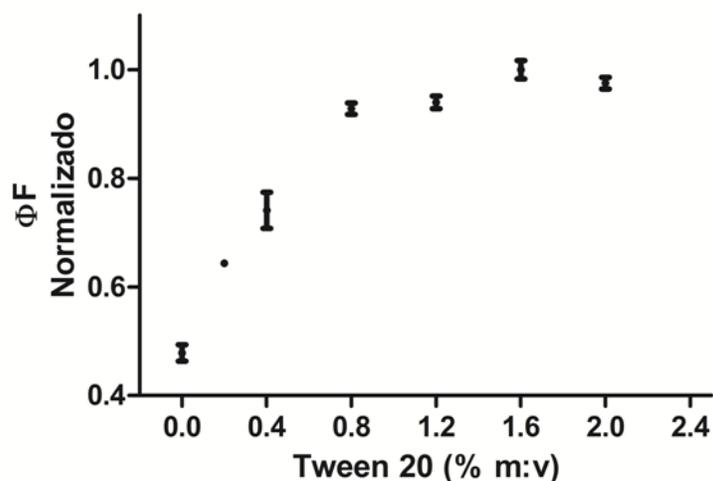


Figura 15. Rendimento quântico de fluorescência,  $\Phi F$ , (excitação em 350 nm, emissão em 690 nm) da suspensão final de nanopartículas em função da concentração de Tween 20 utilizada no meio precipitante durante o seu preparo.  $r_{\text{Spearman}} = 0,96$ ,  $p < 0,01$ . Resultados expressos como média  $\pm$  E.P.M. para triplicata.

#### 4.1.5 A Eficiência de Associação e o Rendimento Quântico de Fluorescência da Formulação AIFtCl-NP Diminuem com o Aumento da Concentração do AIFtCl no Meio Precipitante

A eficiência de associação do AIFtCl às nanopartículas de PVM/MA é inversamente proporcional à concentração do AIFtCl, dentro da faixa de valores testados ( $r_{\text{Spearman}} = -0,83$ ;  $p < 0,05$ ). O resultado está expresso na Figura 16a, mostrando que a eficiência de associação variou significativamente entre 25 e 38 %.

Na Figura 16b estão apresentados os valores de  $\Phi F$  normalizado das diferentes formulações. Observa-se um decréscimo no  $\Phi F$  inversamente proporcional à concentração inicial de AIFtCl utilizada no preparo da formulação ( $r_{\text{Spearman}} = -0,98$ ;  $p < 0,001$ ). Este decréscimo chega a atingir 70 % na comparação entre os extremos testados (35,0 versus 2,8  $\mu\text{M}$  de AIFtCl).

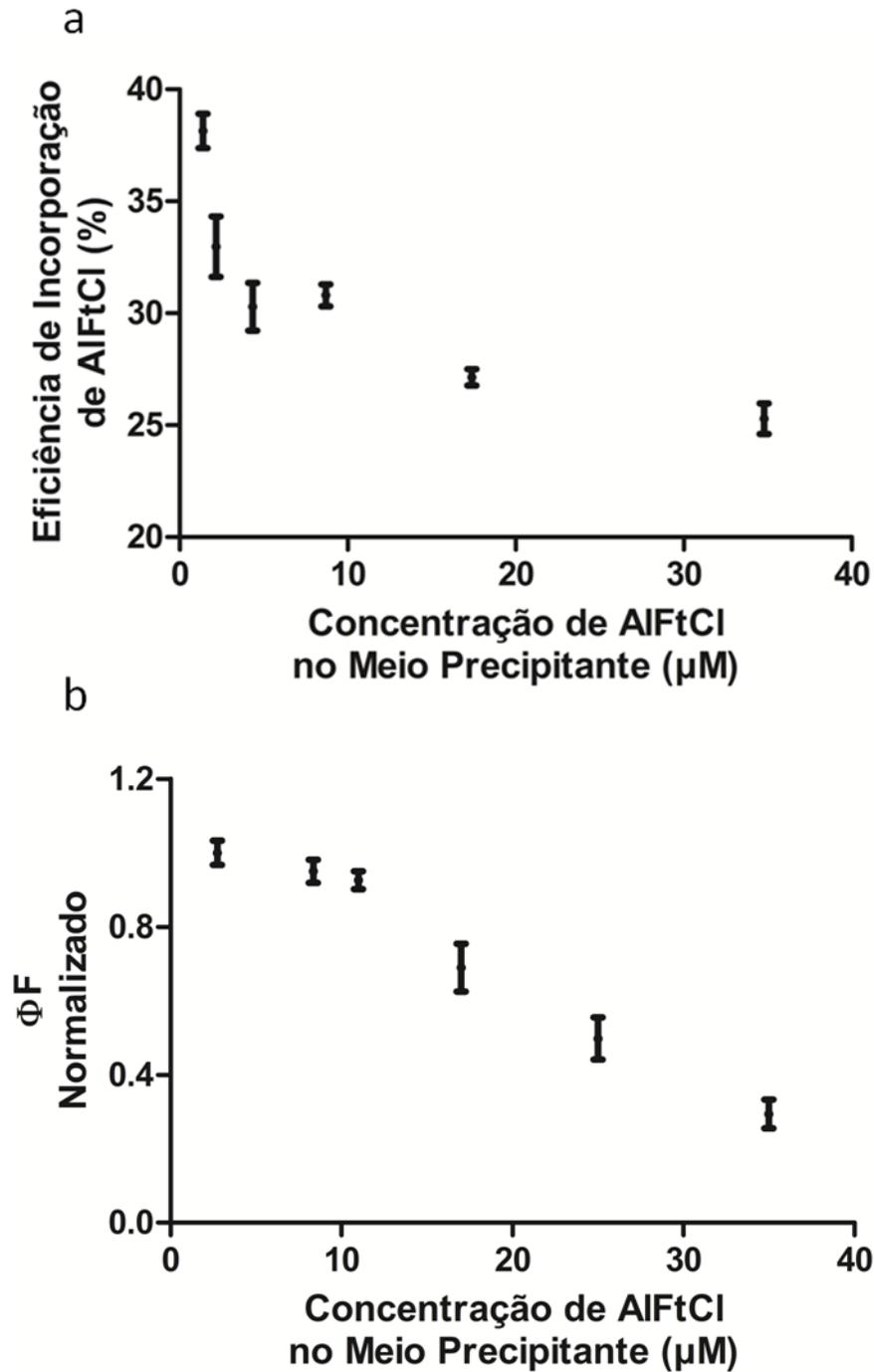


Figura 16. Efeito da concentração do cloreto de alumínio-ftalocianina (AlFtCl) utilizada no meio precipitante sobre a eficiência de associação de AlFtCl às nanopartículas (a) e sobre o rendimento quântico de fluorescência (excitação em 350 nm, emissão em 690 nm) da suspensão final de nanopartículas contendo 1  $\mu\text{M}$  de AlFtCl (b). Dados plotados como média  $\pm$  E.P.M. para triplicata. Para “a”,  $r_{\text{Spearman}} = -0,83$ ;  $p < 0,05$ ; Para “b”,  $r_{\text{Spearman}} = -0,98$ ;  $p < 0,001$ .

## 4.2 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS

### 4.2.1 AIFtCl-NP é Composto por Nanopartículas Monodispersas e com Carga Negativa em pH Fisiológico

Os dados apresentados na Tabela 2 mostram que as nanopartículas de PVM/MA obtidas pelo protocolo descrito na seção 3.4.1, associadas ou não ao AIFtCl, possuem diâmetro hidrodinâmico próximo de 200 nm e um PDI de cerca de 0,05. Além disso, estes parâmetros não são afetados pelo congelamento/descongelamento das nanopartículas. O potencial zeta tampouco foi afetado pela associação do AIFtCl à nanopartícula ou pelo congelamento/descongelamento. Além destes resultados, os parâmetros relativos ao processo de preparo são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Características das nanopartículas associadas ou não ao cloreto de alumínio-ftalocianina, antes e depois do congelamento.

	DH (nm)	PDI	Potencial Zeta (mV)	Carga de AIFtCl ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )	Eficiência de associação (%)	Rendimento (%)
AIFtCl-NP fresca	201,1 $\pm 4,9$	0,04 $\pm 0,01$	-19,7 $\pm 0,54$	0,9/1,0	32,2 $\pm$ 2,0	49,5 $\pm$ 1,3
AIFtCl-NP cong./desc.	206,2 $\pm 4,6$	0,05 $\pm 0,01$	-20,4 $\pm 0,61$	-	-	-
NP fresca	207,5 $\pm 1,2$	0,03 $\pm 0,01$	-21,0 $\pm 0,38$	-	-	42,7 $\pm$ 0,9
NP cong./desc.	208,9 $\pm 1,5$	0,04 $\pm 0,01$	-20,6 $\pm 0,47$	-	-	-

DH = diâmetro hidrodinâmico; PDI = índice de polidispersão; AIFtCl = cloreto de alumínio-ftalocianina; PVM/MA = poli(vinil,metil-éter-co-anidrido maleico); cong./desc. = congelada/descongelada; NP = nanopartícula de PVM/MA; AIFtCl-NP = AIFtCl associado à nanopartícula de PVM/MA. A carga de AIFtCl refere-se à concentração de AIFtCl por massa de nanopartículas, em  $\mu\text{g}/\text{mg}$ . A eficiência de associação refere-se à porcentagem de AIFtCl associado às nanopartículas em relação à quantidade total utilizada no processo de preparo do AIFtCl-NP. O rendimento refere-se à porcentagem de massa de nanopartículas obtida ao final do processo em relação à quantidade total de copolímero utilizada.

Na Figura 17 é apresentada a distribuição de valores de diâmetro hidrodinâmico, verificada por espalhamento dinâmico de luz, para a população de nanopartículas presentes em uma suspensão de AIFtCl-NP fresca. O baixo PDI

encontrado para as formulações de nanopartículas de PVM/MA, mostrado na Tabela 2, é refletido neste gráfico que ilustra a distribuição simétrica e unimodal dos valores de diâmetro hidrodinâmico, monodispersa.

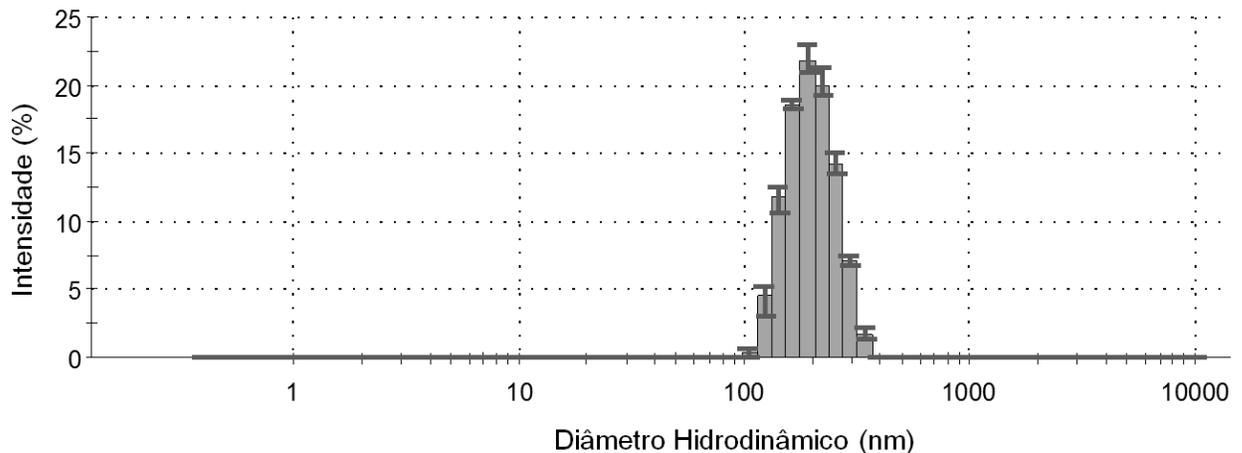


Figura 17. Distribuição de valores de diâmetro hidrodinâmico para a formulação de cloreto de alumínio-ftalocianina associado a nanopartículas de PVM/MA (AlFtCl-NP). As colunas representam a média  $\pm$  E.P.M. para três medidas realizadas em uma mesma amostra.

#### 4.2.2 Nanopartículas de PVM/MA são Esféricas

A Figura 18, que ilustra fotoeletromicrografias de varredura de nanopartículas de PVM/MA puras recobertas com ouro, mostra que essas apresentam forma esférica e superfície levemente rugosa. A monodispersão observada na Figura 17, pelo método de espalhamento dinâmico de luz, é refletida nestas imagens pela homogeneidade de tamanhos das nanopartículas.

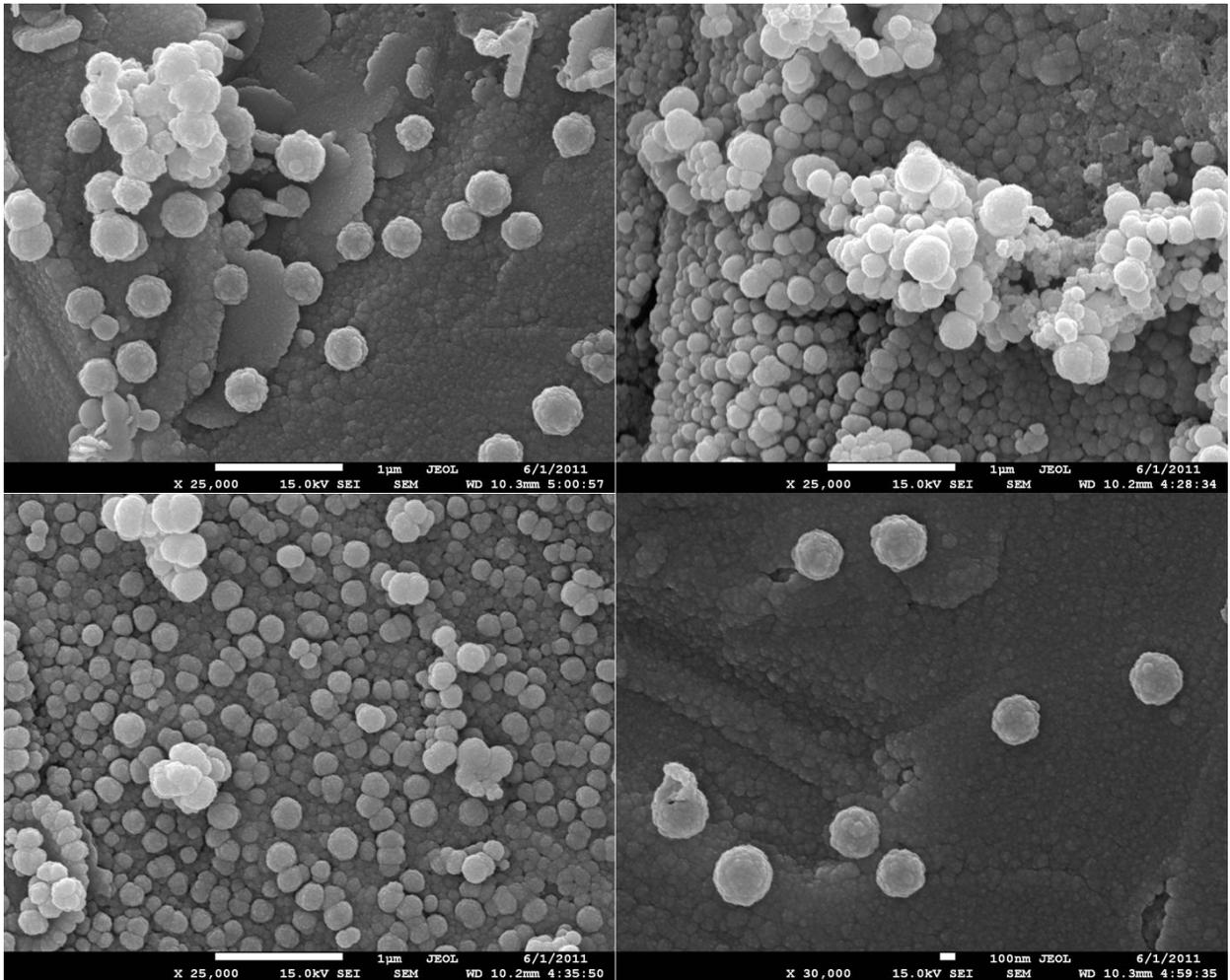


Figura 18. Fotoeletromicrografias de varredura de nanopartículas de PVM/MA recobertas com ouro.

#### 4.2.3 AIFtCl-NP Apresenta Pico de Absorção de Luz na Região do Vermelho e Forte Fluorescência em Meio Aquoso, Antes e Após a sua Desintegração

Os espectros de absorvância e de emissão de fluorescência foram traçados com suspensões de AIFtCl-NP e de NP em PBS imediatamente (nanopartículas íntegras) e seis horas após o seu preparo (nanopartículas desintegradas). Os perfis espectrais de AIFtCl/Etanol e AIFtCl/PBS estão apresentados nos mesmos gráficos para comparação. A Figura 19 ilustra, em a e b, respectivamente, os espectros de absorvância das amostras antes e depois da degradação das nanopartículas.

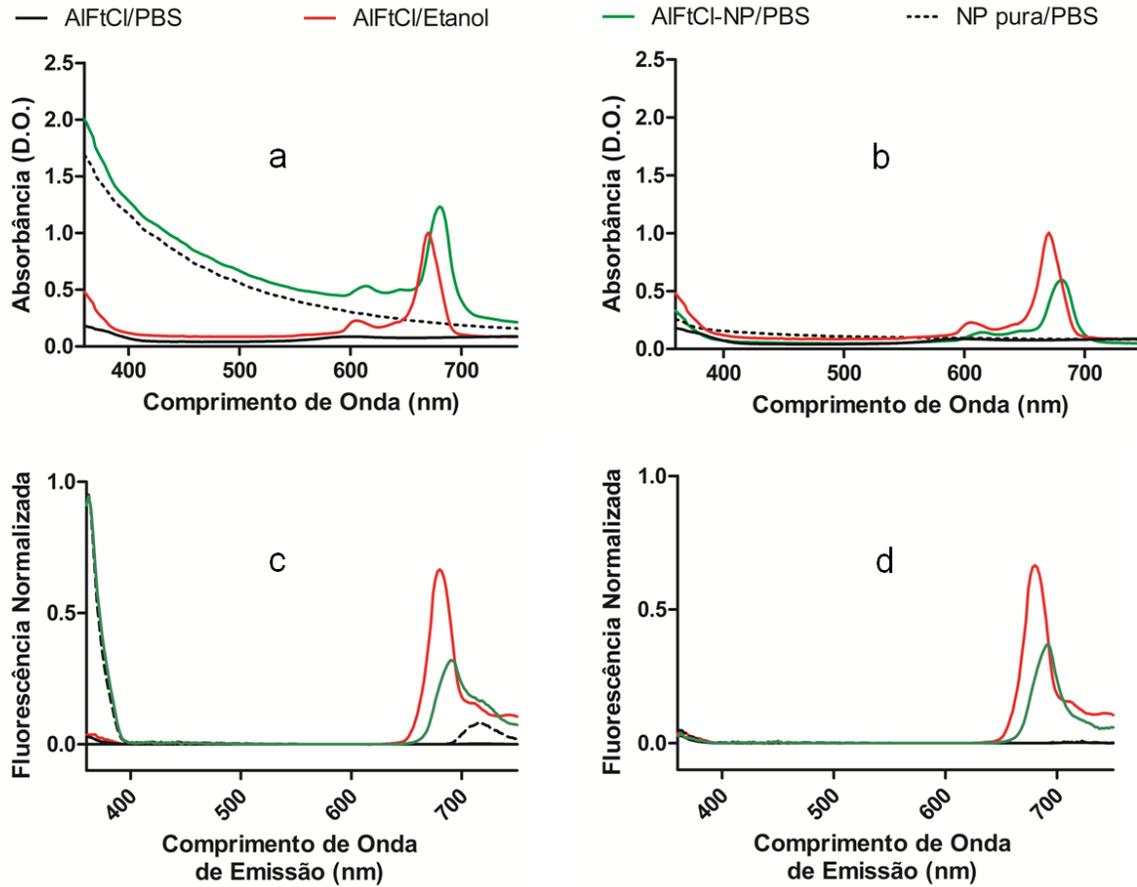


Figura 19. Espectros de absorvância (“a” e “b”) e fluorescência (“c” e “d”, excitação em 350 nm), obtidos antes (“a” e “c”) e depois (“b” e “d”) da desintegração de nanopartículas de PVM/MA associadas ao cloreto de alumínio-ftalocianina (AIFtCl-NP/PBS) ou puras (NP pura/PBS), ambas suspensas em PBS. Os espectros do AIFtCl em etanol e em PBS estão também apresentados para fins de comparação. A concentração de AIFtCl era de 5  $\mu$ M em todas as amostras, exceto para NP pura/PBS, que não continha AIFtCl.

Observa-se que, devido à turbidez característica das suspensões de nanopartículas de PVM/MA, os espectros pré-degradação de ambos, NP e AIFtCl-NP (Figura 19a), apresentam alta absorção em toda a faixa espectral analisada. No caso do AIFtCl-NP, os dois picos característicos do AIFtCl na região visível do espectro eletromagnético aparecem com deslocamento batocrômico, em 608 e 678 nm, em relação aos obtidos em etanol, 600 e 668 nm. Este resultado repetiu-se com as amostras nas quais as nanopartículas estavam desintegradas, com a diferença de que a intensidade de absorção caiu em todos os comprimentos de onda. Em PBS, o AIFtCl

livre apresentou absorvância próxima a zero entre 650 e 670 nm, faixa espectral onde o AIFtCl absorve intensamente quando em etanol.

A Figura 19, em c e d, apresenta os espectros de emissão de fluorescência (excitação em 350 nm) para as mesmas amostras. Neste caso, as amostras com nanopartículas íntegras (NP e AIFtCl-NP) refletem a luz emitida pelo espectrofotômetro entre 360 e 400 nm, bem como em torno de 720 nm. Estes picos desaparecem após a desintegração das nanopartículas. É possível observar que as amostras de AIFtCl-NP, antes e após a sua desintegração, apresentam um pico de emissão em 688 nm. Este pico apresenta deslocamento batocrômico em relação ao observado em etanol (678 nm). Em comparação à solução AIFtCl/Etanol, a amostra de AIFtCl-NP apresentou cerca de 50 % do valor de fluorescência em seu pico de emissão, tanto antes quanto após a desintegração das nanopartículas.

#### **4.2.4 A Desintegração de AIFtCl-NP em PBS não Extingue a Fluorescência do AIFtCl**

A Figura 20 mostra que a turbidez (absorvância em 510 nm) de suspensões de nanopartículas de AIFtCl-NP em PBS, a 25 °C, é estável por 1h30min. Após este período, a turbidez do meio começa a decair, indicando a solubilização do polímero e a consequente desintegração das nanopartículas. A turbidez tem um novo patamar estável em 6h20min, mostrando que a desintegração das nanopartículas atinge, neste tempo, seu ápice.

Na mesma figura é exposto o perfil de variação de fluorescência da mesma amostra durante o mesmo período. Em cerca de 1h40min começa a haver declínio da fluorescência. Em 2h25min é atingido o menor valor de fluorescência, correspondente a cerca de 55 % do inicial. No entanto, a partir de 2h40min há uma reversão nesta tendência de queda e a fluorescência aumenta, até atingir um novo patamar, cujos valores de intensidade de fluorescência são cerca de 80 % maiores em relação ao valor de 2h25min e cerca de 10 % maiores em relação ao primeiro patamar, que durou até 1h40min.

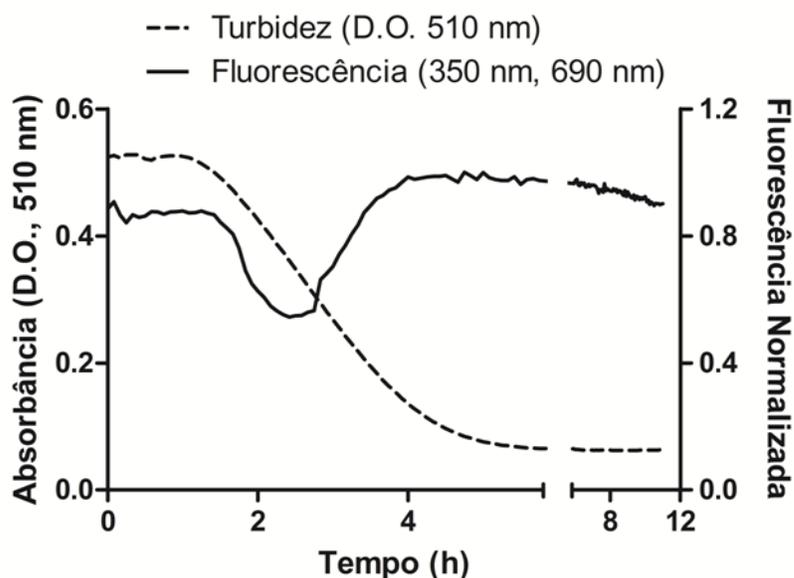


Figura 20. Perfil de desintegração e de variação de fluorescência (excitação em  $\lambda$  de 350 nm, emissão em  $\lambda$  de 690 nm) em função do tempo para nanopartículas de PVM/MA associadas ao cloreto de alumínio-ftalocianina (AlFtCl-NP) suspensas em PBS a 25 °C.

#### 4.2.5 A Desintegração de AlFtCl-NP Ocorre por Hidrólise dos Grupamentos Anidrido do PVM/MA

A Figura 21 mostra os espectros de transmitância na região do infravermelho no espectro eletromagnético para a formulação AlFtCl-NP sob diferentes graus de hidrólise, bem como para o PVM/MA puro e para o AlFtCl puro. É possível observar que o PVM/MA não exposto à água apresenta o duplete característico de anidrido em  $1842\text{ cm}^{-1}$  e em  $1770\text{ cm}^{-1}$ , sendo esta última banda bastante intensa. Conforme aumenta a exposição à água (de uma hora para seis horas), ocorre hidrólise do grupamento anidrido, fato evidenciado tanto pela redução na intensidade das bandas características de anidrido quanto no surgimento de bandas de ácidos carboxílicos, em  $1733\text{ cm}^{-1}$  e em  $1362\text{ cm}^{-1}$ . Bandas de AlFtCl não são aparentes nos espectros apresentados por AlFtCl-NP, o que deve ser devido principalmente ao fato de que a concentração de AlFtCl nas nanopartículas é de cerca de 1:1000 (m:m).

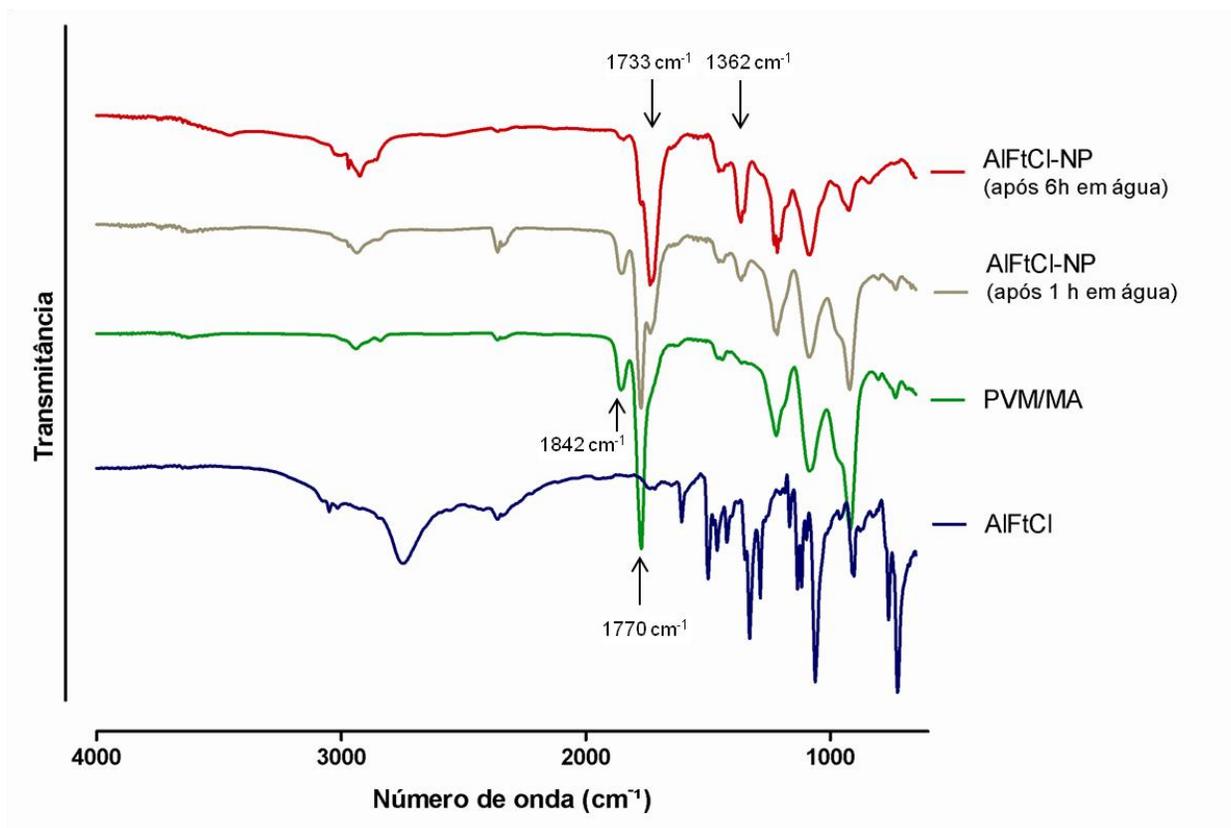


Figura 21. Espectros de transmitância no infravermelho para as amostras de PVM/MA, de cloreto de alumínio-ftalocianina puro (AIFtCl), e de AIFtCl associado a nanopartículas de PVM/MA (AIFtCl-NP) após exposição à água por 1 ou 6 h, em função do número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ).

#### 4.2.6 AIFtCl-NP Gera Oxigênio Singlete por Fotoativação em Meio Aquoso

A geração fotoativada (laser de  $\lambda$  de 670 nm, densidade de energia de 0,5  $\text{J}/\text{cm}^2$ ) de oxigênio singlete foi mensurada em amostras de NP, AIFtCl-NP em PBS, AIFtCl em PBS e AIFtCl em etanol P.A.. Conforme o esperado, a produção de oxigênio singlete foi mais alta em etanol, o padrão positivo utilizado neste ensaio, sendo o valor obtido com esta solução normalizado para 100 % (Figura 22). A produção de oxigênio singlete obtida com o AIFtCl/PBS foi equivalente a apenas 4,1 % daquela obtida em etanol. Por outro lado, a produção verificada com a suspensão de AIFtCl-NP/PBS chegou a 54,0 % da observada em etanol ( $p < 0,001$ ). A NP não produziu quantidades significativas de oxigênio singlete quando irradiada com laser.

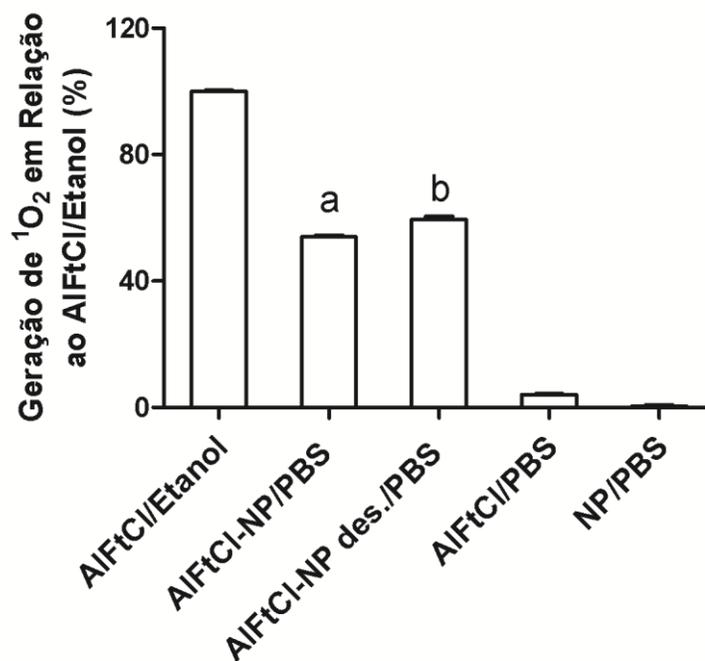


Figura 22. Produção de oxigênio singlete pela irradiação ( $\lambda$  de 670 nm, densidade de energia de 0,5 J/cm<sup>2</sup>) do cloreto de alumínio-ftalocianina (AIFtCl) em diferentes composições. São apresentados os resultados obtidos para nanopartículas de PVM/MA sem AIFtCl (NP/PBS), para soluções de AIFtCl em etanol e em PBS, e para a suspensão de AIFtCl associado a nanopartículas de PVM/MA, em PBS, antes (AIFtCl-NP/PBS) e após (AIFtCl-NP des./PBS) a desintegração das nanopartículas. A concentração de AIFtCl é de 1  $\mu\text{M}$  em todas as composições, exceto NP/PBS. O resultado está apresentado como média  $\pm$  E.P.M. para triplicata. <sup>a</sup>  $p < 0,001$  vs AIFtCl/Etanol, vs AIFtCl/PBS, vs AIFtCl-NP des./PBS e vs NP/PBS; <sup>b</sup>  $p < 0,001$  vs AIFtCl-NP/PBS, vs AIFtCl/Etanol e vs NP/PBS.

#### 4.2.7 AIFtCl-NP Congelada Apresenta Estabilidade Fotodinâmica e Nanoscópica

A estabilidade fotodinâmica, i.e., fluorescência e geração de oxigênio singlete, e a nanoscópica, diâmetro hidrodinâmico, potencial zeta e PDI, de amostras de AIFtCl-NP congeladas a -20 °C foi acompanhada por 60 dias. Os resultados estão apresentados na Figura 23.

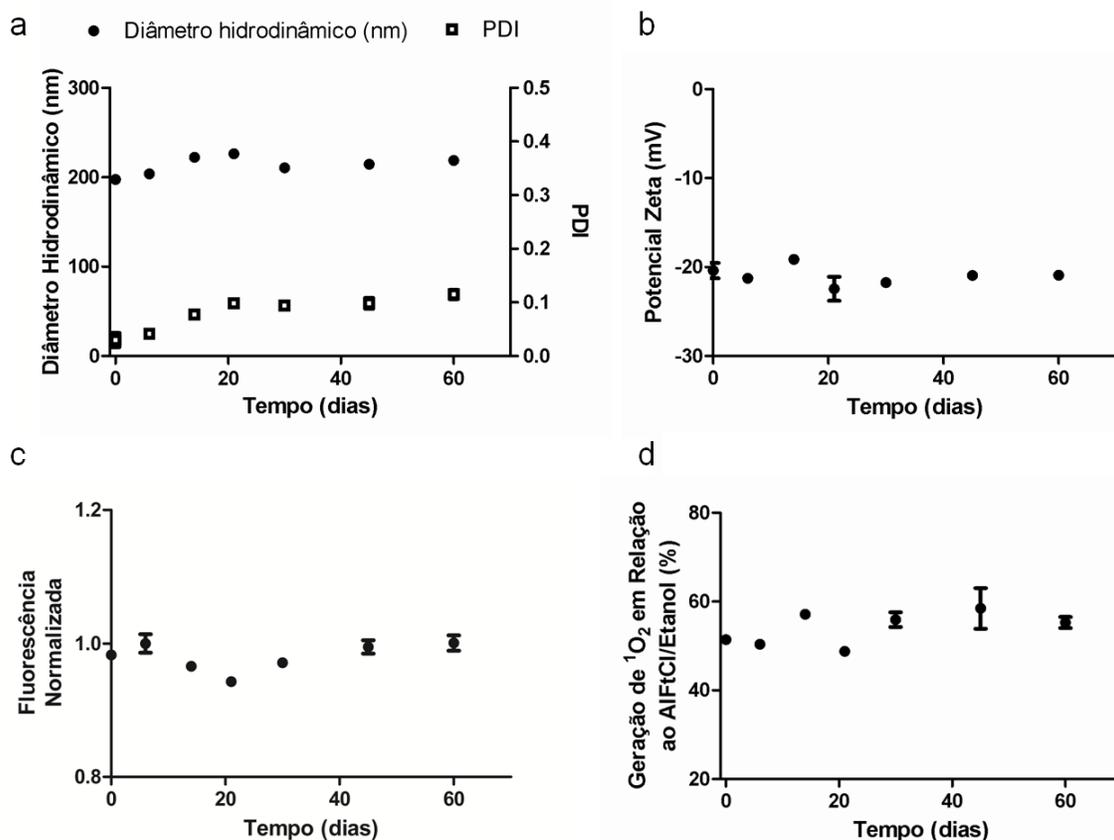


Figura 23. Estabilidade nanoscópica e fotodinâmica da formulação de cloreto de alumínio-ftalocianina associado a nanopartículas de PVM/MA suspensas em PBS e mantidas por até 60 dias congeladas a -20 °C. Em “a”, o diâmetro hidrodinâmico e o índice de polidispersão (PDI), em “b” o potencial zeta, em “c” a fluorescência (excitação em 350 nm, emissão em 690 nm) e em “d” a geração de <sup>1</sup>O<sub>2</sub>. Os resultados estão apresentados como média ± E.P.M. para amostras de três lotes diferentes.

O resultado obtido para o diâmetro hidrodinâmico (Figura 23a) indica que, apesar de ter sido registrada uma tendência de aumento desta variável com o passar do tempo, variando entre 197,6 a 226,3 nm em 60 dias, a correlação entre o tempo e o diâmetro hidrodinâmico não foi significativa ( $r_{\text{Spearman}} = 0,46$ , correlação não significativa). Porém, o PDI, um indicador da polidispersão da população de nanopartículas, aumentou significativamente durante o período de análise ( $r_{\text{Spearman}} = 0,89$ ,  $p < 0,05$ ), variando entre 0,03 e 0,11. O resultado obtido para o potencial zeta, apresentado na Figura 23b, não variou significativamente durante o período de análise e permaneceu em torno de -20 mV ( $r_{\text{Spearman}} = -0,21$ , correlação não significativa).

As variáveis relacionadas à atividade fotodinâmica da formulação AIFtCl-NP mantiveram-se estáveis durante os 60 dias. A Figura 23c mostra que a intensidade de

fluorescência manteve-se estável ( $r_{\text{Spearman}} = 0,25$ , correlação não significativa). Da mesma maneira, a produção de oxigênio singlete manteve-se entre 50 e 60 % da obtida com AIFtCl em etanol (Figura 23d) durante todo o tempo de análise, sendo que a variação deste parâmetro não foi significativa durante este período ( $r_{\text{Spearman}} = 0,43$ , correlação não significativa).

### 4.3 ATIVIDADE FOTODINÂMICA DE AIFtCl-NP EM SISTEMAS BIOLÓGICOS

#### 4.3.1 Células Neoplásicas Murinas 4T1 Incorporam mais Intensamente o AIFtCl-NP em Relação a Fibroblastos Não Neoplásicos NIH 3T3

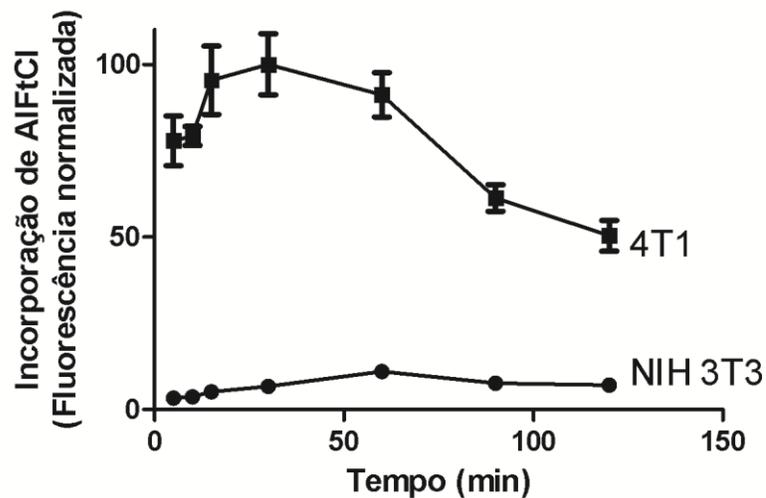


Figura 24. Perfil de incorporação, *in vitro*, de cloreto de alumínio-ftalocianina (AIFtCl) por células 4T1 e NIH 3T3 expostas ao AIFtCl associado a nanopartículas de PVM/MA por diferentes tempos. Resultados apresentados como média  $\pm$  E.P.M. para octuplicata.  $p < 0,001$  para todos os tempos, na comparação entre NIH 3T3 e 4T1.

As células neoplásicas 4T1 captam com maior avidéz o AIFtCl-NP em relação aos fibroblastos ( $p < 0,001$ ) (Figura 24). Para a 4T1, o pico de incorporação de AIFtCl-NP foi observado já entre 15 e 60 minutos, começando a decair após 60 minutos. Para a NIH 3T3, o máximo de incorporação foi observado em 60 minutos, seguindo-se então uma queda gradual. Vale ressaltar que as células neoplásicas 4T1 incorporaram cerca de 80 % mais AIFtCl-NP em relação às não neoplásicas NIH 3T3 em seu pico máximo.

Células não expostas ao AIFtCI-NP não apresentavam fluorescência, enquanto que a retenção de AIFtCI pelos poços das microplacas expostos ao AIFtCI-NP, mas sem células, foi constante em todos os tempos; esses valores foram subtraídos dos resultados obtidos a cada tempo para cada célula.

#### **4.3.2 O AIFtCI-NP Incorporado por Células Neoplásicas 4T1 Concentra-se no Citoplasma**

As imagens de microscopia confocal de células 4T1 expostas por 15 minutos ao AIFtCI-NP mostram claramente que há intensa internalização de AIFtCI (Figura 25), confirmando o resultado ilustrado na Figura 24. A Figura 25, em c e d, mostra que o AIFtCI, em vermelho, se dispersa em torno do núcleo, em azul, de maneira que o citoplasma da célula é preenchido por este fotossensibilizante. Não foi observado AIFtCI dentro do núcleo celular.

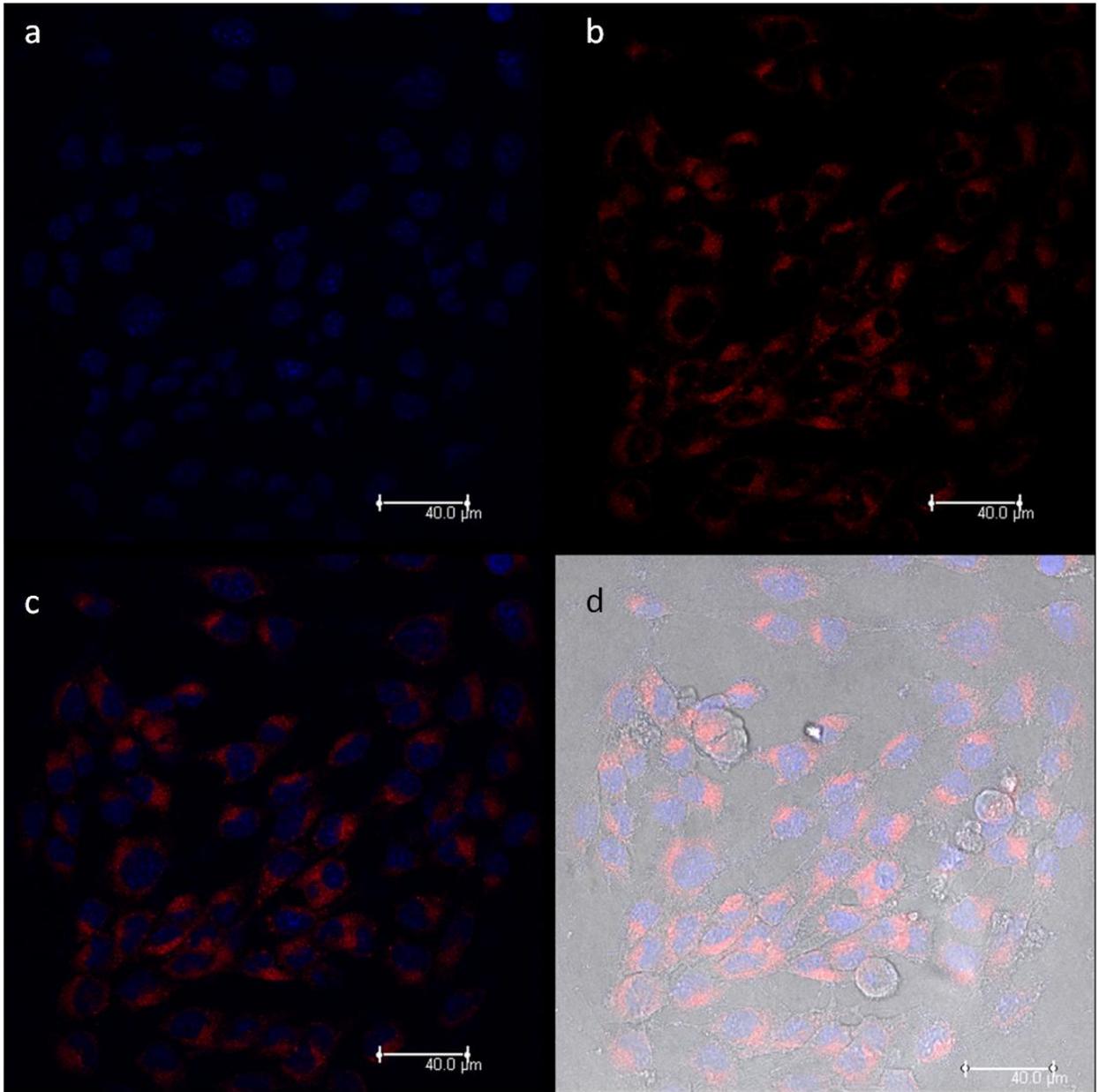


Figura 25. Fotomicrografia confocal mostrando a localização do cloreto de alumínio-ftalocianina (AlFtCl) em células 4T1 expostas à formulação de AlFtCl (0,25  $\mu\text{M}$ ) associado a nanopartículas de PVM/MA por 15 minutos, *in vitro*. a) núcleo celular (azul), b) AlFtCl (vermelho) no citoplasma celular, c) sobreposição de a e b, e d) sobreposição de c com o campo claro.

### 4.3.3 AIFtCl-NP Exerce Citotoxicidade Fotodinâmica contra Células Neoplásicas 4T1

A Figura 26 mostra que o AIFtCl-NP, mesmo na menor concentração testada, 0,25  $\mu\text{M}$ , exerceu citotoxicidade fotodinâmica contra células neoplásicas 4T1; a TFD induziu à morte 90 % destas células. Este resultado é significativamente superior ao apresentado pelas células não irradiadas ( $p < 0,001$ ). Apesar de as células NIH 3T3 terem sofrido intensa morte celular quando submetidas à TFD, sua viabilidade celular foi maior em comparação à apresentada pelas células neoplásicas 4T1 ( $p < 0,001$ ). No escuro, as células NIH 3T3 também foram menos sensíveis ao AIFtCl-NP em relação às 4T1 ( $p < 0,001$ ).

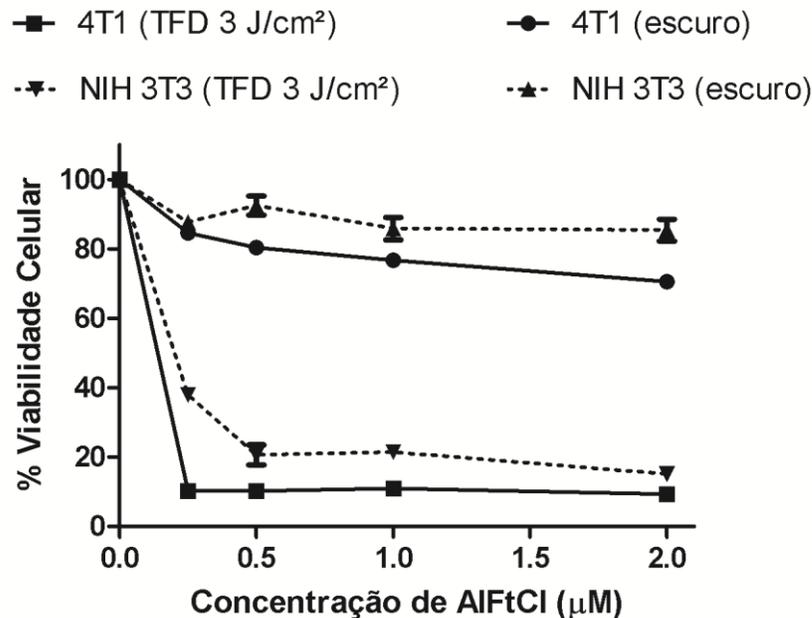


Figura 26. Citotoxicidade fotodinâmica (TFD 3 J/cm<sup>2</sup>) e no escuro pelo cloreto de alumínio-ftalocianina associado a nanopartículas de PVM/MA (AIFtCl-NP), em várias concentrações, em células 4T1 e NIH 3T3 mantidas *in vitro*.  $p < 0,001$  na comparação escuro vs TFD 3 J/cm<sup>2</sup>, para todas as células e em todas as concentrações de AIFtCl, exceto 0,0  $\mu\text{M}$ ;  $p < 0,001$  na comparação entre NIH 3T3 (TFD 3 J/cm<sup>2</sup>) e 4T1 (TFD 3 J/cm<sup>2</sup>), para todas as concentrações de AIFtCl-NP, exceto 0,0  $\mu\text{M}$ ;  $p < 0,001$  comparação entre NIH 3T3 (escuro) e 4T1 (escuro), para todas as concentrações de AIFtCl-NP, exceto 0,0 e 0,25  $\mu\text{M}$ . Não houve correlação estatisticamente significativa (Spearman) entre as variáveis viabilidade celular e concentração de AIFtCl para todas as células no escuro.

#### 4.3.4 TFD com AIFtCl-NP Promove Fragmentação de DNA em Células 4T1

A Figura 27 mostra que 47,0 % das células 4T1 submetidas à TFD 3 J/cm<sup>2</sup> apresentaram fragmentação de DNA, resultado similar ao encontrado com a TFD 27 J/cm<sup>2</sup> (44,6 %). Sob energia de irradiação intermediária, i.e., TFD 9 J/cm<sup>2</sup>, 69,7 % das células apresentaram fragmentação de DNA. Todos os protocolos de TFD, portanto, promoveram fragmentação de DNA ( $p < 0,001$  para TFD vs controle e vs AIFtCl-NP apenas).

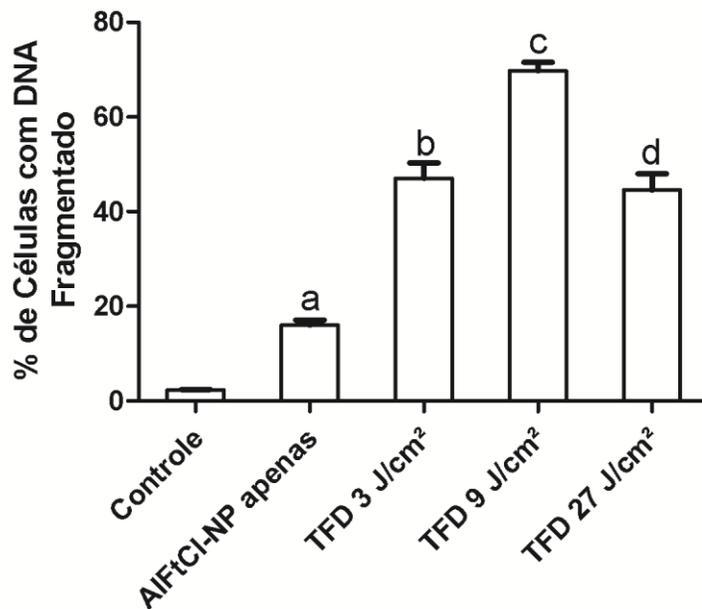


Figura 27. Porcentagem de células 4T1 apresentando DNA fragmentado após serem expostas ao cloreto de alumínio-ftalocianina associado a nanopartículas (AIFtCl-NP) apenas ou ao AIFtCl-NP mais irradiação com laser de  $\lambda$  de 670 nm com densidade de energia de 3, 9 ou 27 J/cm<sup>2</sup>. O controle consistiu de células 4T1 que não foram expostas nem ao laser nem ao AIFtCl-NP. Resultados apresentados como média  $\pm$  E.P.M. para triplicata. <sup>a</sup>  $p < 0,05$  vs controle; <sup>b</sup>  $p < 0,001$  vs controle e vs AIFtCl-NP apenas; <sup>c</sup>  $p < 0,001$  vs controle, vs AIFtCl-NP apenas e vs TFD 3 J/cm<sup>2</sup>; <sup>d</sup>  $p < 0,001$  vs controle, vs AIFtCl-NP apenas e vs TFD 9 J/cm<sup>2</sup>.

Foi também observada a presença de fragmentação de DNA em 16,0 % das células expostas ao AIFtCl-NP apenas, porém, esse resultado é significativamente inferior mesmo quando comparado à intensidade de energia mais baixa ( $p < 0,001$ ).

## 5 DISCUSSÃO

Terapias contra células patogênicas devem, idealmente, destruir totalmente estas e não exercer quaisquer efeitos deletérios sobre as células sadias do hospedeiro. Desta maneira estariam asseguradas a eficácia e a segurança da terapia. Porém, quanto mais próximos filogeneticamente forem a célula patogênica e a célula do hospedeiro, mais difícil será a tarefa de limitar os efeitos citotóxicos da terapia à primeira. Por exemplo, a proximidade filogenética entre humanos e fungos é maior do que entre bactérias e humanos, um fator que torna significativamente mais fácil desenvolver antibióticos do que fármacos antifúngicos seguros e eficazes (80). Geralmente, quanto maior a proximidade filogenética, menor a quantidade de alvos moleculares contra os quais podem ser desenvolvidos fármacos.

Quando as células patogênicas são neoplásicas, chega-se ao extremo da similaridade filogenética com o hospedeiro. As células neoplásicas têm sua origem a partir de células sadias, do próprio hospedeiro, que acumularam alterações genéticas suficientes para exibirem características de células neoplásicas (81). Portanto, várias das moléculas expressas em células sadias são também expressas em células neoplásicas. Várias características morfológicas e metabólicas verificadas em determinadas células sadias podem ser compartilhadas com células neoplásicas. Os graves efeitos colaterais verificados em terapias antineoplásicas estão, assim, significativamente relacionados à baixa especificidade da terapia contra sua célula-alvo (12).

A quimioterapia, uma das principais terapias antineoplásicas utilizadas na prática clínica, envolve um delicado balanço entre destruir as células neoplásicas e poupar as células sadias de seus efeitos citotóxicos indiscriminados (12). As abordagens não quimioterápicas, tais como a cirurgia e a radioterapia, também têm como um de seus principais inconvenientes a ineficácia em destruir ou remover totalmente as células neoplásicas enquanto poupam as sadias (12). Desta maneira, tem sido intensa a pesquisa para a elaboração de novos protocolos terapêuticos antineoplásicos, mais específicos contra células neoplásicas.

Dentre as terapias antineoplásicas, a TFD tem atraído a atenção de oncologistas por ser minimamente invasiva e altamente seletiva à massa tumoral (82). Estas características são devidas ao fato de a TFD ter como base o uso de três componentes inócuos quando isolados, mas com marcante potencial citotóxico quando combinados: FS, luz de comprimento de onda específico e oxigênio molecular (1). A geração de espécies oxidantes, especialmente o oxigênio singlete, que resulta da combinação destes três componentes, faz com que moléculas circunvizinhas ao local desta combinação, no raio de poucos nanômetros, sejam quimicamente modificadas (6). Este processo de oxidação de moléculas limita-se à célula-alvo na qual os três componentes da TFD foram combinados, não se alastrando, portanto, a outras células (10).

Desta maneira, a especificidade da TFD à massa tumoral pode ser aprimorada principalmente por meio do controle da área exposta à luz e da entrega seletiva do FS às células-alvo (82). Além disso, o efeito imunoestimulante observado após a TFD pode

fazer com que focos de metástase tumoral e células neoplásicas remanescentes no local de aplicação da TFD sejam por fim combatidos pelo sistema imunitário (83).

Assim, a eficácia e a segurança da TFD no tratamento de vários tipos de câncer têm sido semelhantes ou superiores às observadas com os tratamentos convencionais (13, 18). Outro aspecto que chama a atenção à TFD antineoplásica é o baixo custo da sua aplicação clínica em comparação aos observados com os procedimentos convencionais, tais como quimioterapia e cirurgia (84).

Porém, apesar de todas as suas vantagens, a TFD antineoplásica exhibe alguns inconvenientes, associados principalmente aos FS utilizados atualmente (34). Enquanto os FS de 1ª geração induzem prolongada fotossensibilização cutânea, os de 2ª geração são bastante hidrofóbicos, o que leva à sua agregação em meios aquosos com conseqüente perda de atividade fotodinâmica (44).

O presente trabalho foi conduzido com o AlFtCl, um FS de 2ª geração com as melhores propriedades fotodinâmicas, mas cuja hidrofobia impõe importantes limitações sobre o seu uso em sistemas biológicos (6, 17). A alta hidrofobia das ftalocianinas faz com que estas sejam inconvenientemente distribuídas por vários tecidos saudáveis do organismo ao invés de serem concentradas na massa tumoral (35, 39). Por outro lado, paradoxalmente, é a hidrofobia que faz com que estes FS de 2ª geração sejam rapidamente captados e retidos por longo tempo por células neoplásicas, de maneira que as tentativas de tornar estes fármacos mais hidrossolúveis acabaram reduzindo significativamente a sua eficácia (35).

Seria possível manter a hidrofobia do AIFtCl, necessária para a sua captação e retenção pelas células-alvo, mantendo ao mesmo tempo sua atividade fotodinâmica em meio aquoso e promovendo sua entrega seletiva às células tumorais? É na tentativa de encontrar respostas afirmativas a este tipo de questionamento que têm sido desenvolvidos os FS de 3<sup>a</sup> geração (44). A nanotecnologia, particularmente, tem servido de plataforma para a manutenção da atividade fotodinâmica de FS de 2<sup>a</sup> geração em meios aquosos e para a entrega seletiva destes à massa tumoral, por direcionamento ativo e/ou passivo (59), de maneira que a família dos FS de 3<sup>a</sup> geração vem agregando numerosos integrantes nanoestruturados (Figura 10, Seção 1.4) (49, 63).

A presente pesquisa seguiu essa tendência. Seu principal objetivo foi desenvolver uma nanopartícula que mantivesse a atividade fotodinâmica do AIFtCl em meio aquoso, promovesse a incorporação deste FS por células neoplásicas e apresentasse citotoxicidade fotodinâmica contra células neoplásicas. Além disso, esta nanoestrutura deveria apresentar características coloidais que conferissem à mesma potencial para o uso em estratégias de direcionamentos passivo e ativo a tumores. Estas características foram reunidas em uma única formulação, conforme discutido abaixo, de maneira que o resultado final deste estudo foi a obtenção de uma composição nanoestruturada com potencial para ser utilizado como um FS de 3<sup>a</sup> geração em terapia fotodinâmica antineoplásica.

O primeiro passo para a elaboração da formulação foi a escolha da matriz da nanopartícula à qual o AIFtCl seria associado. O copolímero PVM/MA foi escolhido com base em seis de suas características, quais sejam: 1) ser de baixo custo, 2) ser

biocompatível, 3) possuir grupamento químico – anidrido – que possibilita a fácil conjugação de uma gama de moléculas direcionadoras, 4) possuir características químicas que possibilitam a associação ao AlFtCl, 5) ser bioadesivo, 6) possibilitar controle da desintegração da nanopartícula por modificação química simples de sua estrutura. Algumas destas características foram discutidas em trabalhos anteriores (74, 85, 86).

O método mais descrito na literatura para a produção de nanopartículas a partir de PVM/MA é o da nanoprecipitação, cujo relato pode ser encontrado em trabalhos do grupo do pesquisador Irache (74, 85-87). Naqueles trabalhos é descrita a obtenção de nanopartículas puras de PVM/MA com diâmetro hidrodinâmico variando entre 158 e 279 nm. Essa faixa de diâmetros era compatível com o objetivo deste trabalho, pois nanopartículas com diâmetro hidrodinâmico menor que 400 nm servem ao direcionamento passivo pelo efeito de permeação e retenção aumentadas, EPR, de fármacos aos sítios tumorais (61), uma característica desejável para FS de 3ª geração (59).

Como a concentração em solução da massa precipitável afeta o diâmetro das nanopartículas formadas por nanoprecipitação (75, 76), o efeito da concentração de PVM/MA na solução acetônica (Figura 11) foi analisado para uma faixa de valores desta variável que compreendia concentrações maiores e menores em relação à utilizada em trabalhos anteriores (Figura 12) (74, 85-87). Com a concentração de PVM/MA de 20 mg/mL foi possível obter nanopartículas monodispersas e com diâmetro próximo de 200 nm, úteis ao direcionamento passivo por EPR, portanto. Concentrações maiores também possibilitaram obter nanopartículas monodispersas, porém com

diâmetro hidrodinâmico próximo ou acima do limite de 400 nm, imposto pelo EPR. Desta maneira foi determinada a nanoestrutura à qual o AIFtCl seria associado e, portanto, a concentração de 20 mg/mL de PVM/MA foi mantida nos passos seguintes de padronização do protocolo de preparo de AIFtCl-NP.

Chama a atenção o fato de o método de preparo das nanopartículas de PVM/MA ser de baixo custo energético, em contraste a outros métodos frequentemente utilizados, tais como a homogeneização sob alta pressão (76). A obtenção de uma população de nanopartículas tão monodispersa quanto a obtida neste estudo, com PDI próximo a zero, geralmente demanda grande dispêndio energético e passos adicionais morosos, tais como filtração e extrusão (76). Um ponto negativo deste protocolo, no entanto, é o uso de grandes quantidades de solventes orgânicos. Estes solventes são eliminados durante o processo de preparo das nanopartículas, gerando resíduos potencialmente danosos ao meio ambiente. Também é inconveniente o fato de que uma planta industrial deve ser dotada de infraestrutura especial para desenvolver processos que envolvam líquidos voláteis inflamáveis, tais como o etanol e a acetona, o que pode ser limitante no caso da produção industrial das nanopartículas aqui descritas.

O passo seguinte na padronização do processo foi a determinação das condições sob as quais o AIFtCl seria associado às nanopartículas. Este passo envolveu a análise do estado de agregação das moléculas de AIFtCl durante o processo e nas nanopartículas finais. A intensidade de emissão de fluorescência foi utilizada para indicar o nível de agregação do AIFtCl, sendo que quanto menor é este parâmetro, maior o estado de agregação (48).

Foi escolhida a adição do AIFtCl às nanopartículas pré-formadas suspensas no meio precipitante, visto que este FS é altamente fluorescente neste meio. Porém, apesar de o meio precipitante manter o AIFtCl desagregado, o meio aquoso que resta após a eliminação dos solventes orgânicos por destilação e o meio aquoso usado para suspender as nanopartículas promovem a agregação do AIFtCl. Este fenômeno reduz drasticamente a atividade fotodinâmica do AIFtCl e foi observado neste trabalho pela extinção de sua fluorescência característica, bem como pela redução da capacidade de geração de oxigênio singlete. Além disso, grandes agregados de AIFtCl não associados às nanopartículas poderiam permanecer na formulação final, pois o método utilizado para o isolamento das nanopartículas foi a centrifugação. A solução encontrada para este problema foi a adição de um surfactante, o Tween 20 (88), ao meio precipitante (Figura 13).

O Tween 20 não apenas reduziu a agregação do AIFtCl durante o processo de preparo de AIFtCl-NP, mas também fez com que a formulação final apresentasse maior rendimento quântico de fluorescência ( $\Phi F$ ) em relação à preparada na ausência de surfactante. Quanto maior for o  $\Phi F$ , maior é a atividade fotodinâmica (5). É interessante notar que este efeito foi dependente da concentração deste surfactante, sendo que foi atingido um *plateau* tanto de  $\Phi F$  da formulação final (Figura 15) quanto da perda de AIFtCl no processo em concentrações de Tween 20 em torno de 1,5 % (Figura 14).

O aumento do  $\Phi F$  da formulação final indicou que um percentual maior de AIFtCl na sua forma desagregada foi associado às nanopartículas devido à presença do Tween 20. Duas hipóteses não auto-excludentes podem ser levantadas a respeito deste efeito. A primeira é que o surfactante mantém o AIFtCl desagregado no momento

de sua associação às nanopartículas. A segunda é que, provavelmente, o efeito do Tween 20 é mantido mesmo na formulação final, após as etapas de lavagem das nanopartículas. A interação das porções hidrofóbicas do Tween 20 e do AIFtCl pode ser forte o suficiente para que, mesmo após as etapas de lavagem das nanopartículas, restem moléculas de surfactante associadas ao FS, evitando assim a agregação do AIFtCl já associado às nanopartículas.

A Figura 28 ilustra as possíveis formas pelas quais o AIFtCl pode se associar às nanopartículas – ligação covalente com formação de amida, ponte iônica e interações hidrofóbicas –, bem como a maneira como o Tween 20 pode permanecer na formulação de AIFtCl-NP após o seu preparo.

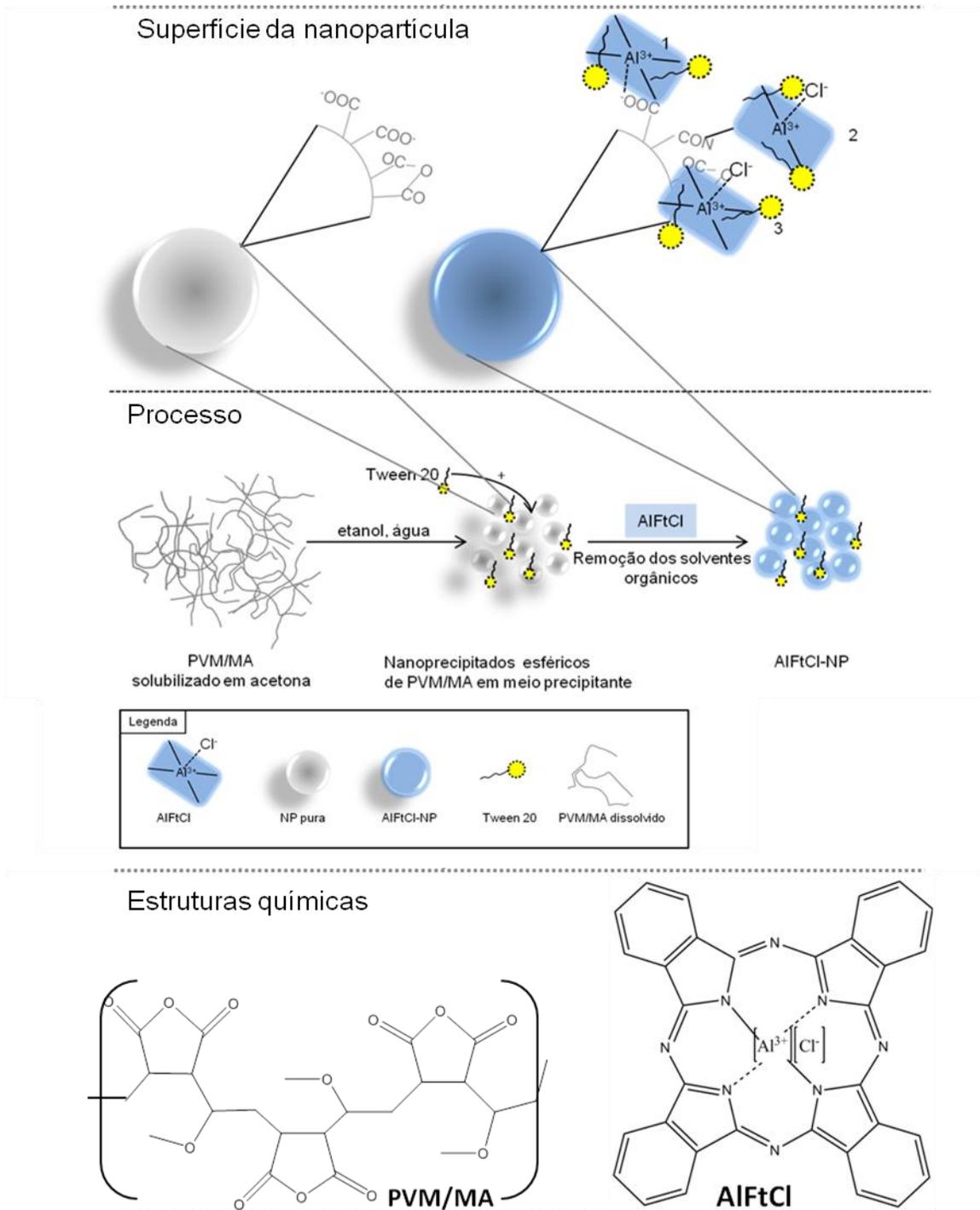


Figura 28. Ilustração das possíveis formas sob as quais o cloreto de alumínio-ftalocianina (AlFtCl) poderia estar associado às nanopartículas de PVM/MA (NP), formando AlFtCl-NP; 1 – ponte iônica entre carboxilato e alumínio, 2 – ligação covalente com formação de amida, 3 – interações hidrofóbicas. Na parte superior da figura são mostradas as estruturas básicas da ftalocianina e do PVM/MA. Também é representado, esquematicamente, o processo que leva à produção das nanopartículas.

Além da concentração do surfactante, a concentração de AIFtCl no meio precipitante interferiu significativamente no  $\Phi F$  da formulação final, mostrando que esta variável afeta o estado de agregação do AIFtCl no AIFtCl-NP (Figura 16). Possivelmente este efeito ocorre por dois motivos. Primeiro, o aumento da concentração do AIFtCl faz com que aumente a formação de agregados desta molécula em solução (48). Desta maneira, o aumento da concentração de AIFtCl pode fazer com que agregados deste FS sejam associados às nanopartículas, ao invés de monômeros, reduzindo o  $\Phi F$  da formulação final. Segundo, o emprego de altas concentrações de AIFtCl pode fazer com que a distância média entre as moléculas do FS associadas a uma mesma nanopartícula seja suficientemente pequena para que ocorra o efeito da extinção (*quenching*, em inglês). Este segundo fator já foi relatado na literatura. Em um trabalho realizado com silício-ftalocianina associada a nanomicelas poliméricas, observou-se que o aumento da razão ftalocianina/polímero era acompanhado de redução da emissão de fluorescência, evento relacionado ao efeito de extinção de fluorescência por proximidade entre as moléculas de FS (89). Neste mesmo trabalho foi observado que a redução da razão ftalocianina/polímero era acompanhada de queda na eficiência de associação (89). Este é outro inconveniente do uso de altas concentrações de AIFtCl que deve ser decorrente da saturação gradual dos limitados sítios de ligação da ftalocianina às nanopartículas.

Desta maneira, os resultados obtidos nos passos de padronização do protocolo de preparo da formulação final, AIFtCl-NP, revelaram as concentrações ideais de PVM/MA, de Tween 20 e de AIFtCl, para a obtenção de nanopartículas com alta fluorescência em meio aquoso e com tamanho que possibilita o direcionamento passivo

da nanoestrutura ao sítio tumoral pelo efeito de EPR. A concentração do copolímero que compõe a matriz da nanopartícula foi limitada pelo diâmetro desejado à nanopartícula, enquanto as concentrações de surfactante e de AIFtCl foram limitadas pela agregação do AIFtCl associado às nanopartículas na formulação final.

O AIFtCl-NP apresentou, em meio aquoso, os picos de fluorescência e de absorvância característicos do AIFtCl, apresentando um desvio batocrômico, i.e., em direção ao infravermelho, em relação aos observados em etanol (Figura 19). A emissão de fluorescência observada em cerca de 720 nm é devida a um artefato produzido pelo equipamento. A absorvância de luz em comprimentos de onda maiores é uma vantagem do AIFtCl-NP em relação ao AIFtCl livre, visto que comprimentos de onda maiores dentro da faixa entre 600 e 800 nm possuem maior poder de penetração em tecidos biológicos (16, 90). Porém, mais notável foi o fato de que tanto a absorvância quanto a intensidade de fluorescência mantiveram-se em torno de 50 % daquela observada em etanol. Este resultado chega a ser dez vezes maior do que o observado com AIFtCl associado a lipossomos (91) e quase duas mil vezes maior em relação ao AIFtCl livre em meio aquoso. A manutenção das propriedades fotofísicas no AIFtCl-NP foi confirmada pela manutenção da principal propriedade fotoquímica do AIFtCl útil à TFD, i.e., a produção de oxigênio singlete.

É interessante notar que, conforme mostram os espectros de transmitância no infravermelho (Figura 21), a desintegração das nanopartículas ocorre por hidrólise de grupamentos anidrido, evento que leva à geração de grupamentos carboxila no copolímero, tornando-o solúvel em água e desfazendo assim os nanoprecipitados que compõem o AIFtCl-NP. Essa desintegração ocorreu no período de poucas horas

(Figura 20), mas não levou a uma perda de atividade fotodinâmica da formulação, visto que a desintegração não foi acompanhada de perda de fluorescência (Figura 19), absorvância nem de geração fotoativada de oxigênio singlete (Figura 22).

Desta maneira, é possível inferir que o AIFtCl permanece associado ao copolímero mesmo após a hidrólise dos grupamentos anidrido do PVM/MA. Inclusive, é possível que ocorram rearranjos das moléculas de AIFtCl sobre o copolímero durante a solubilização deste. Por exemplo, sítios do copolímero escondidos no interior da nanopartícula, uma vez expostos, poderiam servir à ligação com AIFtCl de outras porções, aumentando a distância média entre as moléculas do FS. Também é possível que moléculas de AIFtCl próximas na superfície da nanopartícula sejam separadas no momento em que as cadeias do copolímero são alongadas durante a desintegração das nanopartículas. Esta hipótese poderia explicar a variação de fluorescência observada durante a desintegração da nanopartícula, culminando no interessante aumento de cerca de 10 % na intensidade de fluorescência da formulação totalmente desintegrada em relação ao AIFtCl-NP íntegro (Figura 20).

Vale aqui ressaltar que a manutenção da atividade fotodinâmica do FS após a desintegração da nanoestrutura, alcançada com a formulação AIFtCl-NP, tem sido difícil de obter com os sistemas nanoestruturados mais comuns, tais como os à base de PLGA (59, 73). Essa é uma vantagem que pode ser explorada em algumas estratégias de TFD, incluindo aquelas em que o FS é mantido sob a forma agregada até chegar ao seu sítio-alvo, onde a agregação é então desfeita e, portanto, o FS volta a ter atividade fotodinâmica. Uma revisão detalhada deste tipo de estratégia foi publicada recentemente (18).

Portanto, o AIFtCl-NP apresenta algumas importantes características necessárias a um FS de 3ª geração: seu diâmetro próximo a 200 nm e sua capacidade de manter as propriedades fotodinâmicas do AIFtCl em meio aquoso. Deste modo, o próximo passo foi verificar se o AIFtCl-NP seria incorporado por células em cultivo.

Os resultados obtidos revelaram que o AIFtCl-NP é incorporado por células neoplásicas e não neoplásicas (Figura 24). Esta captação pode ser decorrente da grande bioadesividade do copolímero PVM/MA, a qual se deve à presença de grupamentos carboxílicos em sua superfície, os quais são capazes de formar pontes de hidrogênio com moléculas da superfície celular (86). A presença destes grupamentos na superfície do AIFtCl-NP é evidenciada pelo potencial zeta negativo em pH fisiológico, bem como pelo espectro de transmitância no infravermelho, que mostra bandas de carboxilas. Entretanto, as células neoplásicas captaram muito mais intensamente o AIFtCl-NP do que as células não tumorais. Este resultado está de acordo com achados de trabalhos anteriores, que mostram que células neoplásicas captam nanopartículas mais avidamente em relação às células normais, um fato provavelmente devido à maior atividade endocítica e metabólica daquelas (92, 93).

A microscopia confocal mostrou que o AIFtCl-NP distribuiu-se apenas pelo citoplasma das células neoplásicas (Figura 25). A localização restrita ao citoplasma é conveniente, pois as espécies oxidantes geradas pela TFD não afetam o DNA nuclear; estas espécies se difundem por distâncias de poucos nanômetros a partir do seu sítio de geração. Assim, se o FS não atinge o núcleo, tampouco as espécies oxidantes fotogeradas, o DNA nuclear não é afetado pela TFD com AIFtCl-NP. De fato, já foi observado em diversos estudos que a genotoxicidade exercida pela TFD é baixa e que

danos oxidativos diretos ao DNA nuclear não contribuem para a citotoxicidade da TFD (1). Vale ressaltar que danos oxidativos ao DNA nuclear poderiam induzir alterações genéticas que, embora não letais, conferissem algum tipo de resistência às células neoplásicas. A localização limitada ao citoplasma também indicou que a formulação poderia apresentar alta citotoxicidade fotodinâmica, pois esta concentração citoplasmática permite danificar importantes estruturas localizadas neste compartimento da célula-alvo (1). Os danos causados a organelas, se extensos e irreversíveis, podem desencadear morte celular por apoptose, necrose ou autofagia (10).

De fato, a aplicação da TFD com a densidade de energia de  $3 \text{ J/cm}^2$  induziu morte nas células neoplásicas e não neoplásicas, conforme evidenciado pelo ensaio colorimétrico do MTT (Figura 26). Entretanto, a percentagem de morte foi mais pronunciada nas células neoplásicas em comparação à observada em células não neoplásicas; este resultado pode ser devido à maior incorporação do AIFtCI-NP pelas primeiras, conforme discutido anteriormente.

A intensa morte de células neoplásicas após a TFD foi acompanhada de um fenômeno interessante. A TFD com AIFtCI-NP induziu intensa fragmentação de DNA nestas células, chegando a ocorrer em cerca de 70 % das células irradiadas sob a densidade de energia de  $9 \text{ J/cm}^2$  (Figura 27). Este resultado deve-se provavelmente à ativação de endonucleases ativadas por caspases (94), ao invés de estar relacionada aos danos oxidativos diretos ao DNA nuclear decorrentes da TFD, uma vez que o AIFtCI-NP não foi observado no núcleo. Deste modo, a ativação das caspases deve ter

sido promovida por danos às organelas citoplasmáticas, um evento coerente com a localização citoplasmática do AIFtCI-NP.

Estes achados estão de acordo com estudos anteriormente publicados. Já foi observado que a indução de apoptose ocorre após a TFD com baixas densidades de energia, provavelmente em decorrência de danos causados em organelas como a mitocôndria e o retículo endoplasmático (95-97). A ativação de caspases leva à ativação de endonucleases, enzimas responsáveis pela fragmentação sistemática do DNA durante o processo de apoptose (94).

As células apresentando fragmentação de DNA estavam, provavelmente, em processo degenerativo. Vale lembrar que, no ensaio de fragmentação de DNA, apenas as células viáveis, aderidas, são analisadas, uma vez que as células mortas são descartadas durante o processo de lavagem. Assim pode ser explicado o fato de a porcentagem de morte celular não ter sido semelhante à porcentagem de células apresentando fragmentação de DNA.

A porcentagem de fragmentação de DNA caiu para cerca de 50 % com a irradiação com 27 J/cm<sup>2</sup> em comparação à verificada com a de 9 J/cm<sup>2</sup>. A menor porcentagem de células apresentando fragmentação de DNA após TFD com a maior densidade de energia também pode ter relação com o tipo de morte celular sofrida por estas.

Quando há necrose, geralmente pouca ou nenhuma fragmentação de DNA é observada em até 24 horas (98). Desta maneira, a menor fragmentação de DNA verificada nas células expostas à maior densidade de energia de irradiação pode ser

devida ao aumento da ocorrência de morte celular por necrose. A necrose acontece quando há dano à membrana citoplasmática (95, 99), evento que já foi observado em trabalhos anteriores após TFD com irradiação sob altas densidades de energia (95).

Porém, mesmo que as células neoplásicas tenham sido mais afetadas pela TFD com AIFtCI-NP, vale ressaltar que células não neoplásicas apresentaram baixa viabilidade celular após a TFD, mostrando que, como o esperado, a atividade fotodinâmica desta formulação não se restringe às células neoplásicas. Assim, há a necessidade de aumentar a especificidade das nanopartículas à massa tumoral. Neste sentido, apesar de não terem sido exploradas neste trabalho, as estratégias de direcionamento ativo podem ser úteis para melhorar a segurança da formulação. A nanopartícula de PVM/MA, particularmente, apresenta características que a tornam uma potencial candidata a modificações que levem a este tipo de direcionamento.

Primeiramente, os grupamentos anidrido do copolímero PVM/MA reagem prontamente com aminas primárias e grupamentos hidroxila, presentes na maioria das moléculas de direcionamento, de maneira que procedimentos simples e de baixo dispêndio energético podem ser utilizados para a conjugação destas moléculas à superfície das nanopartículas. Esta característica tem sido perseguida no desenvolvimento de carreadores nanoestruturados de fármacos (86), inclusive para o desenvolvimento de FS de 3ª geração (59, 100, 101). Já foram desenvolvidas nanopartículas de PVM/MA recobertas com tiamina, vitamina B<sub>12</sub> e diversas proteínas, por exemplo, todos ligados através de procedimentos simples, viáveis pela presença dos grupamentos anidrido do PVM/MA (85, 102-104).

Também vale ressaltar que as pontes de hidrogênio formadas entre carboxilatos da superfície das nanopartículas de PVM/MA e moléculas da célula-alvo podem ser coadjuvantes da interação específica promovida pelas moléculas de direcionamento. Desta maneira, a interação pode ser reforçada pelas pontes de hidrogênio formadas entre superfície das nanopartículas de PVM/MA e a célula-alvo, facilitando a incorporação do FS por esta. Nos casos em que for necessário reduzir a bioadesividade das nanopartículas – para reduzir, por exemplo, a captação destas pelo sistema reticuloendotelial –, há a possibilidade de modificar a superfície da nanopartícula com aminas ou alcoóis, por exemplo, para reduzir a quantidade de grupamentos carboxilatos na sua superfície (86).

Desta maneira, a eficácia do AIFtCI-NP demonstrada neste estudo, juntamente com as características únicas desta formulação, oferecem a perspectiva de que esta seja utilizada como um fotossensibilizante de 3ª geração na TFD. Além disso, seu potencial para a associação de moléculas de direcionamento a coloca no rol de potenciais plataformas para o direcionamento ativo de FSs às células-alvo.

## 6 CONCLUSÕES

Os resultados expostos neste trabalho permitem concluir que:

1. foi obtida uma formulação de nanopartículas de poli(vinil,metil-éter-co-anidrido maleico) associadas ao cloreto de alumínio-ftalocianina (AlFtCl-NP), com diâmetro hidrodinâmico menor que 400 nm, próximo a 200 nm;
2. o AlFtCl-NP apresenta intensa fluorescência e absorbância na região do espectro eletromagnético útil à terapia fotodinâmica antineoplásica, em ambiente aquoso;
3. o AlFtCl-NP gera oxigênio singlete quando irradiado com luz de comprimento de onda de 670 nm, mesmo em ambiente aquoso;
4. a desintegração do AlFtCl-NP ocorre em poucas horas, por meio da hidrólise de grupamentos anidrido, mas sem afetar a sua atividade fotodinâmica – fluorescência, absorbância e produção de oxigênio singlete;
5. o AlFtCl-NP, quando congelado, mantém sua atividade fotodinâmica e suas características coloidais por no mínimo 60 dias;
6. células neoplásicas captam mais avidamente o AlFtCl-NP em relação a células não neoplásicas;
7. o AlFtCl-NP concentra-se no citoplasma de células neoplásicas;
8. o AlFtCl-NP apresentou citotoxicidade fotodinâmica contra células neoplásicas que foi mais intensa do que a exercida sobre células não neoplásicas;
9. a TFD com AlFtCl-NP induziu fragmentação de DNA em células neoplásicas.

## REFERÊNCIAS

1. Macdonald IJ, Dougherty TJ. Basic principles of photodynamic therapy. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*. 2001;5(2):105-29.
2. Foote CS. In *Porphyrin Localization and Treatment of Tumors*. Doiron DR, Gomer CJ, editors. New York: Alan R. Liss; 1984: 301-314.
3. DeRosa MC, Crutchley RJ. Photosensitized singlet oxygen and its applications. *Coordination Chemistry Reviews*. 2002;233:351-71.
4. Weishaupt KR, Gomer CJ, Dougherty TJ. Identification of singlet oxygen as the cytotoxic agent in photo-inactivation of a murine tumor. *Cancer research*. 1976;36(7):2326.
5. Celli JP, Spring BQ, Rizvi I, Evans CL, Samkoe KS, Verma S, et al. Imaging and photodynamic therapy: mechanisms, monitoring, and optimization. *Chemical reviews*. 2010;110(5):2795-838.
6. Bonnett R. Photosensitizers of the porphyrin and phthalocyanine series for photodynamic therapy. *Chem Soc Rev*. 1995;24(1):19-33.
7. Schweitzer C, Schmidt R. Physical mechanisms of generation and deactivation of singlet oxygen. *Chemical reviews*. 2003;103(5):1685-758.
8. Moan J. On the diffusion length of singlet oxygen in cells and tissues. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 1990;6(3):343-4.
9. Henderson BW, Waldow SM, Mang TS, Potter WR, Malone PB, Dougherty TJ. Tumor destruction and kinetics of tumor cell death in two experimental mouse tumors following photodynamic therapy. *Cancer research*. 1985;45(2):572.
10. Firczuk M, Nowis D, Golab J. PDT-induced inflammatory and host responses. *Photochemical & Photobiological Sciences*. 2011;10(5):653-63.
11. Kübler A, De Carpentier J, Hopper C, Leonard A, Putnam G. Treatment of squamous cell carcinoma of the lip using Foscan-mediated photodynamic therapy. *International journal of oral and maxillofacial surgery*. 2001;30(6):504-9.
12. Sharman WM, Allen CM, Van Lier JE. Photodynamic therapeutics: basic principles and clinical applications. *Drug Discovery Today*. 1999;4(11):507-17.

13. Yano S, Hirohara S, Obata M, Hagiya Y, Ogura S-i, Ikeda A, et al. Current states and future views in photodynamic therapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*. 2011;12(1):46-67.
14. Detty MR, Gibson SL, Wagner SJ. Current clinical and preclinical photosensitizers for use in photodynamic therapy. *Journal of medicinal chemistry*. 2004;47(16):3897-915.
15. Wan S, Parrish JA, Anderson R, Madden M. Transmittance of nonionizing radiation in human tissues. *Photochemistry and photobiology*. 1981;34(6):679-81.
16. Dougherty TJ, Marcus SL. Photodynamic therapy. *European Journal of Cancer*. 1992;28(10):1734-42.
17. O'Connor AE, Gallagher WM, Byrne AT. Porphyrin and nonporphyrin photosensitizers in oncology: preclinical and clinical advances in photodynamic therapy. *Photochemistry and photobiology*. 2009;85(5):1053-74.
18. Lovell JF, Liu TWB, Chen J, Zheng G. Activatable photosensitizers for imaging and therapy. *Chemical reviews*. 2010;110(5):2839-57.
19. Mellish KJ, Cox RD, Vernon DI, Griffiths J, Brown SB. In Vitro Photodynamic Activity of a Series of Methylene Blue Analogues¶. *Photochemistry and photobiology*. 2002;75(4):392-7.
20. Delaey E, van Laar F, De Vos D, Kamuhabwa A, Jacobs P, de Witte P. A comparative study of the photosensitizing characteristics of some cyanine dyes. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2000;55(1):27-36.
21. Atzpodien J, Gulati SC, Clarkson BD. Comparison of the cytotoxic effects of merocyanine-540 on leukemic cells and normal human bone marrow. *Cancer research*. 1986;46(10):4892.
22. Gorman A, Killoran J, O'Shea C, Kenna T, Gallagher WM, Donal FOS. In vitro demonstration of the heavy-atom effect for photodynamic therapy. *Journal of the American Chemical Society*. 2004;126(34):10619-31.
23. Kubin A, Wierrani F, Burner U, Alth G, Grunberger W. Hypericin-the facts about a controversial agent. *Current pharmaceutical design*. 2005;11(2):233-53.
24. Juzeniene A, Peng Q, Moan J. Milestones in the development of photodynamic therapy and fluorescence diagnosis. *Photochem Photobiol Sci*. 2007;6(12):1234-45.

25. Brown S, Vernon D, Holroyd J, Marcus S, Trust R, Hawkins W, et al. Pharmacokinetics of Photofrin in man. *Photodynamic Therapy and Biomedical Lasers* Amsterdam, Elsevier. 1992:475–9.
26. Allison RR, Bagnato VS, Cuenca R, Downie GH, Sibata CH. The future of photodynamic therapy in oncology. *Future Oncology*. 2006;2(1):53-71.
27. Magda D, Miller RA, editors. Motexafin gadolinium: a novel redox active drug for cancer therapy; 2006;16(6):466-476.
28. Stockert J, Canete M, Juarranz A, Villanueva A, Horobin R, Borrell J, et al. Porphycenes: facts and prospects in photodynamic therapy of cancer. *Current medicinal chemistry*. 2007;14(9):997-1026.
29. Guardiano M, Biolo R, Jori G, Schaffner K. Tetra-n-propylporphycene as a tumour localizer: pharmacokinetic and phototherapeutic studies in mice. *Cancer letters*. 1989;44(1):1-6.
30. Trachtenberg J, Weersink RA, Davidson SRH, Haider MA, Bogaards A, Gertner MR, et al. Vascular targeted photodynamic therapy (padoporphin, WST09) for recurrent prostate cancer after failure of external beam radiotherapy: a study of escalating light doses. *BJU international*. 2008;102(5):556-62.
31. Trachtenberg J, Bogaards A, Weersink R, Haider M, Evans A, McCluskey S, et al. Vascular targeted photodynamic therapy with palladium-bacteriopheophorbide photosensitizer for recurrent prostate cancer following definitive radiation therapy: assessment of safety and treatment response. *The Journal of urology*. 2007;178(5):1974-9.
32. Forsyth TP, Nurco DJ, Pandey RK, Smith KM. Synthesis and structure of a 5, 15-bis (4-pyridyl) purpurin. *Tetrahedron letters*. 1995;36(50):9093-6.
33. Braathen LR, Szeimies RM, Basset-Seguin N, Bissonnette R, Foley P, Pariser D, et al. Guidelines on the use of photodynamic therapy for nonmelanoma skin cancer: an international consensus. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2007;56(1):125-43.
34. Wainwright M. Photodynamic therapy: the development of new photosensitisers. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry)*. 2008;8(3):280-91.

35. Chan WS, Marshall JF, Svensen R, Bedwell J, Hart IR. Effect of sulfonation on the cell and tissue distribution of the photosensitizer aluminum phthalocyanine. *Cancer research*. 1990;50(15):4533.
36. Miller JD, Baron ED, Scull H, Hsia A, Berlin JC, McCormick T, et al. Photodynamic therapy with the phthalocyanine photosensitizer Pc 4: the case experience with preclinical mechanistic and early clinical-translational studies. *Toxicology and applied pharmacology*. 2007;224(3):290-9.
37. Li H, Jensen TJ, Fronczek FR, Vicente MGH. Syntheses and properties of a series of cationic water-soluble phthalocyanines. *Journal of medicinal chemistry*. 2008;51(3):502-11.
38. Darwent JR, Douglas P, Harriman A, Porter G, Richoux MC. Metal phthalocyanines and porphyrins as photosensitizers for reduction of water to hydrogen. *Coord Chem Rev*. 1982;44(1):837126.
39. Chan W, Marshall J, Lam G, Hart I. Tissue uptake, distribution, and potency of the photoactivatable dye chloroaluminum sulfonated phthalocyanine in mice bearing transplantable tumors. *Cancer Res;(United States)*. 1988;48(11): 3040-4.
40. Brasseur N, Ali H, Langlois R, Van Lier JE. BIOLOGICAL ACTIVITIES OF PHTHALOCYANINES–VII. PHOTOINACTIVATION OF V 79 CHINESE HAMSTER CELLS BY SELECTIVELY SULFONATED GALLIUM PHTHALOCYANINES. *Photochemistry and photobiology*. 1987;46(5):739-44.
41. Boyle R, Paquette B, Van Lier J. Biological activities of phthalocyanines. XIV. Effect of hydrophobic phthalimidomethyl groups on the in vivo phototoxicity and mechanism of photodynamic action of sulphonated aluminium phthalocyanines. *British journal of cancer*. 1992;65(6):813.
42. Paquette B, Boyle RW, Ali H, MacLennan AH, Truscott TG, Lier JE. Sulfonated phthalimidomethyl aluminum phthalocyanine: the effect of hydrophobic substituents on the in vitro phototoxicity of phthalocyanines. *Photochemistry and photobiology*. 1991;53(3):323-7.
43. Leung S, Lo P. Photodynamic activity of BAM SiPc, an unsymmetrical bisamino silicon (IV) phthalocyanine, in tumour bearing nude mice. *British journal of pharmacology*. 2008;154(1):4-12.

44. Josefsen L, Boyle R. Photodynamic therapy: novel third generation photosensitizers one step closer? *British journal of pharmacology*. 2008;154(1):1-3.
45. Hudson R, Carcenac M, Smith K, Madden L, Clarke O, Pelegri A, et al. The development and characterisation of porphyrin isothiocyanate–monoclonal antibody conjugates for photoimmunotherapy. *British journal of cancer*. 2005;92(8):1442-9.
46. Castano AP, Demidova TN, Hamblin MR. Mechanisms in photodynamic therapy: Part three--Photosensitizer pharmacokinetics, biodistribution, tumor localization and modes of tumor destruction. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 2005;2(2):91-106.
47. Lu HL, Syu WJ, Nishiyama N, Kataoka K, Lai PS. Dendrimer Phthalocyanine-encapsulated Polymeric Micelle-mediated Photochemical Internalization Extends the Efficacy of Photodynamic Therapy and Overcome the Drug-resistance in Vivo. *Journal of Controlled Release*. 2011;155(3):458-464.
48. Nunes S, Sguilla F, Tedesco A. Photophysical studies of zinc phthalocyanine and chloroaluminum phthalocyanine incorporated into liposomes in the presence of additives. *Brazilian journal of medical and biological research*. 2004;37(2):273-84.
49. Muehlmann L, Joanitti G, Silva J, Longo J, Azevedo R. Liposomal photosensitizers: potential platforms for anticancer photodynamic therapy. *Brazilian journal of medical and biological research*. 2011;44(8):729-37.
50. Kreuter J. Nanoparticles--a historical perspective. *International journal of pharmaceutics*. 2007;331(1):1-10.
51. Zhang L, Gu F, Chan J, Wang A, Langer R, Farokhzad O. Nanoparticles in medicine: therapeutic applications and developments. *Clinical pharmacology and therapeutics*. 2008;83(5):761-9.
52. Kreuter J, Swarbrick J, Boylan J. *Encyclopedia of Pharmaceutical technology*. John Wiley. 1994.
53. Nalwa HS. *Encyclopedia of nanoscience and nanotechnology*. American Scientific Publishers Stevenson Ranch, CA; 2004.
54. Fattal E, Vauthier C. *Drug Delivery: Nanoparticles*. *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*. John Wiley. 2006.

55. Brasseur F, Couvreur P, Kante B, Deckers-Passau L, Roland M, Deckers C, et al. Actinomycin D adsorbed on polymethylcyanoacrylate nanoparticles: increased efficiency against an experimental tumor. *European Journal of Cancer* (1965). 1980;16(11):1441-5.
56. Couvreur P, Grislain L, Lenaerts V, Brasseur F, Guiot P, Biernacki A. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug carrier for antitumor agents. *Polymeric Nanoparticles and Microspheres*, CRC Press, Boca Raton, FL. 1986:27-93.
57. Maeda H, Matsumura Y. Tumorotropic and lymphotropic principles of macromolecular drugs. *Critical reviews in therapeutic drug carrier systems*. 1989;6(3):193.
58. Brannon-Peppas L, Blanchette JO. Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2004;56(11):1649-59.
59. Paszko E, Ehrhardt C, Senge MO, Kelleher DP, Reynolds JV. Nanodrug applications in photodynamic therapy. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 2011;8(1):14-29.
60. Xiang T-X, Anderson BD. Liposomal drug transport: A molecular perspective from molecular dynamics simulations in lipid bilayers. *Advanced Drug Delivery Reviews*. [doi: 10.1016/j.addr.2006.09.002]. 2006;58(12-13):1357-78.
61. Yuan F, Dellian M, Fukumura D, Leunig M, Berk DA, Torchilin VP, et al. Vascular permeability in a human tumor xenograft: molecular size dependence and cutoff size. *Cancer research*. 1995;55(17):3752.
62. Torchilin VP. Targeted pharmaceutical nanocarriers for cancer therapy and imaging. *The AAPS journal*. 2007;9(2):128-47.
63. ISI. Web of Knowledge. [acessado em 19 de outubro de 2011]; Disponível em: [http://apps.webofknowledge.com/WOS\\_GeneralSearch\\_input.do?product=WOS&search\\_mode=GeneralSearch&SID=3DfKAp96hJeAMemPmn1&preferencesSaved=](http://apps.webofknowledge.com/WOS_GeneralSearch_input.do?product=WOS&search_mode=GeneralSearch&SID=3DfKAp96hJeAMemPmn1&preferencesSaved=).
64. Zhang GD, Harada A, Nishiyama N, Jiang DL, Koyama H, Aida T, et al. Polyion complex micelles entrapping cationic dendrimer porphyrin: effective photosensitizer for photodynamic therapy of cancer\* 1. *Journal of Controlled Release*. 2003;93(2):141-50.

65. Cheng Y, C. Samia A, Meyers JD, Panagopoulos I, Fei B, Burda C. Highly efficient drug delivery with gold nanoparticle vectors for in vivo photodynamic therapy of cancer. *Journal of the American Chemical Society*. 2008;130(32):10643-7.
66. Zhao B, Yin JJ, Bilski PJ, Chignell CF, Roberts JE, He YY. Enhanced photodynamic efficacy towards melanoma cells by encapsulation of Pc4 in silica nanoparticles. *Toxicology and applied pharmacology*. 2009;241(2):163-72.
67. Ricci-Júnior E, Marchetti JM. Preparation, characterization, photocytotoxicity assay of PLGA nanoparticles containing zinc (II) phthalocyanine for photodynamic therapy use. *Journal of microencapsulation*. 2006;23(5):523-38.
68. Konan Y, Chevallier J, Gurny R, Allémann E. Encapsulation of p THPP into Nanoparticles: Cellular Uptake, Subcellular Localization and Effect of Serum on Photodynamic Activity¶. *Photochemistry and photobiology*. 2003;77(6):638-44.
69. Qin M, Hah HJ, Kim G, Nie G, Lee YEK, Kopelman R. Methylene blue covalently loaded polyacrylamide nanoparticles for enhanced tumor-targeted photodynamic therapy. *Photochem Photobiol Sci*. 2011;(10): 832-841.
70. Chatterjee DK, Fong LS, Zhang Y. Nanoparticles in photodynamic therapy: An emerging paradigm. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2008;60(15):1627-37.
71. Stuchinskaya T, Moreno M, Cook MJ, Edwards DR, Russell DA. Targeted photodynamic therapy of breast cancer cells using antibody–phthalocyanine–gold nanoparticle conjugates. *Photochem Photobiol Sci*. 2011: 822-831.
72. Konan YN, Cerny R, Favet J, Berton M, Gurny R, Allémann E. Preparation and characterization of sterile sub-200 nm meso-tetra (4-hydroxylphenyl) porphyrin-loaded nanoparticles for photodynamic therapy. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*. 2003;55(1):115-24.
73. Vargas A, Eid M, Fanchaouy M, Gurny R, Delie F. In vivo photodynamic activity of photosensitizer-loaded nanoparticles: formulation properties, administration parameters and biological issues involved in PDT outcome. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*. 2008;69(1):43-53.
74. Gomez S, Gamazo C, Roman BS, Vauthier C, Ferrer M, Irache JM. Development of a novel vaccine delivery system based on Gantrez nanoparticles. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. 2006;9(10):3283-9.

75. Schubert S, Delaney Jr JT, Schubert US. Nanoprecipitation and nanoformulation of polymers: from history to powerful possibilities beyond poly (lactic acid). *Soft Matter*. 2010.
76. Aubry J, Ganachaud F, Cohen Addad JP, Cabane B. Nanoprecipitation of polymethylmethacrylate by solvent shifting: 1. Boundaries. *Langmuir*. 2009;25(4):1970-9.
77. Li Y, Lee PI. A new bioerodible system for sustained local drug delivery based on hydrolytically activated in situ macromolecular association. *International journal of pharmaceutics*. 2010;383(1-2):45-52.
78. Alley MC, Scudiero DA, Monks A, Hursey ML, Czerwinski MJ, Fine DL, et al. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer research*. 1988;48(3):589.
79. Joanitti GA, Azevedo RB, Freitas SM. Apoptosis and lysosome membrane permeabilization induction on breast cancer cells by an anticarcinogenic Bowman-Birk protease inhibitor from *Vigna unguiculata* seeds. *Cancer letters*. 2010;293(1):73-81.
80. Denning DW, Hope WW. Therapy for fungal diseases: opportunities and priorities. *Trends in Microbiology*. 2010;18(5):195-204.
81. Hanahan D, Weinberg Robert A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*. 144(5):646-74.
82. Chiaviello A, Postiglione I, Palumbo G. Targets and Mechanisms of Photodynamic Therapy in Lung Cancer Cells: A Brief Overview. *Cancers*. 2011;3(1):1014-41.
83. Brackett CM, Gollnick SO. Photodynamic therapy enhancement of anti-tumor immunity. *Photochem Photobiol Sci*. 2011.
84. Hopper C, Niziol C, Sidhu M. The cost-effectiveness of Foscan mediated photodynamic therapy (Foscan-PDT) compared with extensive palliative surgery and palliative chemotherapy for patients with advanced head and neck cancer in the UK. *Oral oncology*. 2004;40(4):372-82.
85. Gómez S, Gamazo C, Roman BS, Ferrer M, Sanz ML, Irache JM. Gantrez® AN nanoparticles as an adjuvant for oral immunotherapy with allergens. *Vaccine*. 2007;25(29):5263-71.

86. Irache JM, Huici M, Konecny M, Espuelas S, Campanero MA, Arbos P. Bioadhesive properties of Gantrez nanoparticles. *Molecules*. 2005;10(1):126-45.
87. Arbós P, Wirth M, Arangoa M, Gabor F, Irache J. Gantrez® AN as a new polymer for the preparation of ligand-nanoparticle conjugates. *Journal of Controlled Release*. 2002;83(3):321-30.
88. Shin MJ, Park JY, Park K, Song SH, Yoo YJ. Novel sol-gel immobilization of horseradish peroxidase employing a detergentless micro-emulsion system. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 2007; 12(6):640-5.
89. Master AM, Rodriguez ME, Kenney ME, Oleinick NL, Gupta AS. Delivery of the photosensitizer Pc 4 in PEG–PCL micelles for in vitro PDT studies. *Journal of pharmaceutical sciences*. 2010; 99(5):2386-98.
90. Dougherty TJ. A brief history of clinical photodynamic therapy development at Roswell Park Cancer Institute. *Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery*. 1996;14(5):219-21.
91. Longo JPF. Avaliação da aplicação da terapia fotodinâmica mediada pela alumínio-cloro-ftalocianina em formulação lipossomal sobre o câncer bucal em modelos experimentais in vivo e in vitro. Tese. 2009.
92. Konan-Kouakou YN, Boch R, Gurny R, Allemann E. In vitro and in vivo activities of verteporfin-loaded nanoparticles. *Journal of Controlled Release*. 2005;103(1):83-91.
93. Hu Z, Pan Y, Wang J, Chen J, Li J, Ren L. Meso-tetra (carboxyphenyl) porphyrin (TCPP) nanoparticles were internalized by SW480 cells by a clathrin-mediated endocytosis pathway to induce high photocytotoxicity. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2009;63(2):155-64.
94. Savill J, Fadok V. Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature*. 2000:784-8.
95. Luo Y, Kessel D. Initiation of apoptosis versus necrosis by photodynamic therapy with chloroaluminum phthalocyanine. *Photochemistry and photobiology*. 1997;66(4):479-83.
96. Agostinis P, Buytaert E, Breysens H, Hendrickx N. Regulatory pathways in photodynamic therapy induced apoptosis. *Photochem Photobiol Sci*. 2004;3(8):721-9.

97. Buytaert E, Dewaele M, Agostinis P. Molecular effectors of multiple cell death pathways initiated by photodynamic therapy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*. 2007;1776(1):86-107.
98. Kressel M, Groscurth P. Distinction of apoptotic and necrotic cell death by in situ labelling of fragmented DNA. *Cell and Tissue Research*. 1994;278(3):549-56.
99. Charriaut-Marlangue C, Margail I, Represa A, Popovici T, Plotkine M, Ben-Ari Y. Apoptosis and necrosis after reversible focal ischemia: an in situ DNA fragmentation analysis. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 1996;16(2):186-95.
100. Kateb B, Chiu K, Black KL, Yamamoto V, Khalsa B, Ljubimova JY, et al. Nanoplatforams for constructing new approaches to cancer treatment, imaging, and drug delivery: What should be the policy? *Neuroimage*. 2011;54(1):S106-S124.
101. Roy I, Ohulchanskyy TY, Pudavar HE, Bergey EJ, Oseroff AR, Morgan J, et al. Ceramic-based nanoparticles entrapping water-insoluble photosensitizing anticancer drugs: a novel drug-carrier system for photodynamic therapy. *Journal of the American Chemical Society*. 2003;125(26):7860-5.
102. Salman HH, Gamazo C, Agüeros M, Irache JM. Bioadhesive capacity and immunoadjuvant properties of thiamine-coated nanoparticles. *Vaccine*. 2007;25(48):8123-32.
103. Salman HH, Gamazo C, de Smidt PC, Russell-Jones G, Irache JM. Evaluation of Bioadhesive Capacity and Immunoadjuvant Properties of Vitamin B 12-Gantrez Nanoparticles. *Pharmaceutical research*. 2008;25(12):2859-68.
104. Salman HH, Irache JM, Gamazo C. Immunoadjuvant capacity of flagellin and mannosamine-coated poly (anhydride) nanoparticles in oral vaccination. *Vaccine*. 2009;27(35):4784-90.