



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

KAREN RAPP PY-DANIEL

Desenvolvimento e aplicação biológica de  
nanossistemas contendo o fotossensibilizante cloreto  
de alumínio ftalocianina

BRASÍLIA

2017

KAREN RAPP PY-DANIEL

Desenvolvimento e aplicação biológica de  
nanossistemas contendo o fotossensibilizante cloreto  
de alumínio ftalocianina

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, como parte integrante dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Biologia Animal.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Bentes de Azevedo

BRASÍLIA

2017

## AGRADECIMENTOS

*Ao professor Ricardo Bentes de Azevedo, pela figura imensamente querida que você se tornou para mim nestes tantos anos trabalhando juntos. Sua autenticidade e carisma me marcaram e me inspiram.*

*Ao pesquisador Sergio Moya por permitir que parte deste trabalho fosse realizado no CIC biomaGUNE, Espanha, sobre sua orientação. Aos diversos pesquisadores do CIC biomaGUNE que me auxiliaram. Dentre eles: Jordi Llop, Vanessa Gómez-Vallejo, Javier Calvo, Nikolaos Politakos e Bogusław Szczupak,*

*Aos professores Maria del Puerto e Sabino Veintemillas-Verdaguer por me permitirem utilizar a estrutura de seus laboratórios e pelo acesso às diversas nanopartículas magnéticas com que trabalhei no presente estudo.*

*Aos professores Osmino Rodrigues e Carlos M. Infante pelos diversos auxílios cromatográficos ao longo destes tantos anos.*

*À Universidade de Brasília, que como Instituição de Ensino, muito me ensinou, tanto como aluna, quanto como funcionária. Em especial ao Departamento de Genética e Morfologia e todos os professores que o compõem por me permitir estudar com dedicação, ao ponto de aceitar que me afastasse por um ano para a realização do doutorado sanduíche.*

*À muito querida Zélia, companheira de trabalho e amiga, que me serve de referência de dedicação e competência.*

*Aos professores Graziella Joanitti, João Paulo Longo e Luis Muehlmann pelo companheirismo e exemplo de pesquisadores competentes e dedicados.*

*A todos os professores da grande equipe de Nanobiotecnologia da Universidade de Brasília, em especial aos professores Maria Aparecida Soler, Paulo Narcizo Souza e Leonardo Paterno pelo trabalho desenvolvido com as micelas de Pluronic.*

*À querida Janes pelo companheirismo! Sem a sua ajuda na reta final, parte do que posso oferecer nesta tese, não teria sido realizado!!*

*Às grandes amigas chaPulin, Ludmilla Regina, Faby, Karla Coelho, Luane e Erlaine!! Figuras vitais nessa longa vivência Brasiliense!*

*Aos muitos companheiros desta nanológica jornada! Especialmente: Luiza Lima, Laíse, Raphael Bonadio, Renatinha Carvalho, Katiuscia, Matheus, Paulinha, Fred, Ana Lygia, Rayane, Jaque, Sebastian, Victória e tantos mais que deram muito mais graça para este caminhar juntos!!*

*À maravilhosa, única, espetacular, amada família que tenho: mãe, exemplo infindável de dedicação; pai: amigo-irmão-igual; irmãs: pestes amadas; sobrinhos: delícias indispensáveis.*

*Ao meu magnífico rei Arthur! Figurinha amada que muito sentiu na pele os efeitos de ter uma mãe doutoranda! Foi, desde que existe, minha maior motivação, suporte e exemplo do significado de amor. Agradeço eternamente!*

*Ao Léo por todo o apoio infindável que me proporcionou para que este sonho se tornasse realidade!*

*À CAPES, pela bolsa de doutorado sanduíche.*

*Às fontes de fomento CNPQ, INCT Nanobiotecnologia e FAP-DF pelo auxílio financeiro em projetos relacionados.*

*E a todos que contribuíram diretamente ou indiretamente para que este trabalho fosse realizado.*

“Don't let me hear you say life takes you nowhere, angel.”

- David Bowie

“Experience is the worst teacher; it gives the test before presenting the lesson.”

- Vernon Law

“... I have not failed. I've just found 10000 ways that won't work.”

- Thomas Edison

"We are continually faced with a series of great opportunities brilliantly disguised as insoluble problems."

- John W. Gardner

“Anybody who has been seriously engaged in scientific work of any kind realizes that over the entrance to the gates of the temple of science are written the words: 'Ye must have faith.' “

- Max Planck

“We can be heroes, just for one day”

- David Bowie

## RESUMO

Sistemas de liberação de fármacos com base em nanossistemas tornou-se um campo de interesse nas últimas décadas devido à sua capacidade de transporte e entrega de fármacos, proteção contra a degradação do princípio ativo e redução de efeitos colaterais. Entretanto, elucidar como os componentes de nanossistemas se comportam quando expostos a sistemas biológicos, é um passo fundamental a ser dado para que possamos compreender melhor como fazer seu uso clínico. O fotossensibilizante hidrofóbico alumínio-cloro ftalocianina (AICIFt) já foi utilizado no tratamento de câncer de língua, na eliminação de cáries dentárias, câncer de pulmão, entre outros, associada a nanossistemas para superar a hidrofobicidade de AICIFt. Entretanto, pouco se sabe sobre a consequência biológica da exposição à AICIFt, tanto *in vitro* quanto *in vivo*. No presente estudo foram realizadas três abordagens visando esclarecer a dinâmica biológica de nanossistemas contendo AICIFt. Na primeira abordagem micelas de Pluronic® F-127 contendo AICIFt (F-127/AICIFt), foram preparadas, caracterizadas fotofisicamente e testadas quanto à geração de oxigênio singlete e sua eficiência terapêutica contra células de adenocarcinoma de pulmão foi confirmada. A segunda abordagem visou estudar por espectrometria de massa a molécula AICIFt antes e após exposição a tecidos biológicos, além de desenvolver e validar método de cromatografia líquida de ultra alta eficiência para detecção de AICIFt em nanossistemas e matrizes biológicas. O método foi validado quanto à seletividade, linearidade, limites de detecção e quantificação, precisão e recuperação. A massa molecular de AICIFt identificada experimentalmente por espectrometria de massa foi menor do que a massa esperada indicando a perda do átomo de cloro quando em solução e a formação de aduto com solvente eluente (metanol) quando associada a cromatografia líquida. O método bioanalítico desenvolvido apresentou aplicabilidade e robustez para uso em estudos de biodistribuição. A terceira abordagem apresentou uma nanoemulsão magnética contendo AICIFt, sua caracterização, efetividade terapêutica *in vitro* nas linhagens de carcinoma de pulmão de células não pequenas e em macrófagos murinos, assim como sua biodistribuição *in vivo* avaliada por tomografia computadorizada por emissão de fóton único, fluorescência por imagem e por cromatografia líquida de alta eficiência. A caracterização físico-química de NE-MAG indicou a presença de duas subpopulações compondo o produto final: uma nanoemulsão não-magnética e uma nanoemulsão magnética. A instabilidade decorrente do isolamento das subpopulações, levou à realização do presente trabalho com o nanossistema contendo a mistura das duas subpopulações. A terapia fotodinâmica das células expostas a NE-MAG resultou na identificação de concentração citotóxica que diminui a viabilidade em 50% mais baixa do que já descrito para outras linhagens com o mesmo fotossensibilizante. A biodistribuição de componente magnético por emissão de fóton único indicou captação majoritária pelo fígado e baço em todos os tempos estudados (até 72 h). A análise de fluorescência por imagem de AICIFt no nanossistema, mostrou intensa captação por fígado e pulmão enquanto que a quantificação analítica de AICIFt por cromatografia líquida indicou maior quantidade de AICIFt recuperado de fígado e rins. A diversidade do encontrado nas diferentes técnicas é justificada pela complexidade do nanossistema utilizado e reforça a importância da associação de técnicas para estudos de biodistribuição devido às diversas vantagens e limitações de cada técnica. Desta forma, as três abordagens utilizadas contribuem para a elucidação da dinâmica biológica de nanossistemas contendo AICIFt.

**Palavras-chave:** terapia fotodinâmica; cloreto de alumínio ftalocianina; nanossistemas; cromatografia líquida; espectrometria de massa.

## ABSTRACT

Nanosystem-based drug delivery systems have become a field of interest in recent decades due to their ability to transport and deliver drugs, avoid degradation of the active principle and prevent side effects. However, elucidating how components of a nanosystem behave once exposed to biological systems is a fundamental step to be taken so that we can understand how to use them in living beings. The hydrophobic photosensitizer aluminum-chlorine phthalocyanine (AlClFt) has already been used in the treatment of tongue cancer, against dental caries, lung cancer, among others, associated with nanosystems to overcome the hydrophobicity of AlClFt. However, little is known about the biological consequence of exposure to AlClFt, both *in vitro* and *in vivo*. In the present study three approaches were made to clarify the biological dynamics of nanosystems containing AlClFt. In the first approach, Pluronic F-127 micelles containing AlClFt (F-127/AlClFt) were produced, photophysically characterized and tested for singlet oxygen generation and their therapeutic efficacy against lung adenocarcinoma was confirmed. The second approach was to study by mass spectrometry AlClFt molecule before and after exposure to biological tissues and to develop and validate an ultra-high performance liquid chromatography method for detection of AlClFt in nanosystems and in biological matrices. The method was validated for selectivity, linearity, limits of detection and quantification, accuracy and recovery. The mass of AlClFt experimentally identified by mass spectrometry was lower than the predicted mass indicating the loss of the chlorine atom when in solution and the formation of adducts with eluting solvent (methanol) when combined with liquid chromatography. The developed bioanalytical method presented applicability and robustness for use in biodistribution studies. The third approach presented magnetic nanoemulsion containing AlClFt, its characterization, *in vitro* therapeutic effectiveness in non-small cell lung carcinomas and murine macrophages, as well as its *in vivo* biodistribution evaluated by single photon emission computed tomography, fluorescence imaging and by high performance liquid chromatography. The physico-chemical characterization indicated the presence of two subpopulations composing the final product: a non-magnetic nanoemulsion and a magnetic nanoemulsion containing AlClFt (NE-MAG-Ft). The instability resulting from the isolation of the subpopulations led to the use in the present work of nanosystem containing the mixture of the two subpopulations. Photodynamic therapy of cells with NE-MAG-Ft yielded a cytotoxic concentration that decreases viability by 50% lower than previously described for other strains with the same photosensitizer. The biodistribution of the magnetic component by single photon emission demonstrated a major uptake by the liver and spleen at all studied times (up to 72 hours). Fluorescence analysis of AlClFt in the nanosystem demonstrated intense liver and lung uptake while analytical quantification of AlClFt by liquid chromatography indicated more AlClFt in liver and kidneys. The diversity of the different techniques is justified by the complexity of the nanosystem used and reinforces the importance of the association of techniques for biodistribution studies due to the different advantages and limitations of each technique. In this way, the three approaches used contribute to the elucidation of the biological dynamics of AlClFt-containing nanosystems.

**Keywords:** photodynamic therapy; aluminum phthalocyanine chloride; nanosystems; liquid chromatography; mass spectrometry.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ilustração de principais componentes envolvidos em vias de internalização de partículas pelas células.....	8
Figura 2. Representação da vazão sanguínea pulmonar e sistêmica. Valores entre parênteses representam porcentagem de vazão sanguínea total por órgão. ....	16
Figura 3. Representação gráfica da molécula de alumínio cloro ftalocianina. ....	20
Figura 4. Espectro de absorção (a e b) e de emissão de fluorescência (excitação a 350 nm) (c e d) de AlClFt em etanol, PBS ou incorporadas nas micelas S1, S2, S3 e S4 .....	34
Figura 5. Espalhamento dinâmico da luz de micelas de F127 e de micelas com concentrações crescentes de AlClFt (0,05, 0,1, 1, 5 e 10 µg/mL, S5, S6, S7, S8 E S9, respectivamente). ....	37
Figura 6. Absorbância normalizada da sonda de oxigênio singlete DBF exposta a micelas de F127 contendo diferentes concentrações de AlClFt após sucessivos ciclos de irradiação com LED de 660 nm.....	38
Figura 7. Análise por citometria de fluxo da interiorização de micelas F127/AlClFt (S7) pelas células A549.. ....	41
Figura 8. Fotomicrografia confocal de células A549 tratadas com PBS ou micelas F127/AlClFt S7 após 45 min de exposição. ....	42
Figura 9. Terapia fotodinâmica de A549 com F127/AlClFt contendo diferentes concentrações de AlClFt com fluência de 25,3 J/cm <sup>2</sup> .....	44
Figura 10. Cromatograma de AlClFt (0,5 µg/mL) e seus prováveis contaminantes (tempo de retenção 8,03 – 9,58) e ZnFt (0,2 µg/mL) (tempo de retenção 13,02) com detecção por emissão de fluorescência (Excitação:610nm, Emissão: 675nm).....	55
Figura 11. Cromatograma de fluorescência de AlClFt e ZnFt (A) e sua relação com os cromatogramas de íon extraído (CIE) de AlClFt (B) e ZnFt (C), demonstrando a massa detectada para ambas, 571,1586 e 577,0846, respectivamente. ....	56
Figura 12. Distribuição isotópica teórica tanto de [AlClFt + H] <sup>+</sup> (A) quanto de [AlFt + CH <sub>3</sub> OH] <sup>+</sup> (B) e a distribuição encontrada experimentalmente após injetar amostras de AlClFt em CL/MS (C). ....	58
Figura 13. Espectro de massa de AlClFt e de ZnFt obtida por espectrometria de massa MALDI/TOF. ....	59
Figura 14. Ilustração dos componentes envolvidos na pirólise a laser.....	72
Figura 15. Organização utilizada para aquisição de imagem por fluorescência <i>ex vivo</i> demonstrando regiões de interesse (ROI) contendo os órgãos de animais controle .....	84



Figura 16. Distribuição do tamanho de NP (nm) identificado por dispersão dinâmica e luz. Diluição de 20x em água ultrapura. ....	87
Figura 17. Distribuição do tamanho de populações de NE, NE-Ft, NE-MAG, NE-MAG-Ft quanto à intensidade, número e volume.....	90
Figura 18. Eletromicrografia de nanopartículas de óxido de ferro (NP).....	91
Figura 19. Eletromicrografias de NE-MAG. A = NE-MAG sem contrastação. B = NE-MAG contrastada com 0,05% de acetato de uranila por 30 segundo. C = NE-MAG contrastada com molibdato de amônio 2% por 15 segundos. ....	92
Figura 20. Eletromicrografias de análise por crio-MET de NE (A), NE-Ft (B) e NE-MAG (C). As setas pretas apontam pontos eletrondensos de NE-Ft e a seta branca aponta nanopartículas eletrondensas.....	93
Figura 21. Eletromicrografias de análise por crio-MET de NE-MAG com 1,6 mg de NP com a identificação de NPs sem o envoltório encontrado na NE-MAG (0,8 mg/mL de NP) utilizado no restante do trabalho. ....	94
Figura 22. Análise por microscopia de força atômica de relevo de superfície de silício contendo NE-MAG-Ft.....	95
Figura 23. Espectro de absorvância de NE, NE-Ft, NP, NE-MAG e NE-MAG-Ft diluídos 4x em água (concentração de AlClFt em NE-Ft e NE-MAG-Ft, PBS e Etanol de 5,75 µg/mL). Espectro de 360 a 750 nm.....	96
Figura 24. Espectro de fluorescência de NE, NE-Ft, NP, NE-MAG e NE-MAG-Ft diluídos 4x em água (concentração de AlClFt em NE-Ft e NE-MAG-Ft, PBS e Etanol de 5,75 µg/mL).....	97
Figura 25. Absorvância a 410 nm normalizada por teor inicial de DBF exposto aos nanossistemas NE, NE-Ft, NP, NE-MAG, NE-MAG-Ft e irradiados com LED a 660nm com sessões de irradiação de 0,092 J/cm <sup>2</sup> .....	98
Figura 26. Curva de magnetização de NE-MAG e NE-MAG-Ft após aplicação de campo magnético.....	99
Figura 27. Espectros de espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier dos componentes utilizados nos nanossistemas e dos nanossistemas finais NE-MAG e NE-MAG-Ft.....	100
Figura 28. Viabilidade celular das células A549 e RAW 264,7 após exposição por 24 h a diluição seriada dos nanossistemas NP, NE, NE-Ft, NE-MAG e NE-MAG-Ft.....	103
Figura 29. Análise por citometria de fluxo de captação de AlClFt pelas células A549 e RAW 264,7 após exposição a NE-Ft e NE-MAG-Ft. Em detalhe interno nos gráficos, se observa representação da normalização pelo tempo total de 2 h de análise. ....	105
Figura 30. Fotomicrografia confocal de células A549 e RAW 264,7 incubadas com NE- Ft e NE-MAG-Ft por 15 min. Concentração de AlClFt em ambos os nanossistemas é de 0,18	

$\mu\text{g/mL}$ . A) Campo claro; B) Marcação de ADN com DAPI C) Fluorescência de AICIFt; D) Sobreposição das imagens. Todas as barras de escala representam 20  $\mu\text{m}$ . ..... 106

Figura 31. Viabilidade de células A549 e RAW 264,7 após exposição à diluição seriada de NE-Ft e NE-MAG-Ft por 15 min e em seguida, tratadas com LED de 660 nm (fluência de 25,3 J/cm<sup>2</sup>) ou mantidas no escuro após exposição. .... 107

Figura 32. Estabilidade de gálio-67 após incorporação em NP e em NE-MAG-Ft por 48 h... 109

Figura 33. Imagens de SPECT-CT de animais injetados com NP ou NE-MAG-Ft ao longo dos tempos de 2, 22, 48 e 72 h..... 110

Figura 34. Quantificação em contador de raios gamma de Ga-67 nos órgãos após 72 h de administração de NP-Ga-67 e NE-MAG-Ft-Ga-67 em camundongos. .... 111

Figura 35. Quantificação de radiação gamma/g de tecido emitida pelos órgãos *ex vivo* de animais injetados com NP-Ga-67 e NE-MAG-Ft-Ga-67 após 72 h. .... 112

Figura 36. Biodistribuição de NE-Ft e NE-MAG-Ft em órgãos de camundongos C57BL/6 medida por eficiência radiante de fluorescência *ex vivo*. ..... 113

Figura 37. Normalização por peso da amostra de biodistribuição de NE-Ft e NE-MAG-Ft em órgãos de camundongos C57BL/6 medida por eficiência radiante de fluorescência *ex vivo*. ..... 114

Figura 38. Biodistribuição de AICIFt após administração de NE-Ft e NE-MAG-Ft em órgãos de camundongos C57BL/6 e detecção por fluorescência em CLAE..... 115

Figura 39. Normalização de biodistribuição de AICIFt por grama de tecido após administração de NE-Ft e NE-MAG-Ft em órgãos de camundongos C57BL/6 em CLAE. .... 116

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Métodos utilizados na visualização de nanopartículas em células e tecidos e as principais vantagens e limitações de cada técnica .....	11
Tabela 2. Vias de administração de nanopartículas em estudos pré-clínicos .....	14
Tabela 3. Concentrações de AIClFt e F127 testadas nas micelas desenvolvidas. ....	28
Tabela 4. Eficiência de encapsulação (E.E) de F127/AIClFt com diferentes concentrações de AIClFt (S5, S6, S3, S7 e S8). ....	40
Tabela 5. Composição da fase móvel pelo tempo em método cromatográfico de AIClFt e ZnFt. A: formiato de amônio; B: metanol. ....	51
Tabela 6. Parâmetros das curvas de calibração preparadas em solventes ou em matrizes biológicas.....	61
Tabela 7. Precisão e recuperação das curvas matrizadas da razão AIClFt/ZnFt. ....	63
Tabela 8. Principais técnicas utilizadas nas três rotas de síntese de nanopartículas de óxido de ferro.....	68
Tabela 9. Descrição dos componentes presente nos nanossistemas desenvolvidos e suas concentrações finais.....	74
Tabela 10. Diâmetros hidrodinâmicos “z-average”, tamanho das populações identificadas pelo parâmetro intensidade, índices de polidispersão e potencial zeta dos nanossistemas NE, NE-Ft, NE-MAG e NE-MAG-Ft diluído 20x em água. ....	88
Tabela 11. Concentrações citotóxica (CC50) de NP, NE, NE-Ft, NE-MAG e NE-MAG-Ft que reduzem em 50% a viabilidade das células A549 e RAW 264,7 após 24 h de exposição. ....	104
Tabela 12. CC50 de A549 e RAW 264,7 após terapia fotodinâmica com NE-Ft e NE-MAG-Ft. Entre parênteses equivalência de AIClFt presente na % de nanossistema utilizada expressa em ng/mL e nM).....	108

## ESQUEMA

Esquema 1. Organização proposta de AIClFt na presença do F127 em concentração abaixo da concentração micelar crítica (A) e acima da concentração micelar crítica (B) na presença do fotossensibilizante AIClFt. ....	36
--	----

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

A549	Linhagem celular de adenocarcinoma de pulmão
AICIFt	Alumínio cloro ftalocianina
APC-A	Canal de emissão de fluorescência de alofocianina
BALB/Cj	Linhagem de camundongo albina
C57BL/6	Linhagem de camundongo <i>black</i>
CC50	Concentração citotóxica de redução de 50% de viabilidade
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CLAE/EM	Cromatografia líquida de alta eficiência associada a espectrometria de massa
CLUE	Cromatografia de ultra alta eficiência
CMC	Concentração micelar crítica
CRIO-MET	Crio-microscópio eletrônico de transmissão
DBF	1,3-difenil-isobenzofurano
DDL	Dispersão dinâmica de luz
DH	Diâmetro hidrodinâmico
DMEM	Meio Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EMA	<i>European medicines agency</i>
ESI	Ionização por eletrospray
F127	Copolímero em bloco anfifílico
FDA	<i>Food and drug administration</i>
IPD	Índice de polidispersão
LD	Limite de detecção
LED	Diodo emissor de luz
LQ	Limite de quantificação
MALDI	Ionização e dessorção a laser assistida por matriz
MET	Microscópio eletrônico de transmissão
MTT	3,4,5-dimetiltiazol-2,5 bifenil tetrazolium bromide
NE	Nanoemulsão
NE-Ft	Nanoemulsão contendo AICIFt

NE-MAG	Nanoemulsão magnética
NE-MAG-Ft	Nanoemulsão magnética contendo AIClFt
NP	Nanopartícula magnética
PBS	Tampão fosfato salino
PEG	Polietilenoglicol
PET	Tomografia de emissão de pósitron
$r^2$	Coeficiente de determinação
RAW	Macrófago murino
RPMI	Meio desenvolvido pelo Instituto Memorial Park Roswell
SFB	Soro fetal bovino
SFM	Sistema fagocitário mononuclear
SPECT	Tomografia computadorizada de emissão de fóton único
TFA	Ácido triflúor acético
TFD	Terapia fotodinâmica
VRC	Vesículas revestida com clatrina
ZnFt	Zinco ftalocianina
ZP	Potencial zeta

## Sumário

1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REFERENCIAL TEÓRICO .....	3
2.1 Nanotecnologia .....	3
2.2 Nanomedicina e nanossistemas .....	3
2.2.1 Lipossomas .....	4
2.2.2 Dendrimeros .....	5
2.2.3 Micelas poliméricas .....	5
2.2.4 Nanoemulsões .....	6
2.2.5 Partículas mesoporicas de sílica .....	6
2.2.6 Nanopartículas de ouro .....	7
2.2.7 Nanopartículas magnéticas .....	7
2.3 Interação Biológica de nanossistemas .....	7
2.3.1 Vias de internalização de nanopartículas em células .....	7
2.3.2 Citolocalização de nanossistemas .....	10
2.3.3 Biodistribuição de nanossistemas .....	13
2.3.4 Métodos de estudo da biodistribuição de nanossistemas .....	17
2.4 Terapia fotodinâmica .....	19
3. JUTIFICATIVA .....	22
4. OBJETIVOS .....	23
4.1 Objetivo Geral .....	23
4.2 Objetivos Específicos .....	23
CAPÍTULO 1.....	25
DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE MICELA DE PLURONIC F127 CONTENDO O FOTOSSENSIBILIZANTE CLORETO DE ALUMÍNIO FTALOCIANINA PARA O TRATAMENTO DE ADENOCARCINOMA PULMONAR HUMANO COM USO DE TERAPIA FOTODINÂMICA.....	25
1. INTRODUÇÃO .....	26
2. MATERIAIS E MÉTODOS .....	28
2.1. Materiais.....	28
2.1 Caracterização de F127/ICIFt .....	28
2.2 Caracterização de potencial terapêutico de F127/AICIFt – produção de oxigênio singleto .....	29
2.3 Estudos In vitro.....	30
2.3.1 Cultivo celular.....	30
2.3.2 Citometria de fluxo.....	31
2.3.3 Microscopia confocal .....	31

2.3.4 Terapia fotodinâmica .....	32
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	33
3.1 Caracterização morfológica e fotofísica de micelas de F127/AICIFt .....	33
3.2 Produção de oxigênio singlete de F127/AICIFt .....	38
3.3 Eficiência de encapsulação.....	39
3.4 Estudos in vitro.....	40
3.4.1 Citometria de fluxo de A549 exposta a F127/AICIFt .....	40
3.4.2 Microscopia confocal de A549 exposta a F127/AICIFt.....	42
3.4.3 Terapia fotodinâmica de A549 com F127/AICIFt .....	43
4. CONCLUSÕES.....	46
CAPÍTULO 2.....	47
DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO BIOANALÍTICO PARA A QUANTIFICAÇÃO DE ALUMÍNIO CLORO FTALOCIANINA EM NANOPARTÍCULAS, PLASMA E TECIDOS COM CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ULTRA ALTA EFICIÊNCIA ASSOCIADA E ESPECTROMETRIA DE MASSA .....	47
1. INTRODUÇÃO .....	48
2. MATERIAIS E MÉTODOS .....	50
2.1 Materiais.....	50
2.2 Instrumentação .....	50
2.3 Condição cromatográfica .....	50
2.4 Extração e quantificação de AICIFt em nanoemulsão.....	51
2.5 Órgãos de camundongos para validação de método .....	51
2.6 Preparação das amostras biológicas .....	52
2.7 Desenvolvimento do método.....	52
2.7.1 Seletividade .....	53
2.7.2 Linearidade.....	53
2.7.3 Limites de detecção e quantificação .....	53
2.7.4 Recuperação.....	53
2.7.5 Precisão .....	53
2.7.6 Estabilidade .....	54
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	54
3.1 Estudo de espectrometria de massa de AICIFt e ZnFt.....	54
3.2 Estudo por CLUE/EM da exposição de AICIFt a matrizes biológicas .....	59
3.2.1 Metodo bioanalítico para detecção de AICIFt em nanoemulsões, plasma e tecidos .....	60
3.3 Validação do método .....	61

3.3.1 Seletividade .....	61
3.3.2 Linearidade, Limite de detecção e de detecção de curvas padrão matrizadas .....	61
3.3.3 Precisão e recuperação .....	62
3.3.4 Estabilidade .....	63
4. CONCLUSÕES .....	65
CAPÍTULO 3.....	66
SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO, CITOLocalização E BIODISTRIBUIÇÃO EM CAMUNDONGOS C57BL/6 DE NANOEMULSÃO MAGNÉTICA CARREANDO FOTOSSENSIBILIZANTE CLORETO DE ALUMÍNIO FTALOCIANINA. ....	66
1. INTRODUÇÃO .....	67
2. MATERIAIS E MÉTODOS .....	71
2.1 Materiais.....	71
2.2 Preparo de nanopartícula magnética de magnetita/maguemita por pirólise a laser ...	71
2.3 Preparo de nanossistemas NE, NE-Ft, NE-MAG, NE-MAG-Ft.....	73
2.4 Caracterização de NP, NE, NE-Ft, NE-MAG e NE-MAG-Ft .....	74
2.4.1 Dispersão dinâmica de luz e mobilidade eletroforética .....	74
2.4.2 Morfologia e tamanho .....	75
2.4.3 Propriedades fotofísica .....	76
2.4.4 Geração de oxigênio singleto de AICIFt.....	76
2.4.5 Magnetização .....	76
2.4.6 Espectroscopia no Infravermelho por transformada de Fourier .....	77
2.4.7 Avaliação de possíveis contaminantes biológicos.....	77
2.5 Estudos In vitro.....	77
2.5.1 Cultivo celular.....	78
2.5.2 Estudo de viabilidade celular .....	78
2.5.3 Citometria de fluxo.....	79
2.5.4 Microscopia confocal .....	79
2.5.5 Terapia fotodinâmica .....	80
2.6 Estudos in vivo.....	80
2.6.1 Animais.....	80
2.6.2 Radiomarcção e biodistribuição por tomografia computadorizada por emissão de fóton único .....	80
2.6.3 Biodistribuição por fluorescência in vivo/ex vivo .....	83
2.6.4 Biodistribuição por cromatografia líquida de alta eficiência .....	84
2.7 Análise estatística.....	86
3. RESULTADOS.....	87



3.1 Caracterização morfológica de NP, NE, NE-Ft, NE-MAG e NE-MAG-Ft.....	87
3.2 Caracterização fotofísica de NP, NE, NE-Ft, NE-MAG e NE-MAG-Ft .....	95
3.3 Geração de oxigênio singleto de nanossistemas .....	97
3.4 Caracterização magnética de NE-MAG e NE-MAG-Ft.....	98
3.5 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier de NP, NE-MAG e NE-MAG-Ft .....	100
3.6 Caracterização de contaminação biológica de NE, NE-Ft, NE-MAG, NE-MAG-Ft .....	102
3.7 Exposição de nanossistemas NP, NE, NE-Ft, NE-MAG e NE-MAG-Ft a células de adenocarcinoma pulmonar humano e macrófago murino.....	103
3.8 Estudos in vivo.....	108
3.8.1 Radiomarcção de NP para uso em tomografia computadorizada por emissão de fóton único .....	108
3.8.2 Biodistribuição de NE-Ft e NE-MAG-Ft pela técnica de Imageamento de fluorescência. ....	113
3.8.3 Biodistribuição de NE-Ft e NE-MAG-Ft pela técnica de cromatografia líquida de alta eficiência.....	115
4. DISCUSSÃO .....	117
5. CONCLUSÕES.....	128
CONCLUSÕES GERAIS .....	129
REFERÊNCIAS .....	130
Anexo. Certificado de autorização de Comissão de ética no uso animal da Universidade de Brasília. ....	147
Produção bibliográfica relacionada ao trabalho:.....	148

## 1. INTRODUÇÃO

Em vista dos recentes avanços da química farmacêutica, da biologia molecular e da bioprospecção de novas substâncias ativas, muita expectativa tem sido criada pela produção de novas classes de fármacos. No entanto, esses fármacos possuem frequentemente características físico-químicas e/ou biológicas que dificultam sua utilização em seres vivos (BERTRAND; LEROUX, 2012). Nesse contexto, a nanotecnologia tem emergido como uma estratégia promissora para resolver impasses tecnológicos, dentre eles a entrega de fármacos no tratamento de enfermidades.

Outra vantagem de nanossistemas é que eles podem proteger fármacos da degradação e inativação durante o percurso até o tecido alvo, o que reduz a concentração necessária para a eficiência terapêutica e conseqüentemente diminui a ocorrência de efeitos colaterais e tóxicos induzidos pelo fármaco (MOGHIMI; HUNTER; ANDRESEN, 2012). Um exemplo dessa utilização é a liberação de quimioterápicos em tumores sólidos, aplicação na qual nanossistemas têm se destacado pela capacidade de modificar a biodistribuição de fármacos no sistema vascular e no tecido alvo (ALLEN; CULLIS, 2004; DAVIS, 2008).

O laboratório de Nanobiotecnologia da Universidade de Brasília possui, como uma das suas linhas de pesquisa, o preparo de nanossistemas para utilização em terapia fotodinâmica (TFD) uma vez que o desenvolvimento de nanossistemas com elementos fotossensibilizantes tem permitido a utilização desse mecanismo para o desenvolvimento de terapias efetivas contra tumores (BICALHO *et al.*, 2013; CHATTERJEE; FONG; ZHANG, 2008; ROCHA *et al.*, 2012). Nesta terapia, fotossensibilizantes ao serem irradiados com comprimentos de onda específicos, produzem espécies reativas de oxigênio (EROs), que atuam danificando as células no local irradiado e arredores imediatos (DOUGHERTY *et al.*, 1998).

Entretanto, pouco se sabe da dinâmica *in vitro* e *in vivo* de muitos desses nanossistemas com enorme potencial biomédico: Quais órgãos acumulam as partículas uma vez administradas em seres vivos? Em qual local celular o fotossensibilizante se encontra após a exposição da nanopartículas à maquinaria celular?

O atual trabalho teve como proposta dois sistemas contendo o fotossensibilizante cloreto de alumínio ftalocianina (AlClFt) - uma micela de pluronic F-127 assim como uma nanoemulsão magnética - e a interação biológica destes sistemas foi estudada. Para o estudo de biodistribuição de AlClFt com precisão analítica foi necessário desenvolver e

validar um método cromatográfico, além de realizar estudos de espectrometria de massa de AICIFc antes e após exposição biológica.

A apresentação da tese foi feita na forma de três capítulos. Inicialmente, será apresentado referencial teórico de temas comuns aos capítulos e em seguida o capítulo 1 apresentará o estudo de micelas de Pluronic® F127 contendo o fotossensibilizante AICIFt, a sua síntese, caracterização e sua efetividade na redução da viabilidade de células de adenocarcinoma pulmonar; o capítulo 2 descreverá o desenvolvimento de método de cromatografia líquida de ultra alta eficiência para detecção de AICIFt e sua validação para quantificação de AICIFt em nanossistemas e amostras biológicas; por fim, o capítulo 3 apresentará nanoemulsão magnética contendo AICIFt, sua caracterização, a efetividade terapêutica do nanossistema estudada *in vitro* e o estudo da sua biodistribuição por diferentes técnicas para avaliar sua interação biológica *in vivo*.

## **2. REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1 Nanotecnologia**

Apesar da faixa de tamanho para se estabelecer algo como nanotecnológico não ser consenso na literatura, nanotecnologia foi definida pela ISO2007 como “Compreensão e controle da matéria e processos em nanoescala, normalmente, mas não exclusivamente, abaixo de 100 nanômetros em uma ou mais dimensões, onde o aparecimento de fenômenos que dependem do tamanho, normalmente permite novas aplicações”. Assim como “A utilização das propriedades de materiais em nanoescala que diferem das propriedades dos átomos individuais, moléculas e da matéria bruta, para criar materiais, dispositivos e sistemas melhorados que exploram essas novas propriedades”(ISO, 2007).

É proposto que a nanotecnologia, a longo prazo, especialmente em combinação com a tecnologia da informação, biotecnologia e as ciências cognitivas, pode levar a avanços revolucionários, dentre eles: a) novas tecnologias de prevenção, detecção e tratamento de doenças, que podem reduzir substancialmente a morte e o sofrimento causado pelo câncer e outras doenças letais; b) na produção de novos órgãos para substituir os danificados ou doentes; c) em lentes de contato, adesivos tópicos e tatuagens que dosam glicose para monitoramento de diabéticos; d) na produção de roupas que protegem contra toxinas e patógenos; e) na produção de energia, armazenamento e tecnologias de transmissão limpas e baratas; f) sistemas de purificação de água portáteis de custo baixo que permitem o acesso universal à água potável; g) sistemas de manufatura eficientes, de baixa emissão de energia; h) sistemas de memória de alta densidade; i) sensores de pele eletrônica baratos, flexíveis e duráveis que permitem que robôs e próteses detectem mudanças na pressão, umidade e temperatura (SARGENT JR, 2013), entre muitas outras possíveis aplicações.

### **2.2 Nanomedicina e nanossistemas**

O crescente desenvolvimento da nanotecnologia e sua integração nas áreas de saúde e da medicina conduziram ao aparecimento da área mais conhecida como Nanomedicina. As principais vantagens das aplicações biomédicas do uso de nanomateriais são (adaptado de RUIZ ESTRADA 2014):

- Os nanossistemas frequentemente solucionam problemas de solubilidade e estabilizam formulações tradicionais principalmente à base de biomoléculas por meio da modificação da superfície do sistema.

- Nanossistemas derivados de biomoléculas podem ser direcionados para organelas específicas dentro de determinados tecidos ou, até mesmo, direcionar células para se localizarem no local alvo.

- Algumas nanoestruturas apresentam novas propriedades físicas na escala nano, tais como propriedades ópticas no caso de quantum-dots, que podem ser usados como ferramentas de imagem.

- Devido à nanoescala, esses nanossistemas têm uma alta razão área de superfície por volume e, portanto, uma grande capacidade de encapsulamento.

- Esses nanossistemas, por meio de direcionamento passivo ou ativo, podem liberar fármacos de forma controlada, reduzindo a toxicidade e os efeitos colaterais em comparação com formulações tradicionais.

Em levantamento criterioso de NOORLANDER *et al.*, (2015) de nanossistemas com finalidade estritamente terapêutica, foram identificados 175 nanomedicamentos já em uso sendo 71 aprovados pela agência reguladora europeia (*European Medicines Agency - EMA*) e 40 pela agência reguladora americana (*Food and drug administration - FDA*).

Dentre os diversos nanossistemas atualmente sendo estudados para utilização em tratamentos, podemos classificá-las em dois grandes grupos: nanopartículas orgânicas e inorgânicas. Dentre as orgânicas, temos:

### 2.2.1 Lipossomas

Os lipossomas têm tido especial destaque na pesquisa e em estudos clínicos. São formados por fosfolipídios anfifílicos como a fosfatidilcolina, fosfatidil-etanolamina, fosfatidilserina e o fosfatidilglicerol, que se organizam em uma bicamada lipídica com um núcleo aquoso (MARCIELLO *et al.*, 2016). Foram descritos pela primeira vez por BANGHAM & HORNE (1964) e tem como principal vantagem poder incorporar tanto moléculas hidrofílicas quanto hidrofóbicas inclusive simultaneamente. Outras vantagens consistem em prevenir a degradação de biomoléculas incorporadas, redução da toxicidade de fármacos, aumento da eficácia terapêutica, versatilidade e biocompatibilidade (MARCIELLO *et al.*, 2016).

Lipossomas de segunda geração surgiram pela incorporação de polietilenoglicol (PEG) na superfície diminuindo a adsorção de proteínas na superfície da bicamada. Atualmente inúmeras modificações de superfície e mecanismos de ativação estão sendo otimizados visando melhorar a entrega de fármacos pelo uso de lipossomas (VAN ELK *et al.*, 2016).

### 2.2.2 Dendrímeros

Os dendrímeros têm se estabelecido como o nanossistema versátil para uso na entrega de fármacos e foram hipoteticamente descritos pela primeira vez por BUHLEIER *et al.*, (1978). Em 1982, KRICHELDORF *et al.*, realizaram a primeira descrição da obtenção de poliésteres altamente ramificados a partir de monômeros dando início aos trabalhos com os polímeros “super-ramificados” (do termo em inglês “hyper branched polymer”). O termo dendrímero é derivado da palavra grega ‘dendron’ que significa ‘arvore’ uma vez que tipicamente são formados a partir de iniciadores centrais que se ramificam em grupos terminais na superfície.

Os dendrímeros são descritos como tendo uma superfície com grupos hidrofílicos possíveis de interação com fármacos ou diversas moléculas que otimizem o direcionamento e entrega de fármacos, além de apresentar nas ramificações internas um ambiente plausível de interação com fármacos hidrofóbicos (SHARMA *et al.*, 2016).

### 2.2.3 Micelas poliméricas

Micelas poliméricas são o resultado da organização de copolímeros em blocos ou ramificados em ambientes aquosos (YOKOYAMA, 2014).

Os copolímeros anfifílicos formam micelas espontaneamente com tamanhos variando de 10 a 100 nm (VAN ELK *et al.*, 2016). As micelas poliméricas possuem um ambiente hidrofóbico no seu núcleo que permite a adsorção de moléculas hidrofóbicas e uma superfície externa com extremidades hidrofílicas que podem ser modificadas por diversos ligantes otimizando a entrega de fármacos.

Para formação das micelas poliméricas, a concentração de polímero deve atingir uma concentração mínima, denominada concentração micelar crítica (CMC), a partir da qual o mais comum é a formação espontânea dos nanossistemas. Entretanto, a administração deste nanossistemas em sistemas biológicos leva à diluição dos componentes resultando na instabilidade das micelas. Devido a isso, é cada vez mais frequente o uso de ligações

cruzadas entre os polímeros para render uma micela mais estável com maior tempo de circulação no organismo (VAN ELK *et al.*, 2016).

#### 2.2.4 Nanoemulsões

As nanoemulsões são sistemas heterogêneos em que uma fase oleosa é dispersa em uma fase aquosa, ou vice-versa, e estabilizada por um agente emulsificante, na faixa nanométrica. Os agentes emulsificantes são moléculas anfífilas que reduzem a tensão superficial entre as duas fases rendendo gotículas que variam normalmente de 50 a 200 nm de diâmetro (GANTA *et al.*, 2014).

As nanoemulsões podem solubilizar uma grande quantidade de fármacos hidrofóbicos e sua propriedade fundamental de proteger os fármacos da degradação enzimática e hidrólise tornam as nanoemulsões a plataforma ideal para entrega de fármacos por vias paraenterais. Além disso, apresentam transparência óptica, alta estabilidade e biocompatibilidade (ODRIOZOLA-SERRANO; OMS-OLIU; MARTÍN-BELLOSO, 2014).

Dentre as nanopartículas inorgânicas utilizada na nanomedicina, temos:

#### 2.2.5 Partículas mesoporosas de sílica

Desde sua descoberta em 1992 por KRESGE *et al.*, nanomateriais de sílica altamente ordenada têm atraído cada vez mais a atenção de diversas áreas pelas suas propriedades únicas: arquitetura de poros em forma de favos de mel com grande área de superfície, grande volume de poro (de tamanho definido pela síntese) e maior biocompatibilidade em relação a demais nanopartículas inorgânicas (BAEK *et al.*, 2015).

A síntese de nanopartículas de sílica ocorre pela hidrólise, condensação e automontagem de precursores de sílica na presença de surfactantes e resulta em uma estrutura extremamente controlada (VAN ELK *et al.*, 2016).

A combinação ou hibridização com biomoléculas, fármacos ou outras nanopartículas potencializam a habilidade multifuncional de nanopartículas mesoporosas de sílica. Um passo além está sendo dado pelo uso de mecanismos de ativação destas partículas e liberação de seu conteúdo por mudança de pH, sinalização óptica, reações redox, eletricidade e magnetismo (BAEK *et al.*, 2015).

### **2.2.6 Nanopartículas de ouro**

Há milhares de anos a humanidade é fascinada pelo ouro e já o utilizava na fabricação de vitrais devido à coloração especial que proporcionavam. Contudo, não se sabia até pouco tempo que eram as dimensões reduzidas do ouro, na forma de nanopartículas, que proporcionavam propriedades tão especiais a este material (MURPHY *et al.*, 2008). Com o avanço de técnicas de síntese, pesquisadores atualmente conseguem sintetizar uma ampla variedade de formas e tamanhos de nanopartículas de ouro: nanoesferas, nanobastões, nanocápsulas, nanojaulas, etc (WANG, FENGLIN *et al.*, 2016).

Dentre as vantagens deste nanossistema, ele é biocompatível, rotas de síntese muito estabelecidas e possui ampla possibilidade de funcionalização (HAUME *et al.*, 2016). Um promissor uso de nanopartículas de ouro é na terapia fototermal, uma vez que elas absorvem luz gerando calor e permitindo a ativação somente no alvo biológico de interesse (ANSELMO; MITRAGOTRI, 2015)

### **2.2.7 Nanopartículas magnéticas**

Nanopartículas de óxido de ferro são as partículas inorgânicas mais estudadas para finalidades biológicas, já estando disponíveis produtos aprovados para uso em humanos (ANSELMO; MITRAGOTRI, 2015). Dentre as muitas vantagens deste nanossistema, temos a biocompatibilidade, responsividade magnética, forte contraste em técnicas de imageamento não-invasivas (tomografia e ressonância magnética) e a capacidade de aquecer quando submetida a um campo magnético alternado (magnetohipertermia) ou a fontes de luz no comprimento de onda de 808 nm (efeito fototérmico). A funcionalização das partículas magnéticas aumenta a biocompatibilidade e diminui a agregação já esperada de elementos magnético.

## **2.3 Interação Biológica de nanossistemas**

### **2.3.1 Vias de internalização de nanopartículas em células**

Um aspecto chave do estudo de nanossistemas e dos mecanismos envolvidos nos tratamentos é o entendimento de como um nanossistema interage com as células.

Enquanto medicamentos tradicionais compostos por pequenas moléculas em solução entram nas células principalmente por meio de difusão passiva ou transporte ativo. Uma pequena fração de nanopartículas pode entrar por difusão passiva, mas é difícil identificar esta fração uma vez que há grande predominância de processos endocíticos. Eritrócitos são



o modelo para estudos de difusão passiva em células de mamíferos uma vez que não possuem núcleo nem a maquinaria celular endocítica, mas a ausência completa de processo endocítico nestas células é intensamente discutida (TREUEL; JIANG; NIENHAUS, 2013; WANG, TIAN TIAN *et al.*, 2012). A maioria das nanopartículas entram nas células por meio do processo de endocitose, podendo esta ser do tipo fagocitose ou pinocitose (KOU *et al.*, 2013). Na Figura 1 pode-se observar um esquema dos principais componentes envolvidos em cada via.

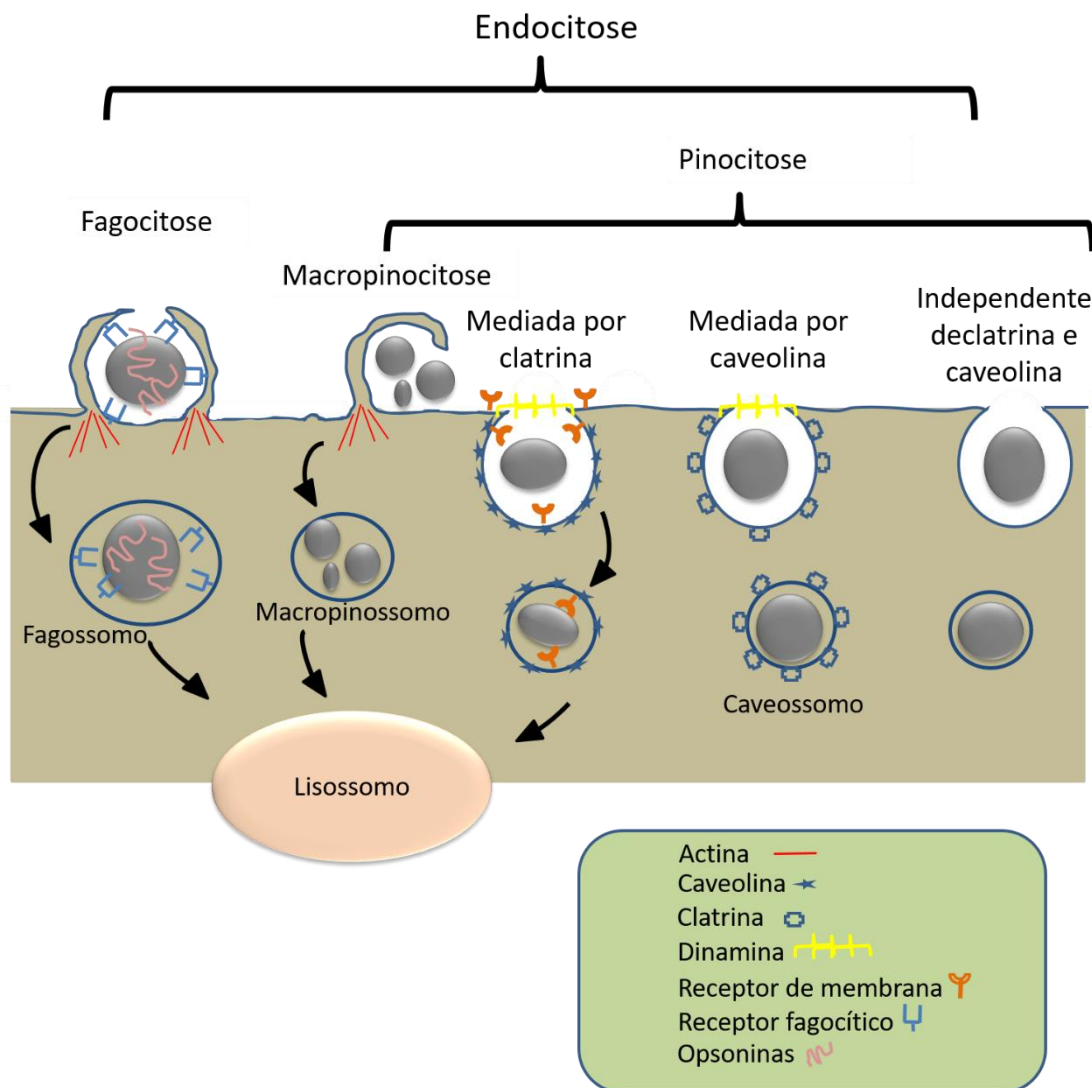


Figura 1. Ilustração de principais componentes envolvidos em vias de internalização de partículas pelas células. Adaptado de CHOU; MING; CHAN (2011) e KOU *et al.* (2013).

A fagocitose é uma via endocítica encontrada principalmente em macrófagos, neutrófilos e monócitos. Essa rota é assumida normalmente por partículas acima de 1 µm

que precisam primeiramente ser opsonizadas por moléculas como imunoglobulinas (IgG e IgM), componente do complemento (C3, C4 e C5) e outras proteínas sanguíneas. Depois disso, nanopartículas opsonizadas se ligam à superfície da célula e interagem com o receptor, induzindo a membrana a assumir a forma de taça com prolongamentos da membrana. Uma vez que estes prolongamentos envolvem completamente a partícula, esta é internalizada formando um fagossoma que têm um diâmetro entre 0,5 e 10  $\mu\text{m}$ . O fagossoma se desloca dentro da célula para se fundir com os lisossomos, nos quais será exposto à acidificação e ação enzimática, motivo pelo qual nanomedicamentos devem evadir esta rota para evitar degradação (XIANG *et al.*, 2012).

O segundo principal tipo de endocitose é a pinocitose, uma importante rota em que as células assimilam fluidos, solutos e suspensões contendo pequenas partículas. É subdividida em endocitose dependente de clatrina, endocitose dependente de caveolina, macropinocitose e endocitose independente de clatrina e caveolina (KOU *et al.*, 2013).

Na endocitose dependente de clatrina, depois que a nanopartícula interage com receptores da membrana, uma proteína citosólica chamada clatrina-1 polimeriza sobre o lado citosólico da invaginação no local onde a partícula será internalizada. Depois de envolver as nanopartículas no interior, a vesícula é formada pelo pinçamento da membrana por meio da atividade GTPase da proteína dinamina, formando vesículas revestidas com clatrina (VRC). Com movimentação fornecida por actina, VRCs avançam dentro da célula com destino definido pelo receptor ao qual a nanopartícula se ligou (KOU *et al.*, 2013).

A endocitose dependente de caveolina é a via mais comum de entrada de nanopartículas nas células. Essa via pode resultar na não interação com lisossomos, motivo pelo qual acredita-se ser benéfica a entrega de nanossistemas por endocitose dependente de caveolina. Ao ligar-se aos receptores na membrana plasmática, as nanopartículas podem interagir com os receptores para induzir a formação de vesículas, que também são pinçadas da membrana pela dinamina. De forma semelhante à endocitose dependente de clatrina, vesículas com caveolina exigem actina para se deslocar no interior da célula. As vesículas de caveolina se fundem com os caveossomas ou corpos multivesiculares, que tem um pH neutro e que se direcionam para o retículo endoplasmático. Uma vez no retículo, nanomateriais podem distribuir-se no citoplasma, e/ou, entrar no núcleo através do complexo do poro nuclear (XIANG *et al.*, 2012).

A macropinocitose é comumente definida como uma via transiente, independente de clatrina e caveolina, induzida por fatores de crescimento, movida pela actina que internaliza fluidos próximos às células em grandes vacúolos. A carga absorvida por meio desta via é inespecífica e geralmente iniciada com estímulos externos que ativam receptores tirosina-quinases. Em macrófagos, após a separação da membrana, macropinosomas movem-se no citosol e se fundem com os lisossomos. Em contraste, nas células humanas de carcinoma epinocelular os macropinosomas se deslocam para a superfície da célula e liberam o conteúdo para o meio extracelular. Desta forma, o destino dessas vesículas é célula-dependente (KOU *et al.*, 2013) .

A endocitose clatrina e caveolina independente é uma via diferenciada por depender do colesterol e requerer composições de lipídeos específicos para que ocorra. Dinaminas também desempenham um papel chave nesta via, mas ela ainda é pouco compreendida(KOU *et al.*, 2013).

Desta forma, dependendo do tipo de via utilizada pela célula para a internalização no nanossistema, determinadas organelas serão envolvidas e responsáveis pelo destino dos nanossistemas e seus componentes.

### **2.3.2 Citolocalização de nanossistemas**

Para uma compreensão abrangente dos efeitos das nanopartículas em células e tecidos normais ou alterados, o conhecimento sobre as estruturas alvo, distribuição local e sistêmica após a administração e seu destino final é indispensável.

A Tabela 1 demonstra alguns dos diversos métodos microscópicos que podem ser utilizados individualmente ou associados para o estudo de nanopartículas e de seus diversos componentes em nível celular.

Tabela 1. Métodos utilizados na visualização de nanopartículas em células e tecidos e as principais vantagens e limitações de cada técnica (Adaptado de OSTROWSKI *et al.*, 2015).

<b>Método</b>	<b>Necessidade de marcação</b>	<b>Principais vantagens</b>	<b>Principais limitações</b>
<i>MICROSCOPIA DE LUZ</i>	Depende de nanossistema utilizado	Fácil e de baixo custo, excelente avaliação dos efeitos morfológicos no contexto da detecção do nanossistema	Resolução teórica limitada de detecção (acima de 200 nm), apenas para alguns nanossistemas disponíveis como técnica de imagem, artefatos de coloração, especificidade de protocolos de coloração
<i>AUTORADIOGRAFIA MICROSCÓPICA DE LUZ E ELETRÔNICA</i>	Sim	Altamente sensível e específico, excelente avaliação de mudanças patomorfológicas em tecidos	Longo tempo de exposição, caro, manipulação de radioativo, requisitos de segurança de radiação
<i>MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA</i>	Sim, exceto para Quantum Dots e nanopartículas com fármacos fluorescentes	Fácil e de baixo custo, possível identificação de imunofluorescência de células alvo e compartimentos subcelulares, alta especificidade	Limitada resolução (acima de 200 nm), impossível avaliar a patomorfologia sem imunomarcagem das células, autofluorescência
<i>MICROSCOPIA CONFOCAL DE TEMPO DE VIDA DE FLUORESCÊNCIA</i>	Sim, exceto para Quantum Dots e nanopartículas com fármacos fluorescentes	Alta seletividade, a diferenciação de fluorescente NP de autofluorescência, rotulagem de imunofluorescência de células e compartimentos possível com diversos marcadores em uma mesma lâmina	Resolução limitada (acima de 200 nm)
<i>ISOLAMENTO ESPECTRAL</i>	Sim, exceto para Quantum Dots e nanopartículas com fármacos fluorescentes	Fácil, rotulagem de imunofluorescência de células e compartimentos possível com um elevado número de diferentes marcadores em uma mesma lâmina, alta especificidade, diferenciação de NPs fluorescente de autofluorescência	Resolução limitada (acima de 200 nm)
<i>ILUMINAÇÃO ESTRUTURADA DE SUPERRESOLUÇÃO</i>	Sim, exceto para Quantum Dots e nanopartículas com fármacos fluorescentes	Fácil, identificação de imunofluorescência de células alvo e compartimentos subcelulares, alta seletividade, melhor resolução (~ 100 nm), reconstruções em 3D possível	Autofluorescência, fotodegradação de fluorocromo

<i>IMAGEAMENTO POR RAMAN MICROSPECTRAL</i>	Nenhuma	Altamente seletivo para ligações químicas no tecido e células, interações de células e NPs incluindo mudanças químicas podem ser estudadas, preparação de amostra desnecessária ou mínima	Resolução limitada (1 $\mu\text{m}$ ), demorado processo de obtenção de imagem, desafiando análise espectros, autofluorescência
<i>MICROSCOPIA DE VARREDURA COM TRANSMISSÃO DE RAIOS X</i>	Depende de contraste de absorção de raios-X em relação ao tecido, suficiente para a maioria de NPs inorgânicas	Resolução aumentada comparada com a microscopia de fluorescência, elevada resolução espacial ( $\geq 10$ nm), sem coloração necessária, avaliação de alterações da composição química da NP <i>in situ</i> , possível imageamento de amostras hidratadas de até $10\mu\text{m}$ de espessura, correlacionável com microscopia confocal e outras técnicas de microscopia óptica	Esforço significativo técnico necessário, número limitado de instalações experimental, avaliação limitada de mudanças patomorfológicas.
<i>MICROSCOPIA DE RAIOS-X CRIO-3D</i>	Depende de contraste de absorção de raios-X em relação ao tecido, suficiente para a maioria de NPs inorgânicas	Alta resolução ( $\geq 20$ nm), imagens 3D, a avaliação de células congeladas e amostras de tecidos grossos, sem alterações de células e tecidos devido à embebedamento, cortes ou contrastando	Tecnicamente exigente, número limitado de instalações experimentais
<i>MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO, INCLUINDO CRIO-MET</i>	Depende da densidade de elétrons	De alta resolução (até 0,1 nm); informações detalhadas sobre as alterações subcelulares e estrutura de NPs, visualização de NPs individualizadas, combinação com espectroscopia de raio-X ou espectroscopia de perda de energia de elétrons permite a análise elementar dentro de amostra	Visualização apenas de NPs eletro-densas, longo tempo de preparo de amostras e análises, artefatos de coloração e encolhimento (sem encolhimento em crio-MET), apenas cortes de tecidos finos (70 nm) podem ser estudados
<i>MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA, INCLUINDO CRIO-MEV</i>	Depende da densidade de elétrons	De alta resolução (até 1 nm), informações detalhadas de interações célula-NP, combinação com espectroscopia de raio-X ou espectroscopia de perda de energia de elétrons permite a análise elementar dentro de amostra	Complexa preparação de amostras, tecnicamente exigente

### 2.3.3 Biodistribuição de nanossistemas

Com a ampla gama de possibilidades que a nanotecnologia permite com o advento dos diversos nanossistemas sendo desenvolvidos, é de extrema importância que a biodistribuição seja entendida uma vez que afeta tanto a eficácia quanto segurança destes sistemas de liberação de fármacos, fatores decisivos para que a sua aplicação clínica seja viável (ALMEIDA *et al.*, 2011).

A biodistribuição de nanossistemas é influenciada por uma miríade de fatores, dentre eles a via de administração, propriedades dos nanossistemas e o ambiente fisiológico onde são administrados. Dentre as muitas rotas de administração possíveis, na Tabela 2 estão descritas as principais vias e o destino típico já observados para nanopartículas após a administração.

Tabela 2. Vias de administração de nanopartículas em estudos pré-clínicos (adaptado de CHENG et al., 2015). \*Mecanismos ainda não elucidados ou esclarecidos.

<b>Vias</b>	<b>Exemplos de possíveis alvos patológicos</b>	<b>Destino típico</b>
<b><i>Administração não-mucosal</i></b>		
Infusão cerebral	Glioblastoma multiforme, tumores cerebrais pediátricos, doença de Parkinson	Penetração dependente de tamanho; retenção local; remoção para espaços perivasculares*
Infusão na medula espinhal	Danos a medula espinhal	Retenção local*
Injeção periocular	Glaucoma e retinoblastoma	Entrega para o tecido intraocular
Injeção intravitreal	Degeneração macular	Entrega para a câmara vítrea e retina
Aplicação tópica	Recuperação insuficiente de feridas	Retenção local
Injeção subcutânea	Vacinas contra doenças infecciosas e linfoma	Retenção local e remoção pelo sistema linfático
Injeção intraperitoneal	Câncer de ovário	Retenção local no peritônio e distribuição sistêmica
Injeção intramuscular	Isquemia e vacinas contra doenças infecciosas	Retenção local e remoção pelo sistema linfático
Injeção intradérmica	Vacinas contra doenças infecciosas	Retenção local e remoção pelo sistema linfático
Injeção intra-articular	Osteoartrite	Penetração dependente do tamanho, retenção local, e remoção por mecanismos desconhecidos*
<b><i>Administração local na mucosa</i></b>		
Tópica - vaginal	Prevenção de doenças sexualmente transmissíveis	Retenção na mucosa e penetração tecidual
Inalação	Fibrose cística, doença pulmonar intersticial e câncer de pulmão	Entrega para o trato respiratório
Intranasal	Doenças respiratórias infecciosas	Entrega para trato respiratório e sistema nervoso central*
Oral	Diabetes Insulina-dependente	Entrega para trato gastrointestinal
Tópica - olho	Glaucoma	Entrega para a córnea e difusão lateral para tecidos oculares
<b><i>Administração sistêmica</i></b>		
Endovenosa	Diversa	Distribuição sistêmica e remoção por sistema fagocitário mononuclear

Apesar das diversas vias descritas, a administração endovenosa é a mais estudada por apresentar um potencial de entrega aos diversos sistemas teciduais. Nesta via, a administração resulta na exposição dos nanossistemas ao rico ambiente proteico dos vasos sanguíneos em que a interação com as proteínas pode afetar quantitativa e qualitativamente a meia vida e biodistribuição dos nanossistemas (MOGHIMI; HUNTER; ANDRESEN, 2012). Esta adsorção proteica é tida como um evento dinâmico que aumenta o tamanho hidrodinâmico, afeta a estabilidade e modula a funcionalidade da superfície dos nanossistemas (LYNCH; DAWSON, 2008). Outro evento importante decorrente da interação de proteínas com os nanossistemas nos vasos sanguíneos é a opsonização, que resulta na facilitação da remoção dos nanossistemas da circulação pelos fagócitos circulantes assim como pelos macrófagos presentes principalmente no fígado e baço. As opsoninas-chaves neste processo incluem várias subclasses de anticorpos e produtos do sistema complemento (MOGHIMI; HUNTER; ANDRESEN, 2012).

Uma vez em circulação na rede venosa os nanossistemas são transportados diretamente ao ventrículo direito do coração e em seguida levados para a circulação pulmonar. Os capilares pulmonares estão dentre os menores vasos presentes no corpo, com um diâmetro entre 2 e 13  $\mu\text{m}$  em humanos e roedores, o que resulta na retenção no pulmão de nanossistemas de tamanho maior que o citado ou que sofreram intensa adsorção proteica (BERTRAND; LEROUX, 2012). Desta forma, o tratamento de enfermidades pulmonares pode ser intensamente explorado pelo uso de nanossistemas com tamanho/superfície adequada.

Tendo percorrido os capilares pulmonares, os nanossistemas no sangue voltam ao coração pelas veias pulmonares, desta vez no ventrículo esquerdo e de lá são direcionados para diferentes órgãos seguindo a porcentagem demonstrada na Figura 2.



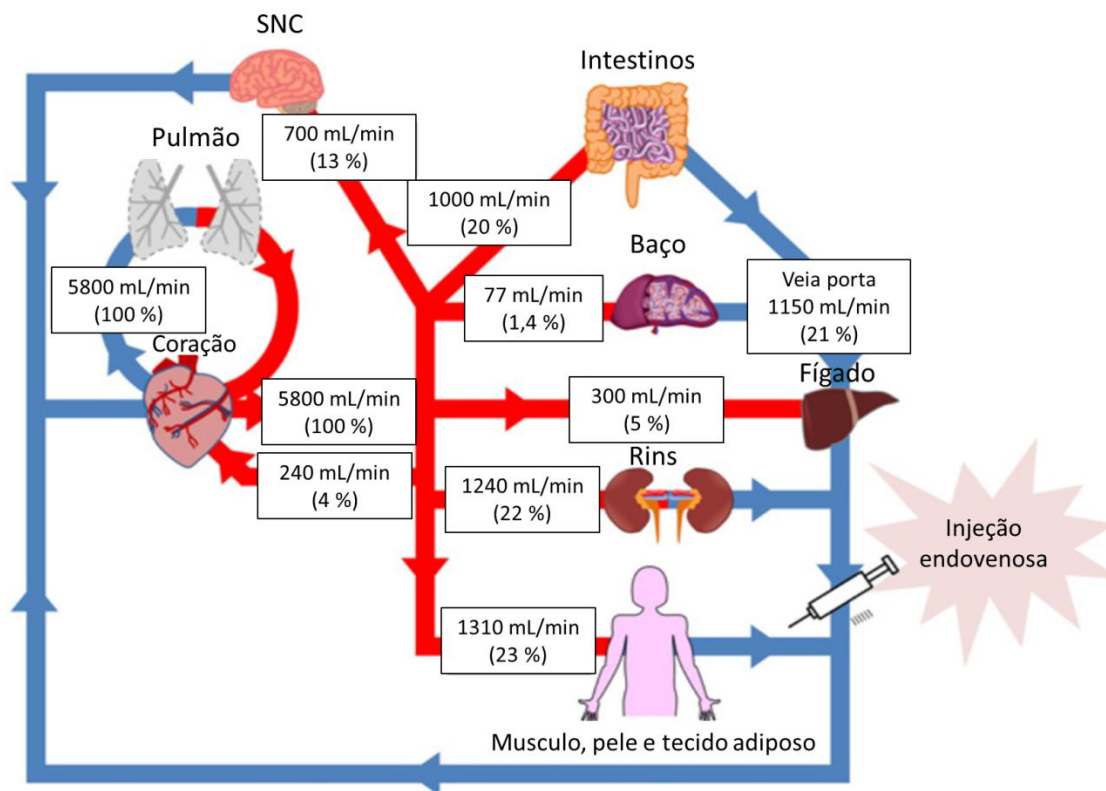


Figura 2. Representação da vazão sanguínea pulmonar e sistêmica. Valores entre parênteses representam porcentagem de vazão sanguínea total por órgão. SNC: sistema nervoso central. Adaptado de BERTRAND; LEROUX (2012).

Os rins são responsáveis pela filtração do sangue e tem um parênquima composto pelo córtex e medula. Toda a filtração ocorre no corpúsculo renal do córtex e em um primeiro momento é definida por fenestrações dos capilares de 60 a 80 nm de tamanho. No glomérulo, elementos de aproximadamente 6 nm são filtrados enquanto solutos maiores são retidos e mantidos em circulação (BERTRAND; LEROUX, 2012).

O sangue que chega ao fígado, tanto diretamente do coração, como dos intestinos, encontra neste órgão uma rede sinusoidal até chegar às veias hepáticas. O sinusoides são vasos de aproximadamente 40 µm de diâmetro e que possuem um epitélio com fenestrações de 100 a 150 nm, permitindo a passagem dos componentes plasmáticos para o espaço perisinusoidal onde se encontram os hepatócitos. Dentro dos capilares sinusoidais se encontram as células de Kupffer, macrófagos que são responsáveis pela maior parte da atividade fagocítica do fígado e

que representam de 80 a 90% de toda a população de macrófagos do corpo (MOGHIMI; HUNTER; ANDRESEN, 2012).

Os macrófagos reconhecem as opsoninas decorrentes da exposição dos nanossistemas às proteínas plasmáticas e realizam a fagocitose. Após a internalização nos macrófagos, se os nanossistemas são passíveis de serem degradados pelos fagossomas, os resíduos resultantes sofrem exocitose. No caso dos fagossomas não conseguirem degradar o nanossistema, como ocorre com partículas inorgânicas, eles são sequestrados em corpos residuais ou secretados pela bile (BERTRAND; LEROUX, 2012).

O baço é um órgão intensamente vascularizado em que a circulação pode ocorrer por duas vias: circulação fechada ou por circulação aberta. A circulação aberta no parênquima leva à exposição do sangue a macrófagos que filtram patógenos, eritrócitos antigos da corrente sanguínea assim como removem elementos opsonizados. Existe uma importante distinção entre o baço com circulação sinusoidal (humanos e ratos) e não sinusoidal (camundongos): na presença de vasos sinusoides, partículas acima de 200 nm permanecem mais tempo retidos no baço, o que acarreta em maior remoção desses elementos da circulação (DEMOY *et al.*, 1999).

Tanto as células de Kupffer no fígado, como os macrófagos do baço, fazem parte do sistema fagocitário mononuclear (constituído também pelos monócitos e macrófagos dos linfonodos) antigamente denominado de sistema reticulo endotelial. Estas células estão envolvidas na remoção de nanossistemas opsonizados da circulação e são o local mais frequente em que encontramos nanossistemas com diâmetro hidrodinâmico maior que 6 nm (BERTRAND; LEROUX, 2012).

Polímeros hidrofílicos, sendo o polietilenoglicol o mais conhecido, podem ser conjugados ou adsorvidos à superfície de nanossistemas diminuindo a capacidade de proteínas plasmáticas de se ligarem ao mesmos e conseqüentemente aumentando o tempo de circulação e diminuindo a captação pelo sistema fagocitário mononuclear (ALEXIS *et al.*, 2008). Vale ressaltar que o aumento demasiado da circulação de nanossistemas pode levar a uma maior toxicidade.

#### **2.3.4 Métodos de estudo da biodistribuição de nanossistemas**

Dentre as abordagens de localização e quantificação de componentes de nanossistemas, duas principais se destacam: imageamento *in vivo* e/ou quantificação *ex vivo*.

Técnicas não-invasivas de obtenção de imagem têm tido um papel cada vez mais importante na avaliação da interação dos nanossistemas com sistemas biológicos. Dentre essas modalidades, as principais são a tomografia por emissão de pósitrons (*positron emission tomography* - PET), tomografia computadorizada por emissão de fóton único (*single photon emission computed tomography* – SPECT), ressonância magnética, tomografia computadorizada de raio-X, ultrassom e as recentes técnicas ópticas de detecção de bioluminescência *in vivo* e fluorescência *in vivo* (WUNDER; KLOHS, 2010).

Entre as técnicas citadas, as de obtenção de imagens ópticas consistem nas modalidades com melhor custo-benefício, além de serem rápidas e de fácil utilização. A obtenção de imagens por bioluminescência requer que células do tecido de interesse expressem a proteína luciferase, uma enzima que na presença de luciferina ou equivalente, catalisa a conversão de luciferina em oxiluciferina que proporciona contraste de imagem pela emissão de luz. Já na técnica de fluorescência, a excitação de elementos fluorescentes por uma fonte externa resulta na emissão de luz e consequente identificação da localização do sinal (CHOY *et al.*, 2003).

Quando se utiliza a detecção de fluorescência *in vivo*, a baixa energia da luz, a absorção e o espalhamento de fótons nos tecidos limitam a resolução espacial do objeto de interesse, mas os avanços no método têm permitido sua aplicação em diversos modelos de câncer (KAIJZEL; VAN DER PLUIJM; LÖWIK, 2007), artrite (WUNDER *et al.*, 2005), derrames (KLOHS, J. *et al.*, 2008; KLOHS, JAN *et al.*, 2009) entre outros.

A utilização de fluorescência *in vivo* para determinação da biodistribuição *in vivo* de nanopartículas contendo elementos fluorescentes já foi demonstrada por diversos autores (CUI *et al.*, 2012; EVJEN *et al.*, 2012; REUL *et al.*, 2012; TEXIER *et al.*, 2009), dentre outros, e mostra o caminho para a promissora área chamada de teranóstica, a associação da terapia ao diagnóstico (KELKAR; REINEKE, 2011). Em 2010, SHIRMANOVA *et al.*, demonstraram com fluorescência *in vivo* a farmacocinética de fotossensibilizantes *in vivo* e obtiveram resultados condizentes com quantificações *ex vivo*.

Além das técnicas de obtenção de imagens *in vivo* a partir da detecção de luz, há as técnicas de ampla aplicação e já em uso em clínicas de ressonância magnética e de tomografia

computadorizada por emissão de fóton único. A técnica de ressonância magnética oferece alta resolução espacial e detalhes anatômicos de tecidos em três dimensões. Nanopartículas magnéticas são descritas como excelentes agentes de contraste para uso nesse tipo de imageamento (Lee *et al.*, 2013). Já a técnica de tomografia computadorizada por emissão de fóton único utiliza a radiação gama produzida por isótopos para localizar e quantificar radioisótopos, livres ou associados a nanopartículas, também com detalhes anatômicos em três dimensões nos tecidos (MÜLLER; SCHIBLI, 2013).

Já como principal técnica de quantificação *ex vivo* de componentes de nanossistemas, a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), do inglês High Performance Liquid Chromatography – HPLC, é extensamente utilizada na identificação de fármacos e metabólitos em estudos farmacocinéticos devido a: 1) detecção rápida e simultânea de diferentes fármacos e metabólitos; 2) capacidade de utilização na identificação e otimização de parâmetros cinéticos de fármacos em suas diferentes formas farmacêuticas; 3) obtenção de separação analítica em escala semi-preparativa, possibilitando ainda a identificação de prováveis metabólitos desconhecidos com a detecção por espectrometria de massa (ZECH *et al.*, 1979).

#### **2.4 Terapia fotodinâmica**

A terapia fotodinâmica (TFD) é uma modalidade terapêutica que utiliza luz em um comprimento de onda específico, um fotossensibilizante e o oxigênio molecular para gerar estresse oxidativo no tecido alvo (TONG; KOHANE, 2012). De forma geral, a TFD consiste primeiramente pelo uso de um fotossensibilizante ou precursor que é administrado por meio de uma das seguintes vias: tópica, oral, intravascular ou intratumoral. Geralmente é determinado o tempo ótimo de distribuição do fotossensibilizante para que ele se acumule no local de interesse e em seguida, o alvo é exposto à luz em um comprimento de onda que coincida com a faixa de comprimento de onda máximo de absorção do fotossensibilizante sendo utilizado (DE ROSA; BENTLEY, 2000). Desta forma, mesmo aplicado sistemicamente, o efeito de morte celular ocorrerá somente no local onde o fotossensibilizante foi acumulado, e em seguida fotoativado, o que vai gerar espécies reativas de oxigênio naquela região específica (BROWN; BROWN; WALKER, 2004).

A TFD já se mostrou eficiente para o tratamento de uma ampla variedade de malignidades. Dentre elas, no tratamento de câncer nos seus estágios iniciais, tal como no caso de displasia esofágica (QUMSEYA; DAVID; WOLFSEN, 2013), câncer pulmonar (SIMONE *et al.*, 2012), câncer da cabeça e pescoço (RIGUAL *et al.*, 2013), câncer de pele não melanoma (GRIFFIN; LEAR, 2016), câncer anal (ALLISON *et al.*, 2010), entre outros. Além disso, a TFD já se mostrou eficiente no tratamento de doenças inflamatórias e proliferativas não neoplásicas, tais como casos de escleroderma, acne vulgaris, psoríase, sarcoidose, necrobiose lipoídica e leishmaniose (ENK *et al.*, 2015; LAU; MOSELEY; IBBOTSON, 2014).

Dentre os fotossensibilizantes com resultados promissores na terapia fotodinâmica, as ftalocianinas têm recebido crescente destaque. A ftalocianina é um corante azul vívido descoberto acidentalmente em 1907 por Braun e Tcherniac como o resultado da reação dos precursores ftalimida e anidrido acético (MOSER; THOMAS, 1963). As ftalocianinas metálicas, derivadas da ftalocianina, têm em seu centro um metal que aumenta significativamente a sua solubilidade, entretanto ainda se apresentam como extremamente hidrofóbicas.

A cloreto de alumínio ftalocianina (AlClFt) que possui o alumínio (III) na posição central do anel, apresenta excepcional rendimento quântico na produção de oxigênio singletos e tripletos (JAYME; CALORI; TEDESCO, 2016). Entretanto, a hidrofobicidade de AlClFt (Figura 3) requer o uso de novas tecnologias de entrega para promover a sua dispersão em ambientes fisiológicos (MUEHLMANN *et al.*, 2015).

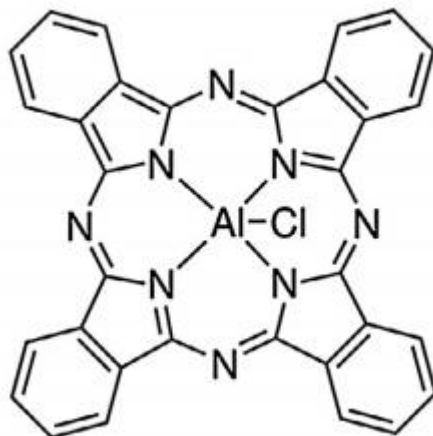


Figura 3. Representação gráfica da molécula de alumínio cloro ftalocianina.

Neste contexto, a nanotecnologia tem servido como importante aliada no uso de AICIFt com a sua associação a lipossomas, nanoemulsões, dentre outros (NUNES; SQUILLA; TEDESCO, 2004)(LONGO, JOÃO PAULO FIGUEIRÓ *et al.*, 2009)(LONGO, JOÃO PAULO F. *et al.*, 2012)(MUEHLMANN *et al.*, 2015).

No presente trabalho, com o intuito de desenvolver um nanossistema simples e eficiente para carrear o fotossensibilizante AICIFt, foi desenvolvida e caracterizada micela de Pluronic® F127 e sua efetividade terapêutica na terapia fotodinâmica foi avaliada. Com o intuito de viabilizar que estudos de biodistribuição de nanossistemas contendo AICIFt fossem realizados com precisão analítica, um método cromatográfico associado a espectrometria de massa foi desenvolvido e validado. Já com o intuito de desenvolver nanossistema com múltipla marcação condizente com o uso de diferentes técnicas de imageamento *in vitro* e *in vivo*, nanoemulsão magnética contendo AICIFt foi desenvolvida e sua biodistribuição foi avaliada.

### 3. JUSTIFICATIVA

Apesar de nanossistemas transportando o fotossensibilizante AICIFt já terem sido desenvolvidos e testados, um nanossistema de fabricação simples e espontânea, com compostos já estabelecidos como não tóxicos, permitirá maior facilidade de produção e uso na TFD.

Além disso, o desenvolvimento de método cromatográfico reprodutível, sensível e seletivo para detecção de AICIFt em amostras biológicas consistirá em ferramenta de extrema utilidade no estudo da biodistribuição de nanossistemas contendo AICIFt.

Por fim, elucidar como os componentes de nanossistemas se comportam quando expostos a sistemas biológicos é um passo fundamental para a compreensão de sua utilização clínica. O desenvolvimento de uma nanoemulsão magnética com elementos rastreáveis permitirá entender em qual etapa de exposição o nanossistema se desestruturará em vários componentes, como esses componentes interagem com as células e quando e em que proporção atingem seus possíveis alvos. Dessa forma, o presente projeto pretende desenvolver nanossistema e utilizar técnicas de citolocalização e de biodistribuição, para localizar os componentes de um nanossistema multimodal com potencial terapêutico nas modalidades terapêuticas de magnetohipertermia, fotodinâmica e fototermal.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo Geral

Desenvolver nanossistemas para uso em terapia fotodinâmica contendo o fotossensibilizante cloreto de alumínio ftalocianina; estudar sua interação biológica tanto em nível celular quanto em nível sistêmico; e desenvolver método cromatográfico para sua detecção em material biológico.

### 4.2 Objetivos Específicos

Capítulo 1:

- Preparar e caracterizar micelas de pluronic contendo AICIFt (F127/AICIFt)
- Verificar efetividade de F127/AICIFt após exposição a diodo emissor de luz de 660 nm
- Quantificar a interiorização de F127/AICIFt em células de adenocarcinoma pulmonar humano (A549)
- Citocalizar F127/AICIFt em células A549
- Realizar terapia fotodinâmica de células A549

Capítulo 2:

- Desenvolver método de cromatografia líquida de ultra alta eficiência (CLUE) para quantificar AICIFt em nanossistemas e tecidos biológicos
- Estudar interação biológica de AICIFt com tecidos biológicos por espectrometria de massa
- Validar método bioanalítico desenvolvido

Capítulo 3:

- Sintetizar e caracterizar nanoemulsão magnética contendo AICIFt (NE-MAG-Ft)
- Verificar interiorização, citotoxicidade e citocalização de NE-MAG-Ft em células de adenocarcinoma pulmonar humano (A549) e em macrófago murino (RAW)
- Realizar terapia fotodinâmica de A549 e RAW com NE-MAG-Ft
- Radiomarcador de NEMAG-AICIPc com Ga-67



- Avaliar biodistribuição de NE-MAG-Ft-Ga-67 por tomografia computadorizada por emissão de fóton único
- Avaliar biodistribuição de NE-MAG-Ft por fluorescência *in vivo*
- Avaliar biodistribuição de NE-MAG-Ft por cromatografia líquida de alta eficiência

## **CAPÍTULO 1**

### **DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE MICELA DE PLURONIC F127 CONTENDO O FOTOSSENSIBILIZANTE CLORETO DE ALUMÍNIO FTALOCIANINA PARA O TRATAMENTO DE ADENOCARCINOMA PULMONAR HUMANO (A549) COM USO DE TERAPIA FOTODINÂMICA**

## 1. INTRODUÇÃO

Nanossistemas têm se tornado uma área de interesse crescente devido a sua habilidade excepcional de transportar e liberar fármacos, protegendo-os contra a degradação e/ou excreção além de reduzir efeitos adversos dos mesmos (GONG *et al.*, 2013; MIGNANI *et al.*, 2015). Dentre os diversos nanossistemas que vem sendo atualmente desenvolvidos, micelas poliméricas têm tido destaque crescente desde que foram inicialmente propostas por DORN; HOERPEL; RINGSDORF (1985).

Um exemplo promissor é representado pelo polímero Pluronic<sup>®</sup>, nome comercial de uma classe biocompatível de copolímeros em bloco (BATRAKOVA; KABANOV, 2008). Pluronicos apresentam uma estrutura de tri-blocos intercalando os poli óxidos de etileno (POE) e de propileno (POP) organizados como POE-POP-POE e já foram aprovados para uso pela Food and Drug Administration americana (FDA) como tendo mais benefícios do uso do produto em relação aos riscos (“FDA approved”)(AKASH; REHMAN, 2015). Micelas de Pluronic<sup>®</sup> são obtidas acima de uma temperatura e concentração micelar crítica se auto-organizando em um núcleo hidrofóbico e uma casca hidrofílica (WU *et al.*, 1997). Esta organização permite que o núcleo atue como transportador de fármacos ou agentes de diagnóstico hidrofóbicos (BATRAKOVA; KABANOV, 2008). As vantagens da acumulação passiva de fármacos encapsulados em micelas de Pluronic<sup>®</sup> em relação à de fármacos livres já foi comprovada em tumores sólidos e este comportamento foi atribuído ao maior tempo de circulação dos fármacos uma vez associados às micelas (KWON; KATAOKA, 1995). Micelas de Pluronic<sup>®</sup> também se mostraram capazes de atravessar tanto a mucosa intestinal quanto a barreira hematoencefálica (BATRAKOVA; KABANOV, 2008; KWON; KATAOKA, 1995)[11,16].

Para uso em TFD, o fotossensibilizante hidrofílico clorina e6 foi conjugado a micelas de Pluronic<sup>®</sup> F127 para aumentar a internalização e acúmulo tumoral (PARK; NA, 2013). ROMERO *et al.*, (2013) realizaram a síntese de ftalocianina de zinco conjugada a mentol e demonstraram que a sua incorporação em micelas de Pluronic<sup>®</sup> F127 conservou as propriedades ópticas e que esse nanossistema tinha potencial promissor para aplicações biológicas. VILSINSKI *et al.*, 2015a, compararam a incorporação de AlClFt em micelas dos copolímeros Pluronic<sup>®</sup> F127 e F123 e

verificaram a eficácia das micelas no seu uso em TFD contra os microrganismos *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Candida albicans*.

A hidrofobicidade de fotossensibilizantes como a AICIFt é um empecilho para o seu uso biológico em terapia fotodinâmica, mas a nanotecnologia já se mostrou eficiente na otimização da entrega desta molécula a tecidos biológicos no tratamento de células tumorais (LONGO, JOÃO PAULO FIGUEIRÓ *et al.*, 2009)(MUEHLMANN *et al.*, 2014, 2015). Entretanto, apesar da já estabelecida segurança e eficácia de Pluronic® F127 como nanossistema para carrear moléculas hidrofóbicas, nenhuma tentativa de uso do fotossensibilizante AICIFt associado ao Pluronic® F127 em terapia antitumoral se encontrava descrita na literatura até o desenvolvimento do presente estudo.

O câncer de pulmão é identificado como o tipo de câncer mais comum e a principal causa de morte relacionada a câncer. De acordo com a classificação proposta por WHO em 1981, existem dois tipos de cânceres pulmonares: carcinoma de pulmão de células pequenas e carcinoma de pulmão de células não pequenas (MA, YUNN-HWA *et al.*, 2009)(CHEN, DAO-JIN *et al.*, 2014).

O carcinoma de pulmão de células não pequenas é um câncer agressivo e um grave problema de saúde pública mundial (HOLMBERG *et al.*, 2010; RILEY *et al.*, 2013). Constitui aproximadamente 85% de todas as malignidades primárias de pulmão (SANGHA; PRICE; BUTTS, 2010). Apresenta três subtipos histológicos: o carcinoma de células escamosas, o carcinoma de células pulmonares grandes e o adenocarcinoma, registrando-se um aumento da incidência de adenocarcinoma nos últimos anos (CHEN, DAO-JIN *et al.*, 2014; HERBST; HEYMACH; LIPPMAN, 2008; RILEY *et al.*, 2013).

Considerando a facilidade de preparo das micelas de pluronic, inclusive localmente em clínicas com interesse em realizar TFD com AICIFt, o presente estudo se propõe a testar micela de Pluronic® F127 contendo AICIFt (F127/AICIFt) na erradicação de células de adenocarcinoma pulmonar humano, uma vez que abordagens terapêuticas simplificadas podem favorecer a transposição da nanotecnologia da bancada laboratorial para seu uso em pacientes.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. Materiais

As micelas de Pluronic® F127 contendo o fotossensibilizante AIClFt utilizadas neste estudo foram preparadas juntamente com o pesquisador Joy Namban (Instituto Nalanda de Engenharia e Tecnologia, Guntur, Andra Pradesh, Índia) da seguinte forma:

Solução de Pluronic® F127 (50 mg/mL ou 150 mg/mL) em tampão fosfato foi preparada pela dissolução de Pluronic® F127 com agitação magnética seguida por 48 h a 5°C. Solução estoque de AIClFt (1 mg/mL) foi obtida pela sua dissolução em etanol, seguida por ultrassonicação em banho por 10 min.

As duas soluções de Pluronic® F127 foram misturadas a diferentes volumes da solução estoque de AIClFt e uma vez obtidas as micelas foram mantidas no escuro. Duas abordagens foram testadas para verificar as concentrações ótimas para obtenção das micelas. Primeiramente, se manteve constante a concentração de AIClFt (0,5 µg/mL) variando a concentração de F127 (1, 10, 50 e 150 mg/mL) obtendo as amostras S1, S2, S3 e S4. Em seguida, se manteve fixa a concentração de Pluronic® F127, assegurando estar acima da concentração micelar crítica para obtenção das micelas (50 mg/mL) e se variou a concentração de AIClFt (0, 0,05, 0,1, 1, 5, 10, 50, 0,01, 0,02, e 0,03 µg/mL) resultando nas amostras Pluronic® F127, S5, S6, S7, S8, S9, S10, S11, S12, e S13, respectivamente. Na Tabela 3 estão descritas as condições testadas neste estudo.

Tabela 3. Concentrações de AIClFt e Pluronic® F127 testadas nas micelas desenvolvidas.

Componentes	F127	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13
F127 (mg/mL)	50	1	10	50	150	50	50	50	50	50	50	50	50	50
AIClFt (µg/mL)	0	0,5	0,5	0,5	0,5	0,05	0,1	1	5	10	50	0,01	0,02	0,03

### 2.1 Caracterização de F127/AIClFt

O diâmetro hidrodinâmico (DH) e o potencial Zeta (Zp) das micelas foram determinados por dispersão dinâmica da luz e mobilidade eletroforética em ângulo de 90° no equipamento Zetasizer Nano ZS® (Malvern Instruments Ltd., Reino Unido; laser 633 nm). A análise foi realizada com as micelas puras, sem diluição.

A incorporação de AICIFt nas micelas foi estudada por espectroscopia de absorção e de emissão em espectrofotômetro. Os espectros de absorbância e fluorescência de F127/AICIFt foram obtidos em espectrofotômetro (Spectramax M2, Molecular Devices, EUA). Para isso, um volume de 200 µL de F127/AICIFt foi adicionado em placas de 96 poços e os espectros de absorbância e de emissão de fluorescência foram registrados (excitação a 350 nm, com análise do espectro óptico de 350 a 750 nm para absorbância e emissão de fluorescência).

A eficiência de encapsulação foi verificada pela quantificação de AICIFt nas micelas de F127 50 mg/mL e AICIFt de 0,05, 0,1, 0,5, 1 e 5 µg/mL (S5, S6, S3, S7 e S8). Assim que preparadas, as micelas foram submetidas a filtração em poro de 0,22 µm e em seguida centrifugadas a 14000 g por 15 min ou dissolvidas em etanol absoluto. O conteúdo de AICIFt das micelas filtradas e centrifugadas foi comparado com o conteúdo de AICIFt nas micelas simplesmente dissolvidas com etanol. A quantificação foi realizada por espectroscopia de emissão de fluorescência com excitação a 350 nm e detecção de emissão a 670 nm, após estabelecimento de curva padrão de AICIFt em etanol na faixa de 0,01 – 5 µg/mL.

Foi utilizada a equação para o cálculo da eficiência de encapsulação:

$$x = \frac{\text{AICIFt em micelas filtradas/centrifugadas}}{\text{AICIFt em micelas puras}} \times 100$$

## **2.2 Caracterização de potencial terapêutico de F127/AICIFt – produção de oxigênio singlete**

As propriedades fotoquímicas de F127 foram estudadas no intuito de confirmar a preservação da atividade fotossensibilizante de AICIFt. Para isso, a fonte de luz utilizada foi composta por bancos de 20 diodos emissores de luz (LED) modelo XL001WP01NRC660 (Shenzhen Sealand Optoelectronics Co., Ltd., China). O circuito de alimentação foi montado sob supervisão do Prof. Dr. Paulo Souza do Instituto de Física da Universidade de Brasília. O controle da corrente de alimentação capaz de garantir a estabilidade da iluminação foi realizado por um controlador RCD-24-0.35/W (Constant Current LED Driver, Recom Power, Inc., Alemanha). O espectro de emissão dos LEDs foi determinado utilizando-se um espectrofotômetro portátil (Ocean Optics Inc., EUA). Um potenciômetro digital (Fieldmax II, Coherent, EUA) foi utilizado para definir o valor de potência máxima dos LEDs, bem como os valores de potência em função da distância e a

posição relativa do banco de LEDs. Para garantir a reprodutibilidade da intensidade luminosa emitida pelo banco de LEDs, optou-se por realizar periodicamente a aferição da energia por unidade de tempo mediante uso de um potenciômetro. As medidas registradas pelo potenciômetro e a área do detector permitiram determinar que a fonte de luz possui densidade de potência de  $0,04 \text{ W/cm}^2$ .

Para identificar a eficácia da AIClFt como fotossensibilizante em F127/AIClFt, foi determinada a capacidade de geração de oxigênio singleto ( $^1\text{O}_2$ ) ao ser fotoativada. Desta forma, foi utilizado o método de degradação do 1,3-difenil-isobenzofurano (DBF), conforme metodologia adaptada de Spiller et al., 1998. O DBF é uma molécula que reage irreversivelmente com o  $^1\text{O}_2$ , extinguindo a absorbância de DBF, que apresenta pico máximo de absorbância a 410 nm. À medida que o DBF é decomposto pela geração de  $^1\text{O}_2$ , sua absorbância é reduzida de forma proporcional à quantidade de moléculas de oxigênio singleto gerada, permitindo a sua quantificação percentual.

Foi preparada uma solução de DBF (Sigma-Aldrich, Ltda., Alemanha) em uma concentração de  $0,225 \text{ mg/mL}$  em etanol. Em seguida, a solução foi agitada em vórtex por 2 min e levada ao banho ultrassônico até completa homogeneização da solução, que foi utilizada no máximo 2 h após seu preparo devido à rápida degradação de DBF em solução. Para o ensaio,  $10 \mu\text{L}$  da solução de DBF e  $190 \mu\text{L}$  da F127/AIClFt foram adicionados a placa de 96 poços e a degradação de DBF foi acompanhada após 10 ciclos de irradiação de 10 segundos, resultando na fluência de energia de  $0,4 \text{ J/cm}^2$  por ciclo de irradiação. Após 10 irradiações, a fluência total recebida pelas amostras foi de  $4 \text{ J/cm}^2$ .

## **2.3 Estudos *In vitro***

### **2.3.1 Cultivo celular**

Células de adenocarcinoma pulmonar humano (A549), (ATCC-CCL-185TM) foram utilizadas nos ensaios *in vitro*. As células foram cultivadas em meio RPMI 1640 suplementado com 10% (v:v) de soro fetal bovino (SFB) e 1% (v:v) de solução de antibiótico (100 unidades/mL de penicilina e 100 mg/mL de estreptomicina). As células foram mantidas em incubadora a  $37^\circ\text{C}$ , 80% de

umidade e 5% de CO<sub>2</sub>. RPMI 1640 e antibióticos utilizados foram adquiridos da Gibco (Life Technologies, Inc., EUA).

### 2.3.2 Citometria de fluxo

Visando confirmar a possível captação de AICIFt pelas células e estudar o tempo ótimo de exposição às células, foi utilizada a técnica de citometria de fluxo. Células de A549 foram dispostas em placas de 24 poços, na concentração de  $5 \times 10^4$  células/poço. Após 24 h de cultivo, o meio de cultivo foi removido e foram adicionados 400 ou 800 µL de PBS, ou F127/AICIFt ou AICIFt, pelos tempos de 10, 15, 30, 45, 60 e 120 min e mantidas a 37°C, atmosfera de 5% CO<sub>2</sub> e 80% de umidade. Não foi verificada diferença entre os dois volumes testados, portanto, todas as repetições foram realizadas com 400 µL. As células foram lavadas novamente com PBS e removidas da placa com 100 µL de Tripsina-EDTA. Em seguida, adicionou-se 40 µL de soro fetal bovino para inativar a tripsina e as células foram analisadas no citometro BD FACs Canto II, (Becton Dickinson, NJ, EUA). Dez mil eventos foram contados por amostra, em três experimentos independentes feitos em duplicatas, e a fluorescência de AICIFt foi observada no canal APC-A (detecção de emissão de  $660 \pm 20$  nm).

### 2.3.3 Microscopia confocal

Para confirmação da interiorização de F127/AICIFt após exposição das células A549 aos nanossistemas aqui descritos,  $5 \times 10^4$  células/poço foram dispostas em placas pretas de 24 poços de fundo em vidro (Corning®). Após 24 h de cultivo, o meio de cultivo foi removido e foram adicionados 400 µL de PBS, F127/AICIFt ou AICIFt e incubadas por 15 ou 45 min a 37°C, atmosfera de 5% CO<sub>2</sub> e 80% de umidade. As células foram lavadas novamente com PBS por duas vezes e fixadas com paraformaldeído 4% (m/v) por 15 min, lavadas por duas vezes com PBS e, em seguida, as células foram incubadas com 500 µL do marcador de núcleo DAPI (1 µg/mL - ThermoFischer Scientific, Massachusetts, EUA) por 5 min a temperatura ambiente. Após duas lavagens com PBS, 1 gota de Prolong AntiFade foi adicionado diretamente ao poço. Em seguida, as lâminas foram analisadas em microscópio confocal (Zeiss LSM510, Alemanha). Para visualização da AICIFt, utilizou-se os comprimentos de excitação e emissão de 350 e 690 nm, respectivamente. Para confirmação de que a fluorescência observada estava no interior das células, foi realizada a aquisição por z-staking do volume de uma célula por poço.



#### 2.3.4 Terapia fotodinâmica

Visando verificar a eficiência terapêutica de F127/AICIFt, as células A549 foram cultivadas em microplacas de 96 poços na concentração de  $5 \times 10^3$  células/poço. Após o período de 24 h, o meio de cultivo celular foi descartado e as células foram lavadas com PBS. As células foram incubadas com meio (controle) ou F127/AICIFt por 15 ou 45 min. Em seguida o sobrenadante foi removido e as células foram lavadas com PBS. Poços contendo somente F127/AICIFt foram submetidos ao mesmo processamento dos poços com células para identificação da possível interferência das nanopartículas no método. Foi adicionado PBS novamente às placas, e, enquanto uma placa sofria irradiação para verificação da fototoxicidade, outra idêntica era mantida no escuro para verificação da toxicidade nessa condição. Após 18 min de irradiação ou incubação no escuro as células foram lavadas com PBS e o meio RPMI foi reestabelecido. A fluência total utilizada nas placas foi de  $25,3 \text{ J/cm}^2$ , valor já estabelecido em trabalhos anteriores como ideal (LIANG, RUIZHENG *et al.*, 2014; MUEHLMANN *et al.*, 2015; RODRIGUES *et al.*, 2015; VELLOSO *et al.*, 2012). Após 24 h, as células foram incubadas com 0,5 mg/mL do corante vital 3,4,5-dimetiltiazol-2,5 bifenil tetrazolio bromide (MTT) em meio de cultivo por 2 h a 37°C em atmosfera úmida (80%) e 5%  $\text{CO}_2$ . Em células com a função mitocondrial preservada, o MTT é reduzido a formazan, de intensa coloração roxa, já em células com função mitocondrial comprometida não ocorre formação do cristal (MOSMANN, 1983; RIBEIRO, 2014). Em seguida, o meio com MTT foi removido e o formazan foi extraído das células com 200  $\mu\text{L}$  de DMSO por poço. A absorbância a 595 nm foi analisada em espectrofotômetro (Spectramax M2, Molecular Devices, EUA). A absorbância foi usada como um índice de viabilidade celular e os resultados expressos como porcentagens relativas aos grupos controles após 24 h dos tratamentos. Foram realizadas três repetições em dias diferentes de todos os experimentos.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Caracterização morfológica e fotofísica de micelas de F127/AICIFt

A incorporação de AICIFt em micelas de Pluronic® F127 foi estudada visando à obtenção de nanossistema para uso em terapia fotodinâmica. Para isso foi estudada a condição ideal da formação das micelas de F127. Já é conhecida a relação da formação da micela de polímeros em bloco com a temperatura da reação e a concentração do polímero (AKASH; REHMAN, 2015; WU *et al.*, 1997). Portanto, nesse estudo foi verificado o efeito da concentração de F127 mantendo a temperatura constante de 25°C.

Além disso, ftalocianinas são conhecidas pelo efeito da sua solubilidade na absorção e fluorescência, uma vez que é observado que as moléculas se agregam em condições hidrofílicas perdendo suas propriedades ópticas (GHANI; KRISTEN; RIEGLER, 2012). Portanto, além do estudar as propriedades fotossensibilizantes de AICIFt, a sua assinatura espectral serve como indicativo da organização micro/nanoestrutural das micelas de Pluronic® F127.

Na Figura 4 se observam os espectros de absorção e emissão do etanol, tampão fosfato, AICIFt (0,5 µg/mL) em etanol ou tampão fosfato e de micelas de F127/AICIFt em diferentes concentrações de polímero (variando de 1 a 150 mg/mL – S1, S2, S3 e S4).

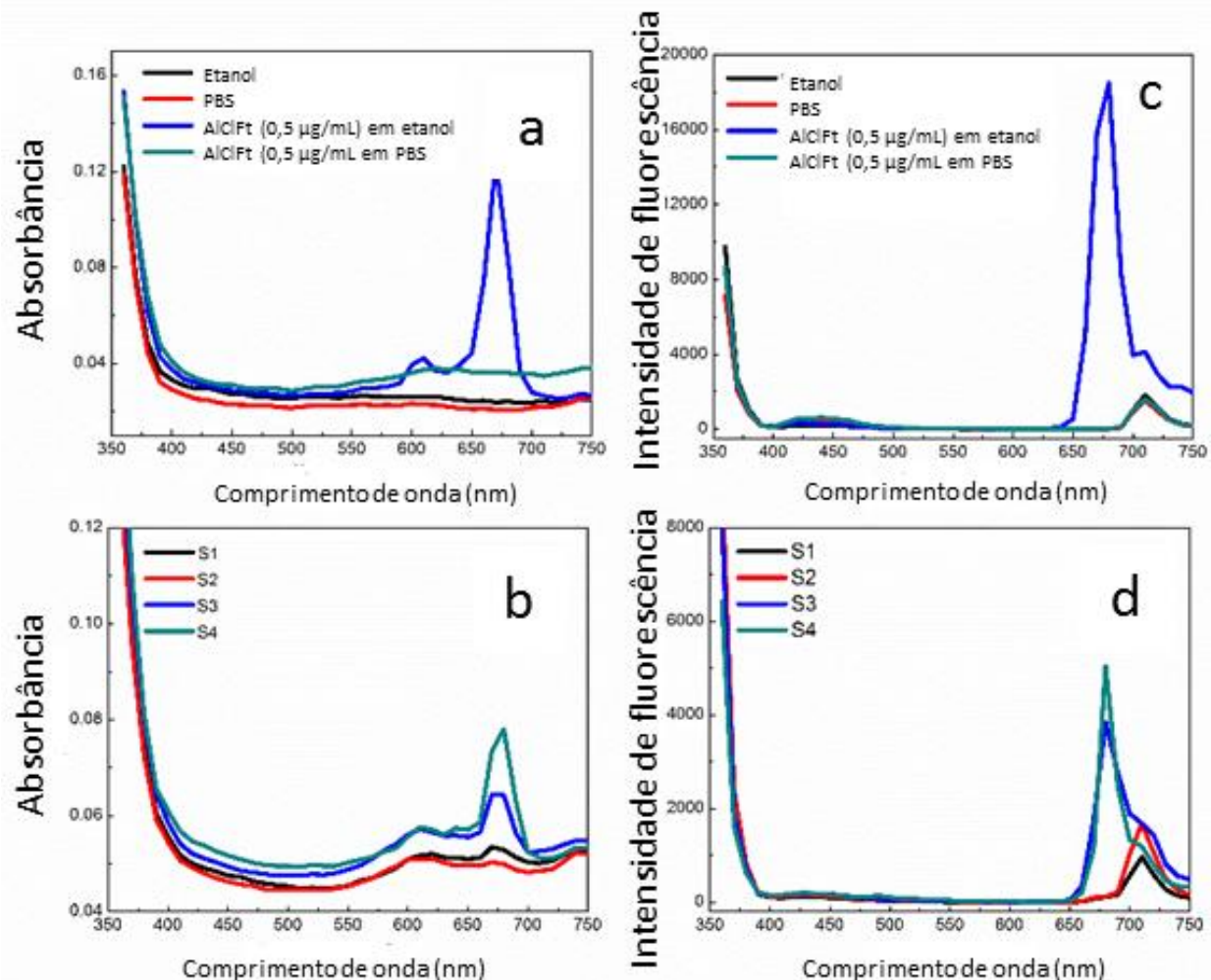


Figura 4. Espectro de absorção (a e b) e de emissão de fluorescência (excitação a 350 nm) (c e d) de AIClFt em etanol, PBS ou incorporadas nas micelas S1, S2, S3 e S4 (concentração de F127 de 1, 10, 50 e 150 mg/mL, respectivamente, e concentração de AIClFt em todas as amostras é de 0,5 µg/mL).

No espectro de absorbância de AIClFt em etanol (Fig. 4a), podemos identificar uma banda larga com um pico de absorção em 670 nm (Banda  $Q_{III}$ ) contendo um pico de menor intensidade a 610 nm (Banda  $Q_I$ ). Esta banda larga é descrita como uma transição eletrônica de  $\pi \rightarrow \pi^*$  da forma monomérica e dimérica, respectivamente (TEDESCO; ROTTA; LUNARDI, 2003; VILSINSKI, BRUNO H. *et al.*, 2015). Como esperado, AIClFt é insolúvel em tampão fosfato formando agregados visíveis e não foi possível identificar absorbância de AIClFt nessa solução (Fig 4a). Os espectros de emissão de fluorescência estão mostrados em Fig 4c e Fig 4d. Nestes se observa

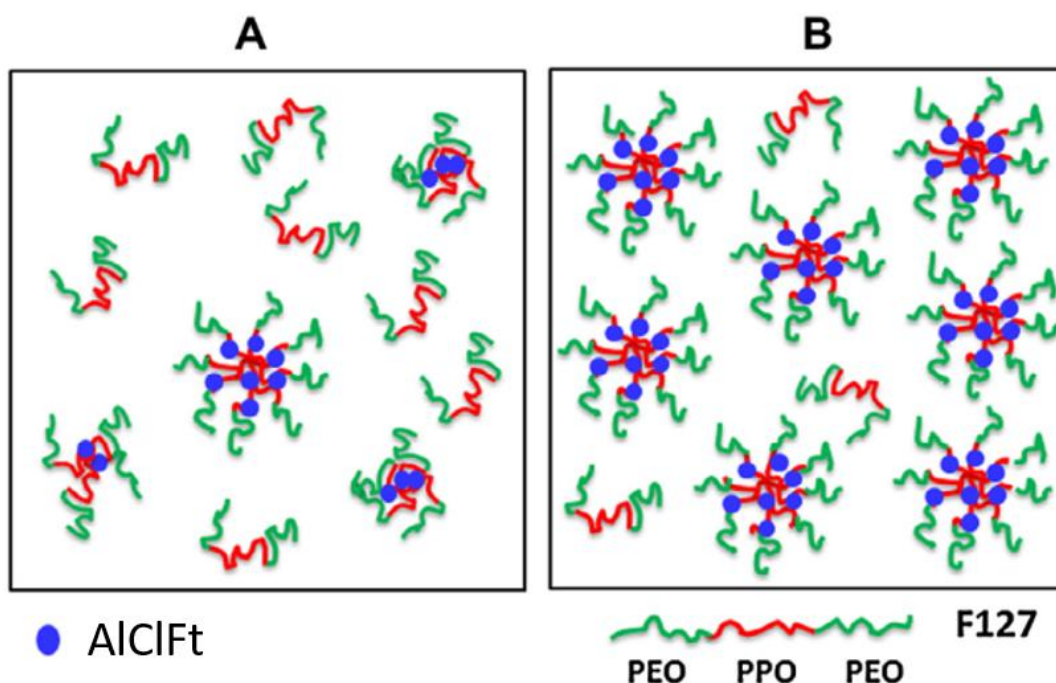
que AICIFt apresenta um pico de emissão em 680 nm quando dissolvida em etanol, mas não apresenta emissão quando dissolvida em tampão fosfato, reforçando a insolubilidade neste meio e a consequente agregação molecular. Os espectros do etanol e tampão fosfato demonstram que não existem picos interferentes dos solventes na faixa analisada. O pico observado em 710 nm nos espectros de fluorescência é decorrente da fonte de luz utilizada na excitação: se a amostra espalha excessivamente a luz utilizada na excitação, uma difração de segunda ordem, terceira ordem, etc, é observada (LAKOWICZ, 2006), e é o caso com a excitação a 350 nm e emissão em 700 nm.

Na Figura 4b e 4d é possível observar os espectros de absorção e emissão de F127/AICIFt. Como principal informação temos que mesmo em tampão fosfato, podemos observar absorção e emissão de AICIFt, indicando que AICIFt está incorporada dentro de um compartimento hidrofóbico de F127 e fotofisicamente ativa. Como estar ativa fotofisicamente é indispensável para que possa ocorrer a terapia fotodinâmica, a micela já apresenta potencial para entrega de AICIFt em tecidos biológicos.

Na Figura 4b, se observa que com aumento da concentração de F127, ocorre um aumento na absorção em 680 nm, pico associado à absorção da forma monomérica de AICIFt. Em ambientes aquosos, copolímeros se apresentam como monômeros abaixo da temperatura micelar crítica e como micelas acima dela, mas em diferentes temperaturas a concentração micelar crítica pode mudar em várias ordens de magnitude (CHANDAROY *et al.*, 2002). Na temperatura de 25°C utilizada neste estudo, é esperada uma concentração micelar crítica de aproximadamente 0,1 mmol/L ou 1,2 mg/mL, condição próxima das encontradas em S1 e S2, possivelmente não estando todas as moléculas de F127 em forma micelar nessas duas amostras e consequentemente não proporcionando espaço hidrofóbico suficiente para as moléculas de AICIFt. Já em S3 e S4, as concentrações de 50 e 150 mg/mL de F127 parecem permitir mais espaço hidrofóbico para AICIFt. Observa-se também na Fig 4b a presença de um espectro mais largo e com a presença da banda de maior absorção em 610 nm, associado ao estado de transição para a forma dimérica de AICIFt. Estas observações indicam a incorporação de AICIFt em F127 tanto na forma monomérica (maioria) quanto na forma dimérica (FARREN *et al.*, 2002; MA, CHUNYU Y *et al.*, 2007). Nos espectros de emissão (Fig 4d) das micelas de F127/AICIFt observa-se

pico de emissão em 680 nm, comparável ao presente no espectro de AICIFt em etanol (Fig 4c), e o pico se encontra somente nas concentrações de 50 e 150 mg/mL de F127.

Desta forma, foi proposto pelo observado no estudo espectrofotométrico das micelas de F127/AICIFt que nas concentrações baixas de polímero (1 e 10 mg/mL) encontradas em S1 e S2 existe predominância de monômeros em relação a forma micelares de F127, permitindo pouco espaço hidrofóbico para adsorção de AICIFt (Esquema 1a). Já nas concentrações encontradas em S3 e S4 (50 e 150 mg/mL de F127) a organização micelar de F127 permite a adsorção monomérica de AICIFt como proposto no Esquema 1b.



Esquema 1. Organização proposta de AICIFt na presença do F127 em concentração abaixo da concentração micelar crítica (A) e acima da concentração micelar crítica (B) na presença do fotossensibilizante AICIFt. Em A se observa predominância de monômeros e em B os monômeros se organizam em micelas com um núcleo hidrofóbico capaz de manter a AICIFt em ambiente hidrofóbico.

Estudos de espalhamento de neutrons em pequeno ângulo mostraram que a incorporação do fármaco hidrofóbico flurbiprofeno em micelas de Pluronic® F123 resulta na modificação do tamanho das micelas geradas devido à organização do núcleo hidrofóbico da região POP do polímero F123 e o fármaco (ALEXANDER *et al.*, 2012), portanto foi verificado o efeito da

incorporação de diferentes concentrações de AICIFt no diâmetro hidrodinâmico de F127/AICIFt na concentração de 50mg/mL de F127. As amostras S5, S6, S7, S8 e S9 da Tabela 3 foram submetidas à técnica de espalhamento dinâmico da luz e os resultados obtidos podem ser observados na Figura 5.

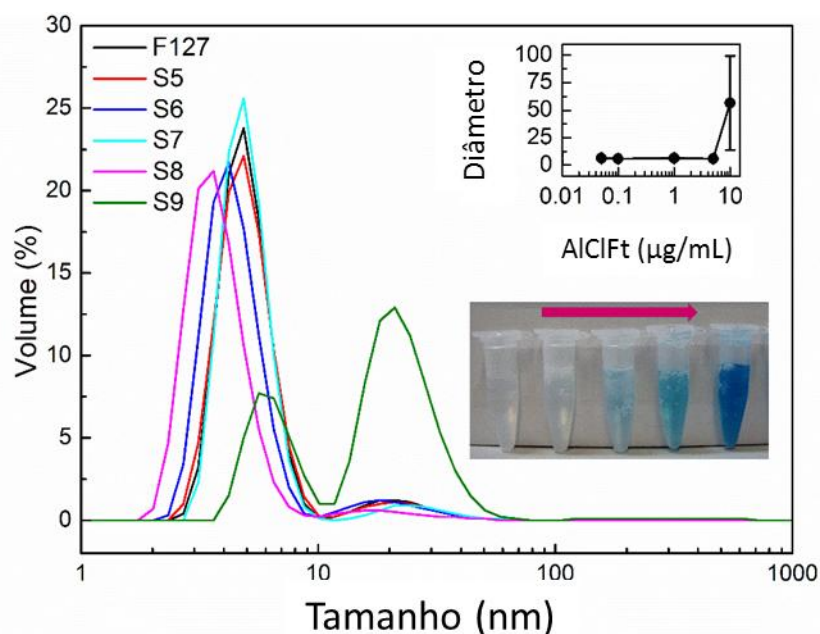


Figura 5. Espalhamento dinâmico da luz de micelas de F127 e de micelas com concentrações crescentes de AICIFt (0,05, 0,1, 1, 5 e 10 µg/mL, S5, S6, S7, S8 E S9, respectivamente).

Observa-se que o diâmetro médio das micelas de F127 tanto na ausência de AICIFt como na presença, é de aproximadamente 6 nm, exceto na concentração de AICIFt de 10 µg/mL, onde se observou uma distribuição bimodal, com o pico de maior intensidade deslocado para um valor maior, possivelmente aglomerados de AICIFt. Além disso, foi observado grande desvio padrão do tamanho entre as amostras contendo 10 µg/mL de AICIFt, indicando pouca precisão nas medidas obtidas (inset superior Fig 5). Ainda na Figura 5, uma foto das amostras formadas com o aumento da concentração de AICIFt demonstra que a intensidade do azul de AICIFt também aumenta, conforme esperado (Fig. 5 Inset inferior).

### 3.2 Produção de oxigênio singlete de F127/AICIFt

Com a disponibilidade de LEDs de alta potência, o seu uso em TFD tem sido intensamente explorado (MUEHLMANN *et al.*, 2015; RODRIGUES *et al.*, 2015) com grande efeito no custo e tempo da terapia, uma vez que são mais baratos que os lasers tradicionais e a área de abrangência é maior. O aparato de LED utilizado neste estudo foi desenvolvido pelo grupo do Prof. Dr. Paulo Narcizo de Souza, na Universidade de Brasília, com componentes de custo baixo e otimizado para uso em tratamentos biológicos. A produção de oxigênio singlete após a irradiação das micelas de F127/AICIFt (S3, S5, S6, S8 E S9) foi quantificada para confirmar se o potencial terapêutico de AICIFt estava preservado após sua incorporação nas micelas de F127. Na Figura 6 está representada a absorbância normalizada da sonda DBF após diversos ciclos de irradiação de micelas de F127 e de F127/AICIFt.

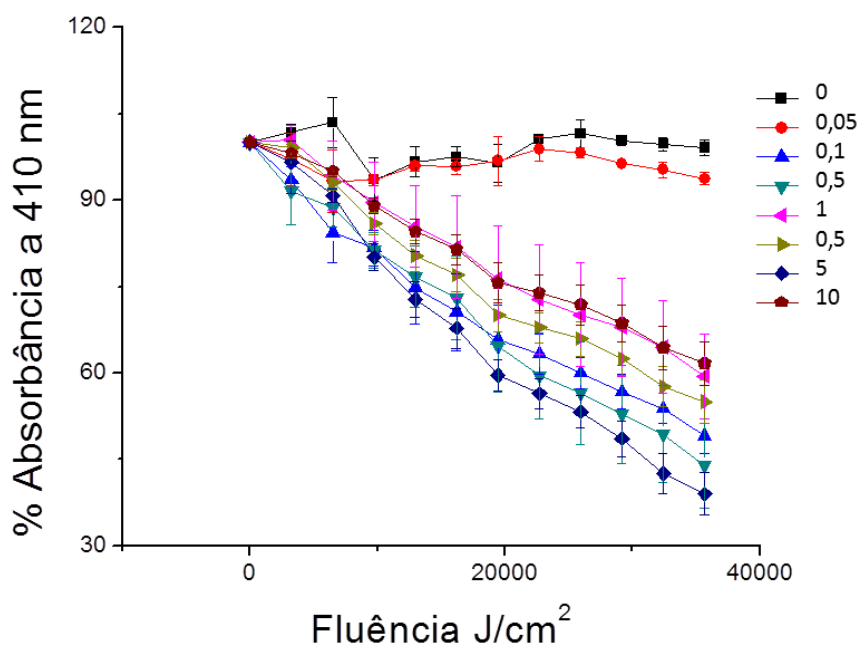


Figura 6. Absorbância normalizada da sonda de oxigênio singlete DBF exposta a micelas de F127 contendo diferentes concentrações de AICIFt após sucessivos ciclos de irradiação com LED de 660 nm.

A absorbância da sonda de DBF foi medida a 410 nm e a diminuição da sua intensidade foi observada após irradiação das micelas contendo AICIFt. A absorbância normalizada diminuiu mais

rapidamente conforme a quantidade de AICIFt contida nas micelas aumentava, sendo o decaimento mais rapidamente observado na amostra S8 apresenta 5 µg/mL de AICIFt. Uma exceção foi observada com a amostra S9 que contem 10 µg/mL de AICIFt. Nela o decaimento foi mais lento, comparável ao da amostra com a menor concentração de AICIFt testada. O observado corrobora o resultado observado pela análise do tamanho das micelas por espalhamento dinâmico da luz onde se indica agregação de AICIFt nesta concentração (S9). Não obstante, foi observado que a AICIFt incorporada em F127 ainda possui potencial terapêutico uma vez que em todas as micelas contendo AICIFt irradiadas foi gerado oxigênio singleto e degradação da sonda DBF, fato não observado na micela vazia (Figura 6).

Um estudo recente descreveu a incorporação de AICIFt em micelas de Pluronic® F127 e F123 pelos métodos de dispersão sólida e adição direta e demonstrou que nas micelas de F127, ocorre aglomeração de AICIFt, fato não observado em micelas de F123 (VILSINSKI, BRUNO HENRIQUE *et al.*, 2015). Os autores descreveram a agregação na concentração de AICIFt de 1,8 µg/mL e de 40 mg/mL de F127, condição intermediária à encontrada nas micelas aqui descritas como S7 e S8 e o mesmo não foi observado nas micelas S7 e S8. O método utilizado no presente estudo varia dos testados pelos autores citados, uma vez que a AICIFt previamente à adição na solução de F127 foi dispersa em etanol. Testes preliminares com a adição direta de AICIFt em estado sólido, formaram suspensão com grandes aglomerados independente do tempo ou potência da sonicação da mistura em sonda ou banho ultrassônico. Desta forma, foi observado que a adição de AICIFt previamente dissolvida em etanol, não ultrapassando 1% do volume final, foi importante na obtenção de micelas contendo AICIFt com as propriedades fotofísicas preservadas.

### 3.3 Eficiência de encapsulação

LE *et al.*, (2013) e KAMBOJ; VERMA, (2015) descreveram que a encapsulação de fármacos hidrofóbicos em micelas de F127 varia bastante de acordo com o método de síntese da micela e com as propriedades dos fármacos.

A adição de AICIFt dispersa em etanol a tampão fosfato resulta na observação de grandes aglomerados em todas as concentrações testadas no presente estudo. Esse aglomerados são facilmente removidos da suspensão se a amostra é submetida a filtração em poro de 0,22 µm e em seguida centrifugada (OLIVEIRA *et al.*, 2011). A separação de agregados de AICIFt não



incorporada a micelas de F127 foi utilizada para quantificar a eficiência de encapsulação de F127/AICIFt em micelas com 50 mg/mL de F127 e com AICIFt em concentrações que variaram de 0,05 a 5 µg/mL (S5, S6, S3, S7 e S8). Para todas as amostras testadas a eficiência de encapsulação observada foi de aproximadamente 90% (Tabela 4).

Tabela 4. Eficiência de encapsulação (E.E) de F127/AICIFt com diferentes concentrações de AICIFt (S5, S6, S3, S7 e S8). Experimento em triplicata.

AICIFt (µg/mL)	0,05	0,1	0,5	1	5
E.E (%)	90,04 ± 1,21	90,17 ± 13,04	93,92 ± 8,12	92,42 ± 5,93	90,96 ± 2,05

O único outro trabalho encontrado que demonstrou a eficiência de encapsulação de AICIFt em nanossistemas foi o de OLIVEIRA *et al.*, 2011, que descreveram três partículas poliméricas de ácido poli-lático e obtiveram eficiência de encapsulação que variou de 35,3 a 86,3%. No presente trabalho, o método de síntese utilizado com a dispersão prévia de AICIFt em etanol, permitiram a obtenção de micelas com grande eficiência de encapsulação.

### 3.4 Estudos *in vitro*

#### 3.4.1 Citometria de fluxo de A549 exposta a F127/AICIFt

A interiorização de AICIFt pelas células A549 após exposição a micelas de F127/AICIFt foi analisada por citometria de fluxo. Na Figura 7 pode-se observar a interiorização de F127/AICIFt por A549 normalizada pelo tempo máximo de 2 h de exposição.

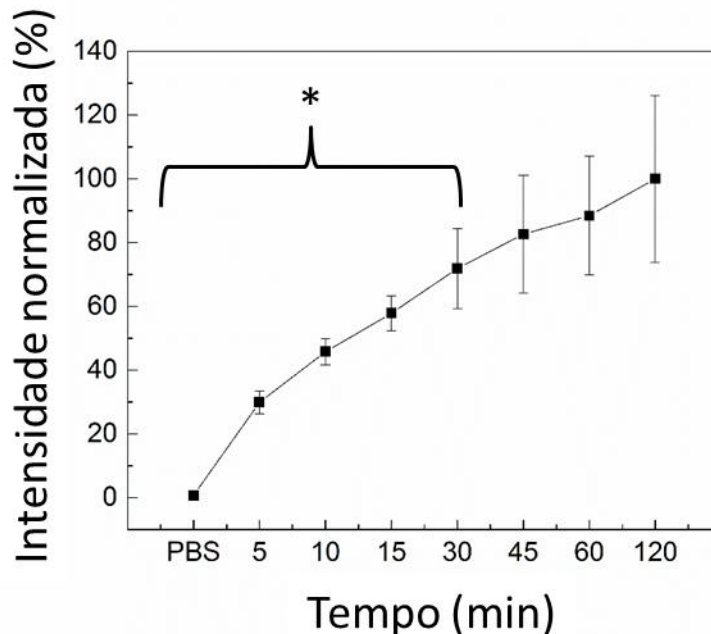


Figura 7. Análise por citometria de fluxo da interiorização de micelas F127/AICIFt (S7) pelas células A549. Intensidade observada foi normalizada pelo tempo máximo de exposição de 2 h. Número de eventos: 10000.

Pode ser observado que a fluorescência de AICIFt aumenta ao longo de todos os tempos testados indicando captação pelas células, sendo que não existe diferença estatística entre os tempos analisados a partir de 45 min.

A exposição das células a AICIFt livre na mesma concentração testada para F127/AICIFt (1 µg/mL) foi quantificada somente após 2 h resultando em 45% da intensidade do sinal em relação às células expostas a F127/AICIFt. Um aumento da captação de AICIFt na forma de micela F127/AICIFt em relação à AICIFt livre é esperada por serem moléculas hidrofóbicas (WISCHKE; SCHWENDEMAN, 2008), uma vez que essas moléculas, em soluções aquosas, tendem a aglomerar e precipitar ficando indisponíveis para as células. No caso da AICIFt, foi possível perceber também que essa molécula quando livre, nas soluções aquosas testadas, aderiu ao plástico ficando também indisponível para as células (dados não mostrados).

Os resultados encontrados indicam que não existe diminuição da captação/absorção nas células nos tempos estudados nem a obtenção de um platô, o que indicaria saturação das células pela exposição às micelas.

### 3.4.2 Microscopia confocal de A549 exposta a F127/AICIFt

Foi utilizada microscopia confocal para verificar a possível presença de AICIFt no interior das células A549 após exposição a S7 com 1 µg/mL de AICIFt (Figura 8).

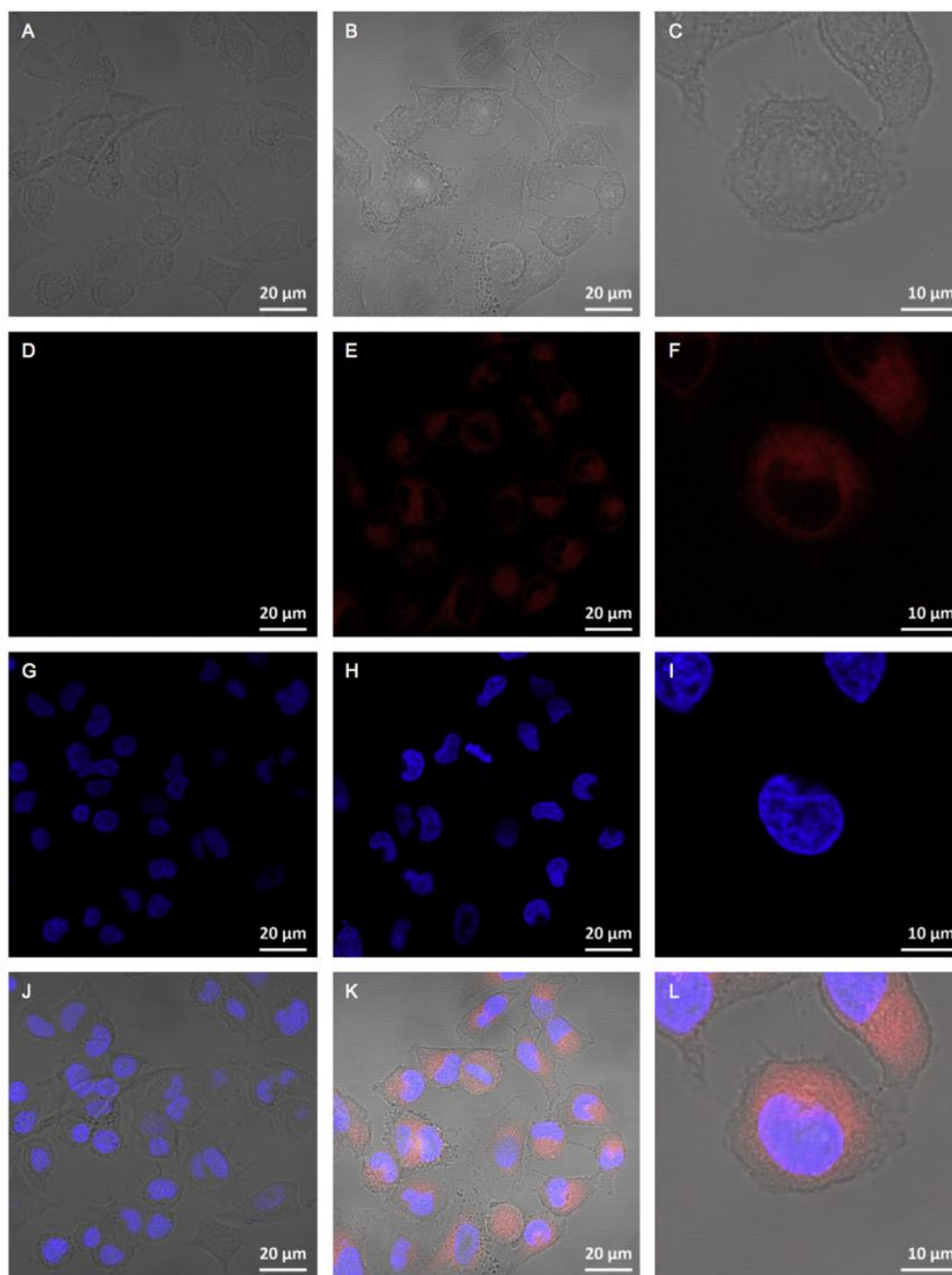


Figura 8. Fotomicrografia confocal de células A549 tratadas com PBS ou micelas F127/AICIFt S7 após 45 min de exposição. Na primeira coluna, células não tratadas. Na segunda e terceira coluna células tratadas com micelas F127/AICIFt, sendo a terceira coluna com maior aumento. A, B e C: imagens de campo claro. D, E e F: imagens da fluorescência de AICIFt. G, H e I: imagens da fluorescência de DAPI. J, K e L: sobreposição das demais imagens.

As células tratadas somente com PBS e F127 não mostraram fluorescência na faixa de emissão da AICIFt (dados não mostrados para F127). Células tratadas com AICIFt livre 5 µg/mL apresentaram fluorescência residual cujo sinal só pode ser detectado no limite máximo de sensibilidade do equipamento, com intenso ruído inviabilizando a análise do sinal (dados não mostrados). Já o tratamento de A549 com F127/AICIFt resultou em células intensamente marcadas com a fluorescência vermelha e, como pode ser observado na Figura 8, a fluorescência se encontra distribuída no citoplasma e não co-localizada à fluorescência de DAPI (corante nuclear), com maior intensidade próxima ao núcleo.

O *z-staking*, a aquisição de secções ópticas sequenciais de determinada área de interesse, foi realizado no espaço referente a células individuais de forma a constituir uma imagem 3-D que permitiu garantir que a marcação vermelha se encontrava no interior da célula e não superficial. O uso de outros nanossistemas contendo AICIFt também demonstraram fluorescência estritamente citosólica após tratamento com nanossistemas com AICIFt (MIJAN *et al.*, 2014; MUEHLMANN *et al.*, 2014) e MUEHLMANN *et al.*, (2015) também descreveram uma localização perinuclear, indicando a provável localização no retículo endoplasmático.

#### **3.4.3 Terapia fotodinâmica de A549 com F127/AICIFt**

Após a confirmação do potencial terapêutico de F127/AICIFt pela degradação da sonda DBF após irradiação com LED a 660 nm e da capacidade de internalização de AICIFt presente nas micelas, F127/AICIFt foi utilizada no tratamento de A549 com uso de TFD. Na Figura 9 é possível avaliar a viabilidade celular normalizada das células controle ou expostas a F127/AICIFt com diferentes concentrações de AICIFt (S11, S12, S13, S5, S6, S3, S7 e S8) após exposição por 15 min aos nanossistemas, tratadas com uma fluência de 25,3 J/cm<sup>2</sup> (irradiadas) ou mantidas no escuro.

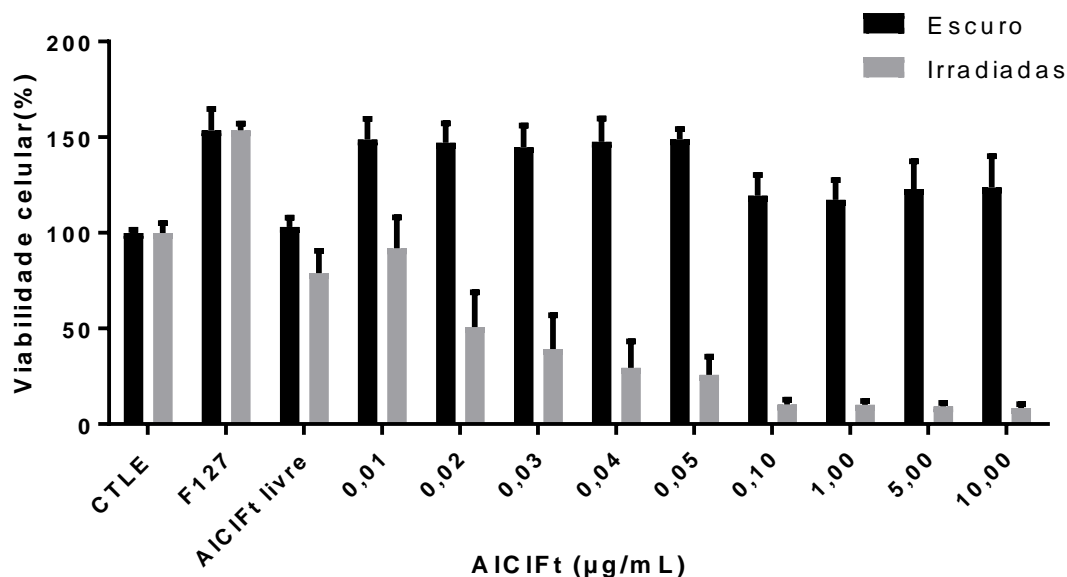


Figura 9. Viabilidade celular de A549 após exposição a micelas F127/AICIFt contendo diferentes concentrações de AICIFt irradiadas com LED de 660 nm (fluência de 25,3 J/cm<sup>2</sup>) ou mantidas no escuro.

As células mantidas no escuro não apresentaram diminuição da viabilidade conforme esperado para células expostas ao copolímeros em bloco (DINIZ *et al.*, 2015; TAŞLI *et al.*, 2013) e o aumento da absorbância encontrado indica o possível papel da micela F127 como suplemento celular.

Devido à eficiência terapêutica de F127/AICIFt, micelas contendo uma menor concentração de AICIFt foram desenvolvidas para a uso na TFD. Os parâmetros de exposição e irradiância utilizado neste estudo foram os mesmos utilizados em experimentos prévios já desenvolvidos no grupo de pesquisa em Nanobiotecnologia da Universidade de Brasília de forma a permitir comparação. Foi observado que a concentração citotóxica de AICIFt em F127/AICIFt que diminuía a viabilidade em mais de 50% (CC50) com a TFD é de 0,02 µg/mL, demonstrando alta eficiência da micela na TFD de A549 após irradiação. Para esta célula, trabalhos com ftalocianina sulfonada (NEVRELOVA *et al.*, 2007), ligada a dendrímero (NISHIYAMA *et al.*, 2009) e assim como associada a nanoemulsão já foram descritos (FRANCHI *et al.*, 2016); entretanto, como a fluência e tempo de exposição variou entre todos os trabalhos citados, pouco se pode afirmar sobre a comparação da eficiência dos nanossistemas.

PARK & NA (2013), já haviam demonstrado a eficiência de micelas de F127 com o fotossensibilizante chlorina e6 em TFD assim como haviam demonstrado ausência de toxicidade no escuro, reforçando a vantagem de uso deste nanossistema em TFD.

A efetividade das micelas de F127 aqui descritas é muito diferente do descrito por VILSINSKI *et al.* (2015) e como citado anteriormente, deduzimos que a solubilização prévia de AIClFt em etanol e a não retirada do etanol residual, evita a agregação de AIClFt e garante a sua eficiência terapêutica. Além do mais, a metodologia apresentada para o preparo das micelas é de extrema simplicidade, reforçando as vantagens de uso do F127 e indicando que a simplicidade pode ser um importante aliado na escolha de nanossistemas para a uso em TFD.

#### **4. CONCLUSÕES**

Os nanossistemas do copolímero Pluronic® F127 contendo o fotossensibilizante AICIFt (F127/AICIFt) produziram altas concentrações de espécies reativas de oxigênio e se foram eficientes na TFD de células de adenocarcinoma de pulmão humano uma vez que mesmo em concentração baixa de AICIFt (0,1 µg/mL) reduziu a viabilidade quando associada ao uso de LED de 660 nm. A caracterização das formulações de F127/AICIFt foi possível devido ao uso de espectroscopia de absorção e emissão, espalhamento dinâmico da luz e dosagem da eficiência de encapsulação. Apesar da intensa hidrofobicidade de AICIFt, a sua incorporação nas micelas de F127 por um procedimento simples, conseguiu estabilizar AICIFt em ambientes hidrofílicos e aumentar o espectro de atuação de AICIFt na TFD.

## **CAPÍTULO 2**

### **DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO BIOANALÍTICO PARA A QUANTIFICAÇÃO DE ALUMÍNIO CLORO FTALOCIANINA EM NANOPARTÍCULAS, PLASMA E TECIDOS COM CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ULTRA ALTA EFICIÊNCIA ASSOCIADA E ESPECTROMETRIA DE MASSA**



## 1. INTRODUÇÃO

Em 1906, o botânico russo Mikhael Semenovitch Tswett, eluiu extrato de folhas por uma coluna preenchida com carbonato de cálcio e conseguiu separar visualmente faixas coloridas. Este fato deu origem a uma técnica que até os dias de hoje é de extrema importância e aplicabilidade: cromatografia (chrom: cor e grafia: escrita); embora hoje dentre as diversas aplicações das técnicas, poucas se baseiam na coloração (ETTRE, 2003). Ao longo dos anos, um dos usos desta técnica é a atual cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) que é realizada em equipamentos que utilizam altas pressões e possuem alta eficiência de separação dos compostos. O desenvolvimento da CLAE, e mais recentemente a sua evolução a cromatografia líquida de ultra alta eficiência (CLUE – mais conhecida pela sigla em inglês – *Ultra high precision liquid chromatography* - UHPLC), simplificou e agilizou as análises, proporcionando maior economia e sensibilidade.

CLUE em muitos momentos já substitui a uso de CLAE por permitir melhoria na separação cromatográfica, análises mais rápidas e por proporcionar menor consumo de solventes (CIELECKA-PIONTEK *et al.*, 2013). Os princípios da química verde, sempre que possível, devem ser aplicados no desenvolvimento de métodos cromatográficos de forma a diminuir os danos causados a saúde humana ou ao meio ambiente: substituição de solventes, uso de solventes atóxicos ou menos tóxicos além da diminuição do volume de solventes utilizado (ARMENTA; GARRIGUES; DE LA GUARDIA, 2008).

A espectrometria de massa (EM) pode ser definida como sendo “o estudo da matéria por meio da formação de íons em fase gasosa e sua caracterização pela massa, carga, estrutura ou propriedades físico-químicas, empregando um espectrômetro de massa” (VESSECHI *et al.*, 2011). Os acoplamentos das técnicas de espectrometria de massa com cromatografia líquida têm recebido destaque pela alta sensibilidade e especificidade que a associação das técnicas permite. No caso da espectrometria de massa, as duas interfaces de maior uso na atualidade, ionização por eletrospray (mais conhecida pela sigla em inglês - *Eletrospray Ionization* - ESI) e ionização e dessorção a laser assistida por matriz (mais conhecida pela sigla em inglês - *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization* - MALDI); estas, juntamente com os recursos para acompanhar as fragmentações, tem tornado a técnica de CLAE/EM uma ferramenta indispensável em várias

áreas de pesquisa por possibilitar a detecção, quantificação e identificação precisa da massa de átomos e moléculas em solução (WOLFENDER, 2009).

A validação de métodos analíticos seletivos e sensíveis para a quantificação de fármacos e seus metabólitos são uma etapa crítica para o sucesso do desenvolvimento de estudos biofarmacêuticos e farmacológicos. A validação de métodos bioanalíticos incluem todos os procedimentos que demonstram que determinado método utilizado para quantificar um analito em determinada matriz biológica, tais como sangue, plasma, soro, urina, é confiável e reprodutível. Os parâmetros fundamentais de validação incluem: acurácia, precisão, seletividade, sensibilidade, reprodutibilidade e estabilidade (ICH, 2005).

Com o crescente interesse pelo uso de nanossistemas contendo alumínio cloro ftalocianina (AlClFt) para uso em TFD, um aspecto fundamental que deve ser elucidado para que seu uso seja conhecido e controlado, é o efeito destas novas formulações na farmacocinética e biodistribuição de AlClFt.

O único método cromatográfico já descrito para AlClFt apresenta pouca interação de AlClFt com a fase estacionária, resultando em tempo de retenção curto de 1,97 min (OLIVEIRA *et al.*, 2011). Devido a peculiaridades encontradas na massa molecular de AlClFt em estudos preliminares de espectrometria de massa, e o desejo de utilizar as vantagens associadas a CLUE, foi desenvolvido e validado um método cromatográfico para detecção de AlClFt em plasma, tecidos e nanossistemas utilizando CLUE com detecção tanto por fluorescência quanto por espectrometria de massa. O padrão interno zinco ftalocianina foi associado ao método, como controle de perdas durante o processo de extração, viabilizando o uso do método em estudos de biodistribuição. Além disso, foi realizado estudo espectrométrico de AlClFt em MALDI-TOF para descrever pela primeira vez a massa molecular de AlClFt.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Materiais

Cloreto de alumínio ftalocianina (chloro(29H,31H-ftalocianinato)aluminium - 85% de grau de pureza)), zinco ftalocianina (98% grau de pureza), tetrahidrofurano (grau HPLC), dimetil sulfóxido (grau HPLC), formiato de amônio, ácido alfa-cyano-4-hidroxicinâmico, óleo de rícino, cremophor ELP (Kolliphor® ELP) e ácido acético glacial foram comprados da Sigma (Sigma Aldrich Co, EUA). Metanol (Grau Optima LC/MS) foi comprado da Fisher Scientific Co, EUA; etanol (grau de síntese) foi comprado da Scharlau Chemicals, Espanha.

### 2.2 Instrumentação

A análise por CLUE/EM foi realizada em equipamento Acquity UHPLC equipado com módulo detector de fluorescência e acoplado ao espectrometro de massa LCT Premier XE equipado com a fonte de ionização por eletrospray e análise por tempo de voo (ESI/TOF) (Waters, Milford, MA, EUA) no CIC biomaGUNE, em San Sebastian, Espanha. As análises foram realizadas em modo W-positivo na faixa de m/z de 100-1000. As voltagens capilar e do cone da amostra foram de 1500 e 100 V, respectivamente. A dessolvatação e cone de gas foram de 600 e 50 L/h, com temperatura de 350°C na dessolvatação e de 120°C da fonte de íon.

Outra técnica de espectrometria de massa, MALDI-TOF, foi realizada em espectrômetro Bruker Ultraflex extreme III equipado com um laser pulsado de Nd:YAG ( $\lambda = 355$  nm) e controlado pelo software FlexControl 3.3 (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha). Os espectros obtidos foram processados com o software FlexAnalysis 3.3. no CIC biomaGUNE, em San Sebastian, Espanha.

As análises em MALDI-TOF foram realizadas em modo refletor com um número acumulado de disparos entre 2500 e 3000 (500 disparos por aquisição a 1 kHz de frequência do laser).

### 2.3 Condição cromatográfica

A cromatografia líquida foi realizada em coluna C18 de fase reversa Acquity BEH (100x2,1 mm, tamanho de partícula 1,7  $\mu$ m), (Waters, Milford, MA, EUA). A fase móvel utilizada foi um gradiente de formiato de amônio 100 mM, pH 3,2 (A) e metanol (B), como descrito na Tabela 5. A detecção fluorimétrica foi realizada com excitação a 610 nm e emissão a 675 nm. O volume de

injeção foi de 5 µL, a vazão utilizada foi de 0,3 mL/minuto, a temperatura da coluna foi de 30°C, a pressão variou durante o gradiente de 6000 a 13000 psi e o tempo de análise foi de 20 min.

Tabela 5. Composição da fase móvel pelo tempo em método cromatográfico de AIClFt e ZnFt. A: solução aquosa de formiato de amônio 100 mM; B: metanol.

Tempo (min)	A (%)	B (%)
0,00	75	25
0,50	75	25
10,00	1	99
17,00	1	99
18,20	75	25
20,00	75	25

#### 2.4 Extração e quantificação de AIClFt em nanoemulsão

Nanoemulsões de óleo de rícino e Cremofor ELP contendo AIClFt foram preparadas como descrito em (MUEHLMANN *et al.*, 2015). A quantificação de AIClFt foi realizada pela diluição de 20x o volume da nanoemulsão em etanol 70%, seguida por 3 min de agitação em vortex. Em seguida, o homogenizado foi transferido para unidade filtrante Amicon Ultra 0,5 10K (EMD Millipore - Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha) e centrifugado por 15 min a 17000 g. O eluído e o retido no filtro foram em seguida diluídos em etanol e filtrados em poro de 0,22 µm e injetados em cromatógrafo. Também foi realizada a centrifugação direta da nanoemulsão (15 min, 17000 g) para verificar se grandes agregados de AIClFt estavam presentes na amostra recém-sintetizada, porém menos de 1% de AIClFt livre foi removida da solução após esta etapa.

#### 2.5 Órgãos de camundongos para validação de método

Plasma, fígado, baço, pulmão e rins de camundongos saudáveis sem tratamentos prévios BALB/cJ machos utilizados no presente estudo foram obtidos do Biotério do Centro de Investigación Cooperativa en Biomateriales (CICbiomaGUNE, San Sebastian, Espanha) de animais que seriam submetidos à eutanásia independente do presente estudo. Não obstante, os animais aqui descritos estão abrangidos no projeto apresentado e aprovado pelo comitê de ética da Universidade de Brasília de número (UnBDoC nº 144446/2014 Anexo 1).

## 2.6 Preparação das amostras biológicas

O sangue dos animais foi coletado em tubos contendo EDTA 20% e após 30 min à temperatura ambiente, os tubos foram centrifugados por 5 min a 5000 *g*, o plasma removido, aliquotado e congelado a -80°C. No momento do ensaio, após descongelamento, 80 µL de plasma foram transferidos para tubo de microcentrífuga de 2 mL e 15 µL de soluções estoque de AIClFt e ZnFt (200, 150, 100, 50, 20 ou 5 µg/mL de AIClFt e 20 µg/mL de ZnFt) foram adicionados à amostra e agitados em vortex por 1 minuto. Em seguida, duas etapas de extração com 705 µL de solução extratora (89% etanol, 10% dimetilsulfóxido e 1% ácido acético) foram adicionada a fim de solubilizar AIClFt e ZnFt contidos na solução. Uma etapa de centrifugação foi realizada entre cada leva de extração por 10 min a 17000 *g* e a solução final foi transferida para microtubos e filtrada em unidade com poros de 0,22 µm. As concentrações finais teóricas nas soluções obtidas foram de 2, 1,5, 1, 0,5, 0,2 e 0,05 µg/mL (pontos das curvas padrão dos órgãos). Tubos com a adição de 80 µL de tampão fosfato no lugar de plasma e 15 µL de soluções estoque de AIClPc ou ZnPc foram processados da mesma forma para averiguar as possíveis perdas de AIClFt e ZnFt durante o processamento mesmo na ausência da matriz biológica.

Para quantificação nos tecidos, os órgãos foram removidos, lavados com tampão fosfato, o excesso de líquido foi removido com papel de filtro e os órgãos foram pesados e armazenados a -80°C. Na hora do ensaio, utilizou-se protocolo descrito por OLIVEIRA *et al.*, (2011) para homogeneizar os órgãos: os órgãos foram descongelados e sonificados com 1 mL de tampão fosfato até completa homogeneização utilizando o processador ultrassônico Vibra Cell VCX750 (Sonics, CT, EUA) com sonda de titânio e potência de 40%. Uma vez completamente homogeneizado, 80 µL da suspensão de tecidos foi tratada identicamente ao descrito para o plasma gerando os pontos da curva de calibração dos órgãos.

As curvas de calibração nas matrizes biológicas foram obtidas e as razões das áreas de AIClFt e ZnFt foram utilizadas para determinar a precisão e recuperação quando comparadas com as curvas preparadas na ausência de matriz biológica.

## 2.7 Desenvolvimento do método

O método foi desenvolvido testando diferentes gradientes de metanol e formiato de amônio 100 mM, pH 3,2, de forma a obter tempos de retenção de AIClFt e ZnFt de pelo menos

seis min. Tempos de retenção menores que isso são mais propícios de sofrer interferência de componentes presentes nas matrizes biológicas. A validação do método foi realizada pelo sinal fluorimétrico de AlClFt e ZnFt e baseou-se nas diretrizes da FDA e da ICQ para estabelecimento dos parâmetros de validação.

#### **2.7.1 Seletividade**

A seletividade do método foi aferida pelo processamento do plasma e tecidos na ausência de AlClFt e ZnFt. A seletividade foi estabelecida pela ausência de picos nos extratos dos órgãos no mesmo tempo de retenção de AlClFt e de ZnFt.

#### **2.7.2 Linearidade**

A relação das concentrações e da razão da área dos picos de AlClFt e ZnFt, foi utilizada para determinar equação linear ( $y = ax + b$ ) que melhor representava os dados e os parâmetros de regressão e o coeficiente de determinação ( $r^2$ ) foram calculados e utilizados para estimar a linearidade do método.

#### **2.7.3 Limites de detecção e quantificação**

O limite de detecção (LD) de cada curva foi considerado como sendo  $LD = 3,3 * (\text{desvio padrão do ponto de menor concentração curva}) / \text{inclinação da reta}$ . O limite de quantificação (LQ) de cada curva foi considerado como sendo  $LQ = 10 * (\text{desvio padrão do ponto de menor concentração da curva}) / \text{inclinação da reta}$ .

#### **2.7.4 Recuperação**

A recuperação do método foi estabelecida pela comparação dos valores da razão de AlClFt/ZnFt nas soluções de matrizes processadas com soluções padrões nas mesmas concentrações (2, 1,5, 1, 0,5, 0,2 e 0,05 µg/mL). A recuperação foi determinada pela comparação com os dados de três repetições de cada concentração recuperada de AlClFt/ZnFt no plasma e tecidos analisados.

#### **2.7.5 Precisão**

A precisão do método foi determinada pela análise do desvio padrão relativo (DPR) de três repetições de curvas de calibração das áreas de AlClFt/ZnFt recuperadas das matrizes biológicas processadas nas concentrações já citadas.

### 2.7.6 Estabilidade

A estabilidade foi aferida pela adição de 15 µL de soluções estoques contendo AIClFt e ZnFt da mesma forma descritas no tópico “preparação das amostras biológicas” e a quantificação de AIClFt e ZnFt nas amostras foi realizada após 28 dias a -20°C.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 Estudo de espectrometria de massa de AIClFt e ZnFt

As diferentes condições utilizadas para a identificação da composição ideal da fase móvel foram avaliadas quanto ao formato e tempo de retenção dos picos de AIClFt e de ZnFt em gradientes de formiato de amônio/metanol em uma coluna C-18. Utilizando componentes simples e de amplo acesso em diversos laboratórios cromatográficos, foi possível estabelecer condição cromatográfica adequada para a análise de AIClFt e ZnFt (Tabela 5), descrito na seção “condição cromatográfica”. O uso de uma fase móvel em condição de gradiente no lugar de uma condição isocrática (ou seja, a fase móvel permanece em proporção constante durante toda a análise, dispensando tempo de estabilização entre corridas) é mais adequado para resolver problemas analíticos, especialmente para trabalhos com amostras complexas (KALISZAN; WICZLING, 2011). SUBIRATS; ROSÉS; BOSCH (2007) descreveram que ocorre uma redução da capacidade tamponante de sais como o formiato de amônio, usado no presente trabalho, após a adição de solventes em fases móveis (devido principalmente à diluição da concentração do sal em contato com as moléculas de interesse). Entretanto, a adição do solvente polar metanol à fase móvel se mostrou necessária para que ocorresse a observação do pico do padrão interno ZnFt, conhecidamente mais hidrofóbica do que AIClFt (GHANI; KRISTEN; RIEGLER, 2012).

OLIVEIRA *et al.*, (2011), publicaram o único outro método cromatográfico disponível para análise de AIClFt e descreveram um método cromatográfico de fase reversa para CLAE com grande uso de volume de solventes (fluxo de 1 ml/min) e mistura de solventes: metanol/acetona/dimetilformamida (90:5:15, v/v/v). O presente estudo apresenta um método com a vantagem de estar adaptado para um equipamento de CLUE: melhor resolução e sensibilidade, economia em fase móvel, necessidade de pequeno volume de amostra, consequentemente gerando menos resíduos, seguindo o proposto pelos princípios de química verde (ANASTAS; EGHBALI, 2010; VERMA; KUMAR; BHASKAR KURBA, 2014).

A condição cromatográfica inicialmente estabelecida possui detecção por emissão de fluorescência de AlClFt e ZnFt. Na Figura 10 pode-se observar um cromatograma típico de ambas as ftalocianinas em solução etanólica em que pode-se observar os tempos de retenção de 8,03 min para AlClFt e 13,02 min para ZnFt.

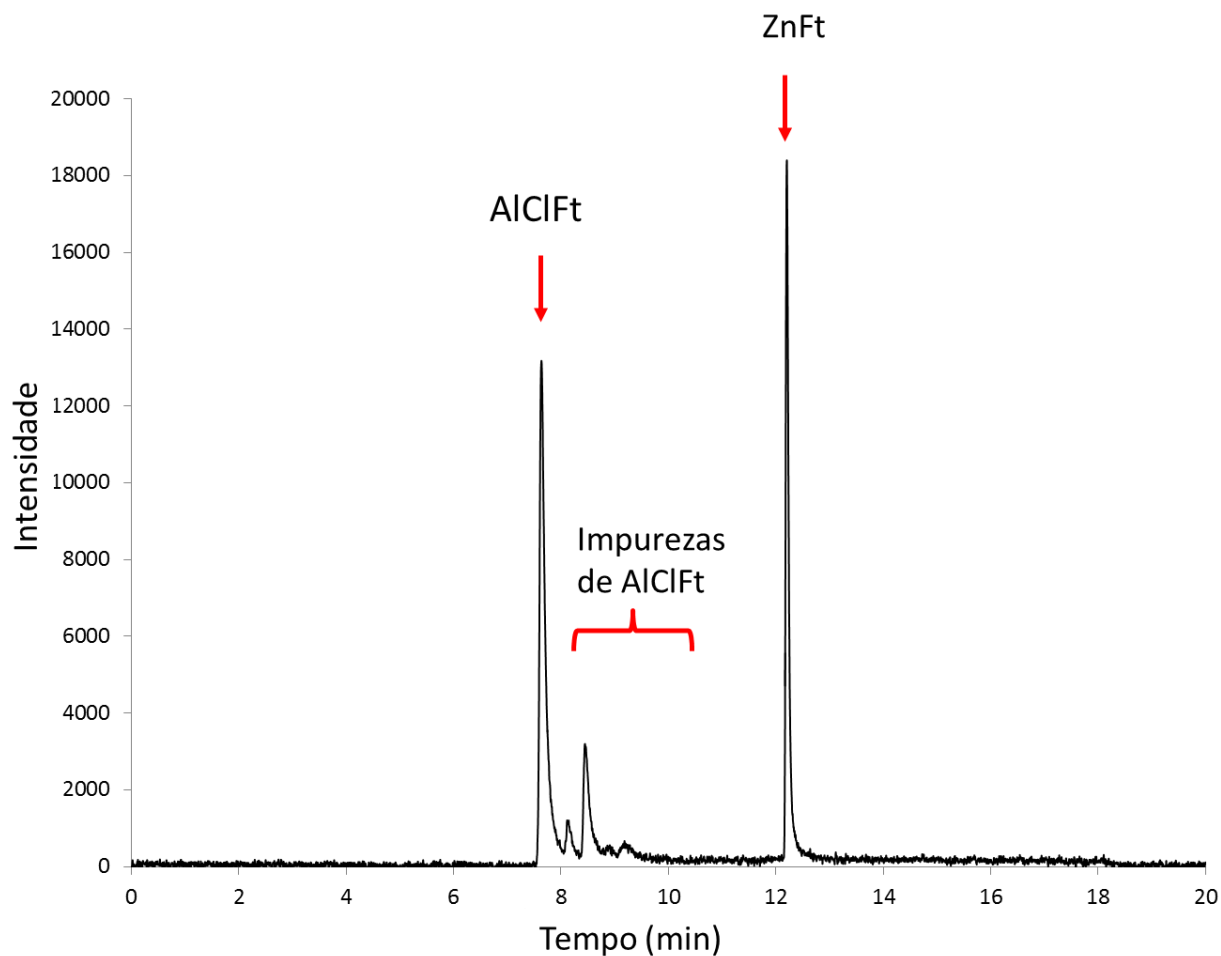


Figura 10. Cromatograma de AlClFt (0,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e seus prováveis contaminantes (tempo de retenção 8,03 – 9,58) e ZnFt (0,2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) (tempo de retenção 13,02) com detecção por emissão de fluorescência (Excitação:610nm, Emissão: 675nm).

Como descrito por GHANI; KRISTEN; RIEGLER (2012), a solubilidade de diferentes ftalocianinas sofre grande influência do átomo metálico presente no centro do anel macrocíclico, e como a ZnFt é mais hidrofóbica que AlClFt, um tempo de retenção maior para a ZnFt era



esperado. Isso foi confirmado pela necessidade de uma fase móvel contendo uma menor concentração de água (99% metanol) para que fosse eluída a fração contendo ZnFt.

Todas as condições cromatográficas testadas que demonstraram interação de AIClFt com a fase estacionária, permitiram a visualização de cinco frações em menor abundância associadas a AIClFt com um tempo de retenção ligeiramente maior (8,56 – 10 min). Estes contaminantes não haviam sido demonstrados anteriormente, mas como o grau de pureza da única AIClFt comercializada pela Sigma é de apenas 85%, esta sequência de picos atribuídos a AIClFt são provavelmente co-produtos gerados durante a síntese.

Associada à detecção por fluorescência, espectrometria de massa acoplada a cromatografia líquida foi utilizada para confirmar as massas moleculares das frações. As massas preditas de AIClFt e ZnFt são respectivamente 574,1080 e 577,0846, porém a massa molecular de AIClFt identificada experimentalmente foi de 571,1586, enquanto a massa identificada para ZnFt, estava de acordo com a esperada, 577,0868 (Figura 11).

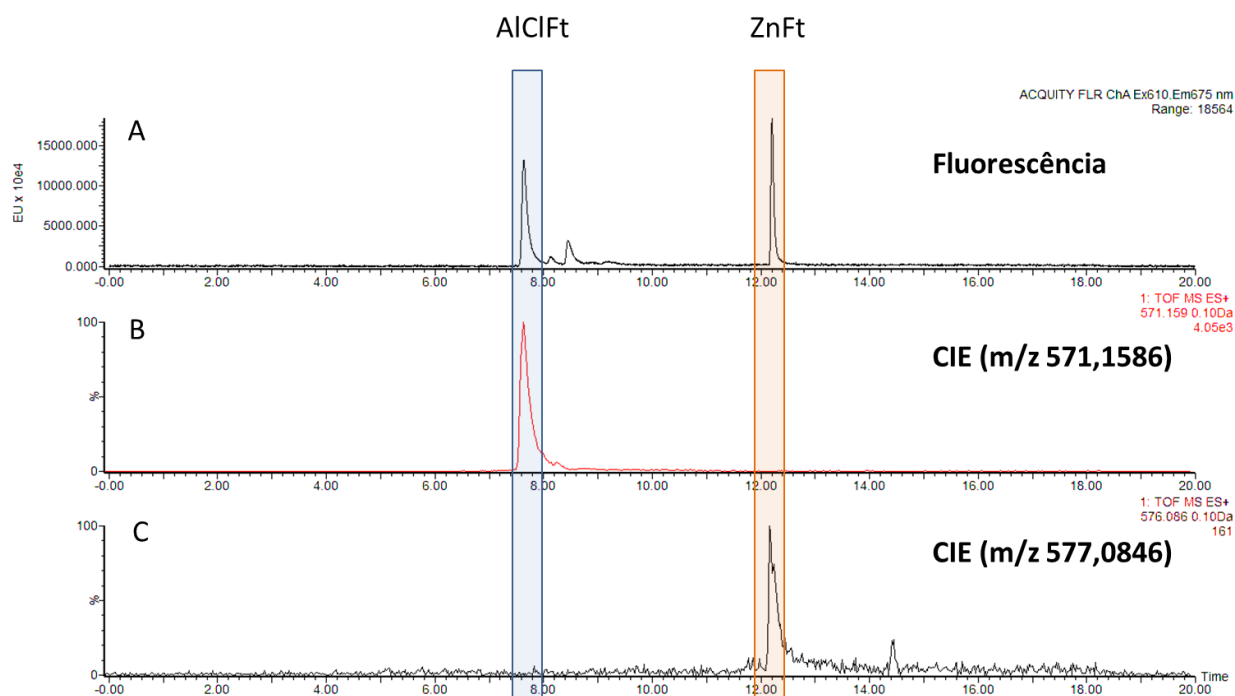


Figura 11. Cromatograma de fluorescência de AIClFt e ZnFt (A) e sua relação com os cromatogramas de íon extraído (CIE) de AIClFt (B) e ZnFt (C), demonstrando a massa detectada para ambas, 571,1586 e 577,0846, respectivamente.

A massa observada para AlClFt pode ser explicada pela desassociação do átomo de cloro do centro da ftalocianina e pela formação de aduto entre a ftalocianina e o metanol presente na fase móvel. A massa de AlFt, 539,1313 (massa molecular nominal predita de AlClFt, 574,1001, menos a massa molecular de cloro, 34,9688) somada à massa molecular do aduto de metanol (32,0262) resulta na massa molecular final teórica de 571,1575, de acordo com a de 571,1586 encontrada.

A ionização por eletrospray ou por pressão química atmosférica via de regra gera moléculas protonadas no modo de íons positivo  $[M + H]^+$  ou moléculas desprotonadas no modo ion negativo  $[M - H]^-$ ; entretanto, já é conhecida a possibilidade da formação de adutos nas moléculas sendo analisadas, levando à observação de uma massa diferente da forma protonada ou desprotonada. A formação de adutos em espectroscopia de massa é uma dificuldade encontrada por diversos pesquisadores e o motivo porque ocorrem ainda é pouco conhecido (BANERJEE; MAZUMDAR, 2012; MORTIER *et al.*, 2004).

A massa média atômica de um elemento é a média ponderada das massas de isótopos estáveis que existem para determinado elemento e por espectrometria de massa é possível utilizar o perfil isotópico (proporção de cada isótopo) de determinada molécula para confirmar a sua composição elemental (WATSON; SPARKMAN, 2007). No presente estudo, o perfil isotópico foi utilizado para corroborar a hipótese de que o aduto de metanol se associa à ftalocianina uma vez que o perfil isotópico teórico da associação com o aduto (B) é igual ao encontrado experimentalmente (C) (Figura 12).

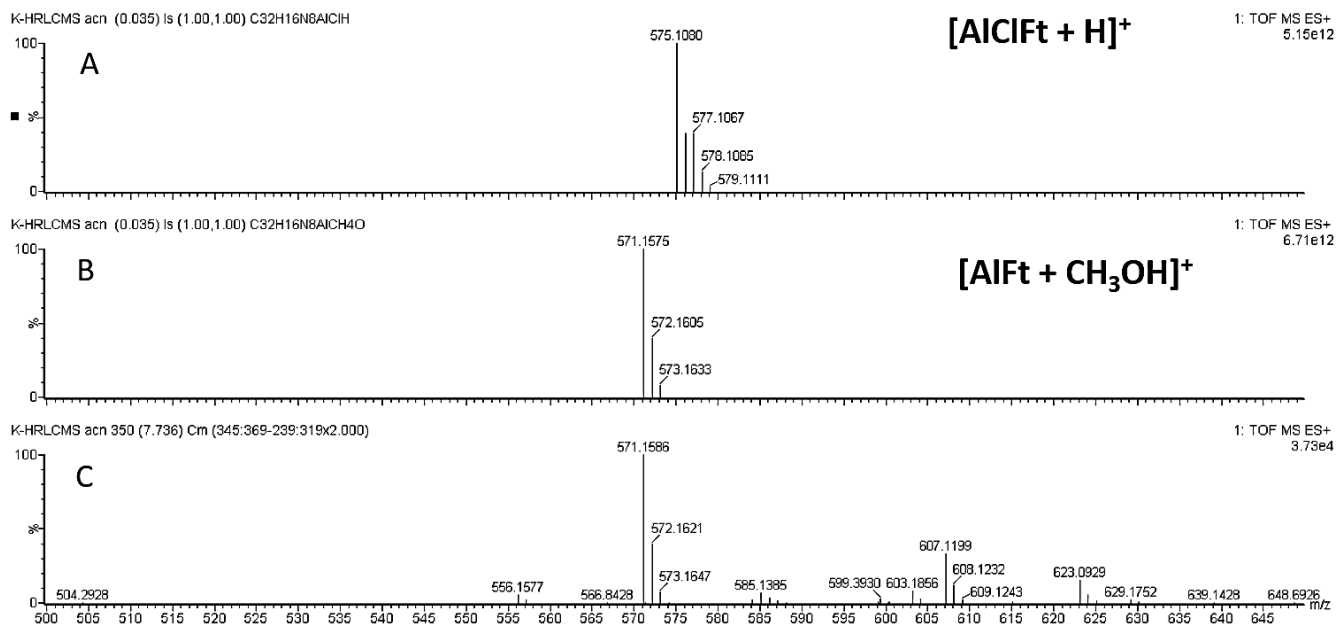


Figura 12. Distribuição isotópica teórica tanto de  $[AlClFt + H]^+$  (A) quanto de  $[AlFt + CH_3OH]^+$  (B) e a distribuição encontrada experimentalmente após injetar amostras de AlClFt em CL/MS (C).

Para cálculo da massa molecular com precisão foi utilizado o íon de referência reserpina ( $[M+H]^+$  m/z 609,2818) e a acurácia para  $C_{32}H_{16}AlClN_8$  ( $[M-Cl+MeOH]^+$ ) foi de 1,926 ppm e de  $C_{32}H_{16}N_8Zn$  ( $[M+H]^+$ ) 2,773 ppm.

Para verificar a massa molecular de AlClFt na ausência de metanol, foi utilizada espectrometria de massa MALDI/TOF uma vez que esta técnica permite que a massa molecular seja analisada seca, com o uso de uma matriz que permite o deslocamento de AlClFt no vácuo.

AlClFt solubilizada em tetrahidrofurano foi misturada com a matriz alfa-ciano-4-ácido hidroxicinâmico e se observou uma ionização eficiente da molécula (Figura 13). A massa predita para AlFt é de 539,1308 e a observada experimentalmente foi de 539,1325 com um valor de acurácia de 3,15 ppm, corroborando o proposto de desassociação do cloro. Para ZnFt, a massa predita é 576,0784 e a observada experimentalmente foi de 576,0754, rendendo uma acurácia de 5,21 ppm, corroborando o observado por cromatografia líquida associada a espectrômetro de massa de que ZnFt não apresenta variação da massa predita em relação ao observado experimentalmente.

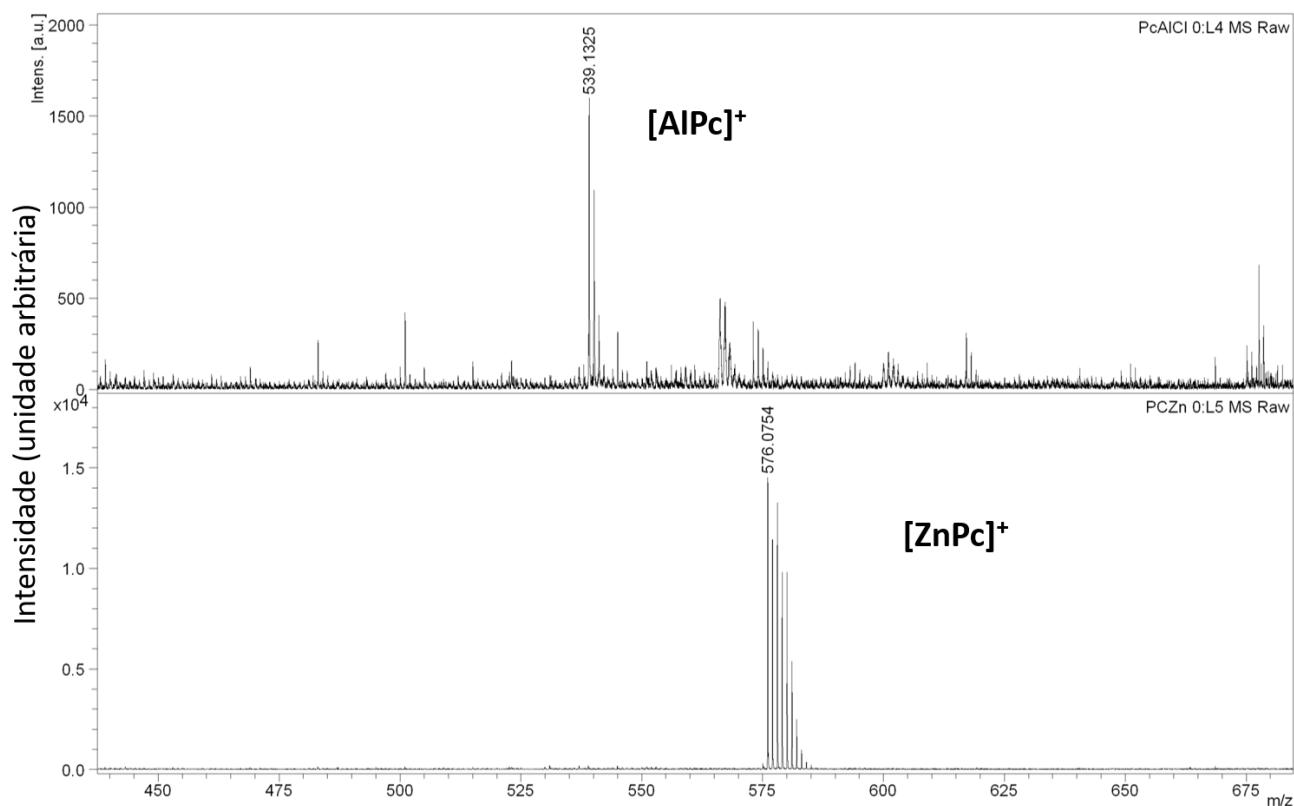


Figura 13. Espectro de massa de AlClFt e de ZnFt obtida por espectrometria de massa MALDI/TOF.

Com as duas abordagens não foi observada a massa molecular predita de AlClFt e propomos que estudos de espectrometria de massa de AlClFt considerem a provável dissociação do cloro, não relatada previamente na literatura. Além disso, uma vez desassociado o cloro, em solução, AlClFt fica disponível para formar adutos com os solventes circundantes, podendo a massa portanto variar de acordo com os solventes utilizados.

### 3.2 Estudo por CLUE/EM da exposição de AlClFt a matrizes biológicas

Após exposição de AlClFt e ZnFt às matrizes biológicas já citadas, as massas dos picos de interesse foram analisadas para verificar se componentes da matriz modificam as massas observadas experimentalmente na ausência das matrizes. Não foi observada variação da massa de AlClFt e de ZnFt após sua exposição a biomoléculas das matrizes estudadas. A formação de aduto com metanol também foi observada na molécula de AlClFt na presença de componentes

biológicos. Vale ressaltar que não foi encontrado na literatura relatos da massa de AICIFt em solventes ou matrizes biológicas, ressaltando a relevância do presente estudo.

### **3.2.1 Metodo bioanalítico para detecção de AICIFt em nanoemulsões, plasma e tecidos**

#### **3.2.1.1 Quantificação de AICIFt em nanoemulsão**

O método desenvolvido foi utilizado para quantificar AICIFt incorporada em nanoemulsões de óleo de rícino/cremophor. As unidades filtrantes, com retenção de elementos maiores que 10 kDa utilizadas no presente estudo, são utilizados rotineiramente na quantificação de fármaco livre ou associado a nanossistemas, mas apesar do uso comum, resultados errôneos podem ser observados para moléculas pouco solúveis na solução testada. Aglomerados de fármacos hidrofóbicos, ficam retidos no filtro por serem maiores que tamanho do poro. Desta forma, ressalta-se a importância da verificação da solubilidade do fármaco livre antes de utilizar técnicas de exclusão por tamanho para quantificar eficiência de encapsulação, por exemplo.

O descrito acima é observado para soluções de AICIFt com quantidade etanol compoendo a solução em proporções inferiores a 70%, condição mais comum em que nanossistemas se encontram após sua síntese (MUEHLMANN *et al.*, 2015; PY-DANIEL *et al.*, 2016; ROCHA *et al.*, 2012). Por esse motivo, a unidade filtrante descrita não pode ser a abordagem de escolha para quantificação de AICIFt não incorporada, mesmo que o tamanho do poro escolhido seja em princípio capaz de deixar passar a molécula livre.

No presente estudo, a remoção de grandes aglomerados pôde ser realizada pela centrifugação uma vez que este sistema é extremamente estável e resiste a este processo. Nas nanoemulsão contendo AICIFt, aglomerados foram removidos por centrifugação e representaram menos de 0,1% da AICIFt utilizada no preparo da nanoemulsão.

Após a centrifugação, a unidade filtrante foi utilizada para confirmar que a condição extratora de etanol 70% (condição não agressiva aos componentes do filtro) poderia ser utilizada para solubilizar a AICIFt previamente incorporada à nanoemulsão. Desta forma, previamente à solubilização com etanol 70% toda a AICIFt se mantinha no retido, e após, consegue atravessar o filtro e ser encontrada no filtrado, rendendo a quantificação da eficiência de encapsulação em 99,9% de AICIFt em nanoemulsões.

### 3.3 Validação do método

#### 3.3.1 Seletividade

A seletividade do método foi confirmada pela análise de extratos de nanoemulsões (brancas, sem AIClFt), plasma, pulmão, baço, rins e fígado e a observação da ausência de picos interferentes nos tempos de retenção de AIClFt e ZnFt estabelecidos para o método desenvolvido.

#### 3.3.2 Linearidade, limite de detecção e de detecção de curvas padrão em matriz biológica

As matrizes biológicas dopadas com AIClFt foram extraídas com a condição otimizada de extração de AIClFt, etanol/dimetilsulfóxido/ácido acético (89:10:1, v:v:v) em tecidos. As curvas de calibração foram plotadas como razão das áreas de AIClFt/ZnFt para verificar a linearidade das curvas uma vez que curvas da razão do fármaco de interesse pelo sinal de um padrão interno tem a vantagem de normalizar as perdas ocorridas durante o processo de extração. Por esse motivo a integração das áreas das curvas de AIClFt/ZnFt foram utilizadas para determinar os parâmetros de inclinação, interceptação,  $r^2$  e limites de detecção e de quantificação (Tabela 6).

Tabela 6. Parâmetros das curvas de calibração preparadas em solventes ou em matrizes biológicas.

	Inclinação	Interceptação	$r^2$	LD	LQ
Solvente	31,749	0,6007	0,9965	0,030	0,091
Fígado	33,34	0,7705	0,9919	0,012	0,037
Pulmão	25,908	1,1038	0,9965	0,019	0,046
Plasma	33,499	0,5152	0,9985	0,012	0,029
Rins	32,217	2,3068	0,9965	0,009	0,028
Baço	32,668	1,4706	0,9939	0,035	0,108

$r^2$ : coeficiente de determinação; LD: limite de detecção ( $\mu\text{g/mL}$ ); LQ: limite de quantificação ( $\mu\text{g/mL}$ ).

OLIVEIRA *et al.*, (2011) obtiveram parâmetros de validação excelentes para as matrizes biológicas testadas (plasma e fígado) com limites de detecção e quantificação melhores do que os obtidos no presente trabalho. Uma possível justificativa para os valores obtidos no presente trabalho estarem aquém de método de CLAE descrito por OLIVEIRA *et al.*, (2011) foi a restrição

de acesso a matrizes biológicas, o que levou o trabalho a ser otimizado para pequenos volumes, condição já reconhecida por aumentar erro associado a metodologia analítica (GUSTAVO GONZÁLEZ; ÁNGELES HERRADOR, 2007).

### 3.3.3 Precisão e recuperação

A precisão e recuperação da razão da área de AlClFt/ZnFt em matrizes biológicas estão listadas na Tabela 7. A precisão encontrada nas concentrações testadas foi concisa, precisa e reprodutível, descrita como ideal para a diretriz *ICH - Validation of Analytical Procedures* (ICH, 2005). O desvio padrão relativo encontrado não excedeu o valor de 15% mesmo na menor concentração testada, também de acordo com as diretrizes de ICH.

A recuperação do método também está de acordo com o predito pela ICH ao expressar concordância entre o valor aceito como real ou de referência e os valores obtidos experimentalmente.

Tabela 7. Precisão e recuperação das curvas de matriz biológica (razão áreas ALCIFt/ZnFt).

<b>Amostra</b>	<b>Concentração (µg/mL)</b>	<b>Precisão (DPR%*)</b>	<b>Recuperação (%)</b>
<b>Fígado</b>	2	0,78	106,5
	1,5	1,46	102,5
	1	1,35	104,3
	0,5	8,36	114,4
	0,2	3,16	100,5
	0,05	5,10	101,6
	<b>Pulmão</b>	2	8,06
1,5		1,10	117,7
1		1,98	120,7
0,5		1,57	102,1
0,2		8,53	88,9
0,05		8,41	68,7
<b>Plasma</b>		2	2,79
	1,5	4,29	101,5
	1	6,83	110,5
	0,5	5,38	90,9
	0,2	8,02	80,6
	0,05	2,51	81,1
	<b>Rins</b>	2	3,45
1,5		5,76	105,1
1		7,43	107,0
0,5		4,07	108,6
0,2		5,49	114,8
0,05		12,59	95,6
<b>Baço</b>		2	0,79
	1,5	7,98	104,2
	1	3,45	103,6
	0,5	3,50	100,0
	0,2	5,22	114,2
	0,05	9,04	107,9

\*DPR= desvio padrão relativo

### 3.3.4 Estabilidade

Matrizes biológicas contendo ALCIFt e ZnFt foram mantidas a -20°C por 28 dias, porém a estabilidade nessa condição não pode ser adequadamente estabelecida uma vez que houve a formação de aglomerados de ftalocianinas que foram removidos da suspensão quando



centrifugados. Estima-se que uma etapa de ultrassonicação das amostras biológicas após período congeladas evite a precipitação observada no presente estudo. OLIVEIRA *et al.*, (2011) demonstram estabilidade de AICIFt em contato com plasma e fígado, mas estudo prévio já demonstrou que o tempo de contato com o solvente afeta o resposta fluorimétrica de AICIFt (LILGE; O'CARROLL; WILSON, 1997).

#### **4. CONCLUSÕES**

O método descrito foi desenvolvido para a detecção e quantificação de AlClFt e ZnFt em matrizes biológicas e validado quanto à seletividade, linearidade, limite de detecção e quantificação, precisão e recuperação.

O presente estudo foi o primeiro a descrever o comportamento de AlClFt após exposição a matrizes biológicas pela técnica de espectrometria de massa e o primeiro a demonstrar contaminantes presentes no padrão de AlClFt observados por detecção fluorimétrica. Os parâmetros de validação obtidos indicam que o método possui aplicabilidade para uso em estudos de biodistribuição.

### **CAPÍTULO 3**

## **SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO, CITOLocalIZAÇÃO E BIODISTRIBUIÇÃO EM CAMUNDONGOS C57BL/6 DE NANOEMULSÃO MAGNÉTICA CARREANDO FOTOSSENSIBILIZANTE CLORETO DE ALUMÍNIO FTALOCIANINA.**

## 1. INTRODUÇÃO

A teranóstica é uma abordagem que visa desenvolver tratamentos contra diversas doenças, utilizando a associação da terapia ao diagnóstico em um mesmo agente (SWIERCZEWSKA *et al.*, 2016). Concebida inicialmente em 1940 pelo uso de iodo radioativo tanto para tratar como para se obter imagens do câncer de tireoide, a teranóstica já é utilizada na realização de terapias direcionadas e paciente-específicas e tende a evoluir com o crescente conhecimento molecular e genético de patologias e com os avanços técnicos da imageologia (AOUN *et al.*, 2015).

Mas apesar de ser utilizada há décadas, o termo teranóstico só foi utilizado para descrever esta associação de áreas em 1998 pelo consultor da companhia *Cardiovascular Diagnostics*, John Funkhouser (KELKAR; REINEKE, 2011). Com os recentes avanços tecnológicos e o novo nome para enfatizar a junção das áreas, existe grande expectativa de que a teranóstica associe tecnologia de ponta para aumentar de forma efetiva a qualidade do tratamento, realizando a liberação da quantidade certa da dose, para o paciente certo, no momento certo (AOUN *et al.*, 2015).

As nanopartículas de óxido de ferro (NP - mais conhecidas pelo termo em inglês, *iron oxide nanoparticles - IONPs*) já são estabelecidas como um agente de contraste na técnica de ressonância magnética por imagens e têm tido um importante destaque como agente teranóstico. NPs são cristais compostos por magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), maghemita ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) e/ou hematita ( $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) e quando são cristais bem formados, apresentam saturação magnética elevada (HASANY *et al.*, 2013).

Diferente dos componentes originários, NPs possuem diâmetro de menos de 20 nm e são superparamagnéticas – estado em que as partículas só apresentam magnetismo na presença de um campo magnético externo, modalidade magnética que apresenta maior vantagem no uso biológico pela ausência de magnetismo intrínseco (KARIMI; KARIMI; SHOKROLLAHI, 2013). O mecanismo que define esta propriedade para escalas reduzidas é que a energia termal é suficiente nessa dimensão para se sobrepôr à energia anisotrópica de cada pequeno ímã (NP), levando a uma flutuação aleatória da magnetização, que resulta em um momento magnético total de zero na ausência de um campo (XIE; LEE; CHEN, 2010).

As propriedades magnéticas de óxidos de ferro, além da sua biocompatibilidade e custo baixo, transformaram este nanossistema em um dos mais explorados pela medicina. Não obstante, a *US Food and Drug Administration* (FDA) e a *European Medicines Agency* (EMA) só aprovaram para uso medicinal poucas formulações de óxidos de ferro devido em grande parte à ausência de métodos comumente aceitos para o preparo reprodutivo em grande escala, assim como a ausência de critérios para definição de qualidade (TOMBÁ CZ *et al.*, 2015).

A diversidade de técnicas já utilizadas para realizar a síntese de NPs é extensa, podendo ser tanto por rota física, química ou biológica, sendo as principais delas citadas na Tabela 8. Apesar disso, o uso de precursores químicos que se associam para formar os cristais de óxido de ferro representam quase 90% dos relatos científicos de síntese de NPs (HASANY *et al.*, 2013).

Tabela 8. Principais técnicas utilizadas nas três rotas de síntese de nanopartículas de óxido de ferro.

<b>Física</b>	<b>Química</b>	<b>Biológica</b>
Litografia por feixe eletrônico	Coprecipitação	Mediada por bactérias
Fresagem	Microemulsão	Mediada por fungos
Pirólise induzida por laser	Hidrotermal	Mediada por proteínas
Ablação por laser pulsado	Eletroquímica	
Deposição de fase gasosa	Sonoquímica	
Aerosol	Decomposição térmica	

Diferente dos métodos tradicionais, a síntese por pirólise induzida por laser é plausível de produção de NPs homogêneas em escala industrial. A técnica consiste no aquecimento de uma mistura de gases com um laser de onda contínua de dióxido de carbono. Acima de determinada pressão e potência do laser, uma concentração crítica de centros de nucleação é atingida, o que leva à nucleação homogênea de partículas que são transportadas até um filtro por um gás inerte (ALEXANDRESCU *et al.*, 2010).

Além do tamanho e das propriedades dos cristais de óxido de ferro, a superfície de NPs tem importante papel na sua aplicação biológica. Visando conferir estabilidade coloidal, ligantes como polímeros hidrofílicos são extensamente usados, sendo o dextrano e seus derivados os

mais comuns e já foram descritos diversos nanossistemas que associam fármacos a NPs com comprovada eficácia terapêutica (PETRYK *et al.*, 2009; QUINTO *et al.*, 2015).

Nos últimos anos pesquisas têm demonstrado as vantagens de utilizar fluidos magnéticos biocompatíveis - nanopartículas magnéticas dispersas em coloides estáveis em um meio fisiológico - para melhorar a interação biológica de NPs, e nanoemulsões são uma das mais promissoras formas de prover maior biocompatibilidade de NPs (FAN *et al.*, 2016; GANTA *et al.*, 2015; PRIMO *et al.*, 2008).

Nanoemulsões magnéticas já foram descritas para diversas aplicações, como contraste em ressonância magnética (FAN *et al.*, 2016; GANTA *et al.*, 2015), como sensores de metanol em solução (MAHENDRAN; PHILIP, 2013a) e de cátions metálicos de importância biológica (MAHENDRAN; PHILIP, 2013b), na liberação de fármacos a tumores (BRAUN *et al.*, 2012; CHERTOK *et al.*, 2008) e associada a fotossensibilizantes para uso em terapias combinadas (DE PAULA *et al.*, 2015; MACAROFF *et al.*, 2006; PRIMO *et al.*, 2008).

Além do potencial teranóstico de partículas de óxido de ferro associadas a fármacos, uma abordagem terapêutica direta com o uso de NPs é feita pelo uso das terapias magnetohipertérmica e fototérmica. Ambas as modalidades possuem alta especificidade tumoral, são pouco invasivas e permitem controle fino da seletividade espaço-temporal das terapias.

A magnetohipertermia utiliza um campo magnético oscilante gerado por corrente de frequência alternada para aquecer NPs ao limite da temperatura fisiológica (~42°C), tendo como principal aliada a sensibilidade térmica de células tumorais (SALUNKHE; KHOT; PAWAR, 2014).

Os primeiros experimentos que descrevem o uso desta abordagem terapêutica datam de 1957 quando GILCHRIST *et al.*, (1957) demonstraram o aquecimento de vários tipos de tecidos com partículas de 20 – 100 nm de Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. Desde então, diversas publicações descrevem diferentes intensidades e frequências de campo, tipos de nanopartículas magnéticas e aplicações da técnica, sendo que sua eficácia já foi demonstrada tanto *in vitro* (LIN; LIN; LIN, 2012; SADHUKHA *et al.*, 2013; VILLANUEVA *et al.*, 2010), quanto *in vivo* (HUANG, HUI S; HAINFELD, 2013; MIRANDA-VILELA *et al.*, 2013; TABOGA SR *et al.*, 2014).

A terapia fototermal é uma modalidade terapêutica que utiliza lasers infravermelhos para gerar calor pelo uso de nanossistemas que absorvem essa energia luminosa e aquecem

localmente. Nos últimos anos, nanossistemas de oxido de ferro, carbono e ouro tem sido intensamente explorados no uso de terapia fototermal associada a ressonância magnética por imagens ou sinergicamente a outras terapias e demonstraram excepcional efetividade terapêutica em diversos tipos tumorais (HUANG, GUOMING *et al.*, 2015; LIANG, CHAO *et al.*, 2014; MA, XINXING *et al.*, 2012).

Outra abordagem representativa que exemplifica os benefícios da teranóstica é a TFD guiada por imagens. A TFD é clinicamente aprovada tanto no tratamento de câncer quanto para outras doenças e a sua associação a imagens de fluorescência permite que o tempo ideal e o local exatos de elementos fotossensibilizantes sejam conhecidos e utilizados para otimizar a efetividade terapêutica.

NPs têm sido associadas a fotosensibilizantes para uso conjunto de modalidade de imagem como ressonância magnética, direcionamento magnético e a TFD como no trabalho de WANG, DONGSHENG *et al.*, (2014) com ftalocianina de silício no tratamento de tumores de cabeça e pescoço em camundongos e LI *et al.*, (2013) com o fotossensibilizante clorina e6 no tratamento de carcinoma mamário também em camundongos.

A complexidade dos nanossistemas sendo desenvolvidos para o uso teranóstico permite estudar a consequência e destino dos diferentes componentes destes nanossistemas após a exposição biológica e esclarecer sua biodistribuição.

É importante que a biodistribuição seja entendida uma vez que afeta tanto a eficácia quanto segurança dos nanossistemas de liberação de fármacos, fatores decisivos para que a sua aplicação clínica seja viável (ALMEIDA *et al.*, 2011). Neste contexto, foi desenvolvida uma nanoemulsão magnética com elementos rastreáveis e foi estudado como esses componentes interagem com as células e quando e em que proporção atingem diferentes órgãos pelo uso de técnicas de biodistribuição tanto *in vivo* quanto *ex vivo*.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Materiais

Cloreto de alumínio ftalocinaina (cloro(29*H*,31*H*-ftalocianinato)alumínio - ~85% de pureza), dimetil sulfóxido (DMSO - grau de HPLC), 1,3-difenil-isobenzofurano (DBF), cremophor (Kolliphor® ELP) e óleo de Rícino foram adquiridos de Sigma (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, EUA). Metanol e etanol utilizados para análise em cromatografia líquida foram de grau HPLC e adquiridos a partir de Mallinckrodt (Mallinckrodt Inc., Hazelwood, MO, EUA). Ácido trifluoroacético (TFA), ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) e cloreto de sódio (NaCl) foram adquiridos a partir de VETEC (Duque de Caxias, RJ, Brasil), todos de grau ACS. Água tipo I foi obtida a partir de Barnstead EASYpure II Thermo Scientific (San Jose, CA, EUA).

### 2.2 Preparo de nanopartícula magnética de magnetita/maguemita por pirólise a laser

Diversas nanopartículas sintetizadas pelo grupo da professora Dr. Maria del Puerto Morales (Instituto de Ciência de Materiais de Madrid, Espanha) foram testadas quanto à compatibilidade com o óleo de rícino utilizado neste estudo. As nanopartículas variaram quanto ao tamanho (5 – 30 nm), presença ou não de cobertura de ácido oleico e quanto ao grau de pureza pelo número de lavagens com etanol a que foram submetidas para remoção do excesso de contaminantes do processo de síntese. Foram realizadas tentativas de associar o óleo de rícino como cobertura nas partículas pela sua associação a partículas sem cobertura e pela substituição do ácido oleico pelo óleo de rícino. A verificação da compatibilidade das nanopartículas com o óleo de rícino foi realizada pela observação da presença de fases/precipitados. As únicas nanopartículas que se mostraram passíveis de se manter em suspensão em óleo de rícino foram as utilizadas neste estudo.

As nanopartículas de óxido de ferro utilizadas neste trabalho foram sintetizadas pelo grupo dos Professores Dr. Sabino Veintemillas-Verdaguer e Dr. Maria del Puerto Morales (grupo de Nanocristais e Química do Instituto de Ciência de Materiais de Madrid, Espanha) no projeto intitulado “BONSAI FP6 EU” pela técnica de pirólise a laser. A organização fundamental da pirólise a laser está mostrada na Figura 14 .



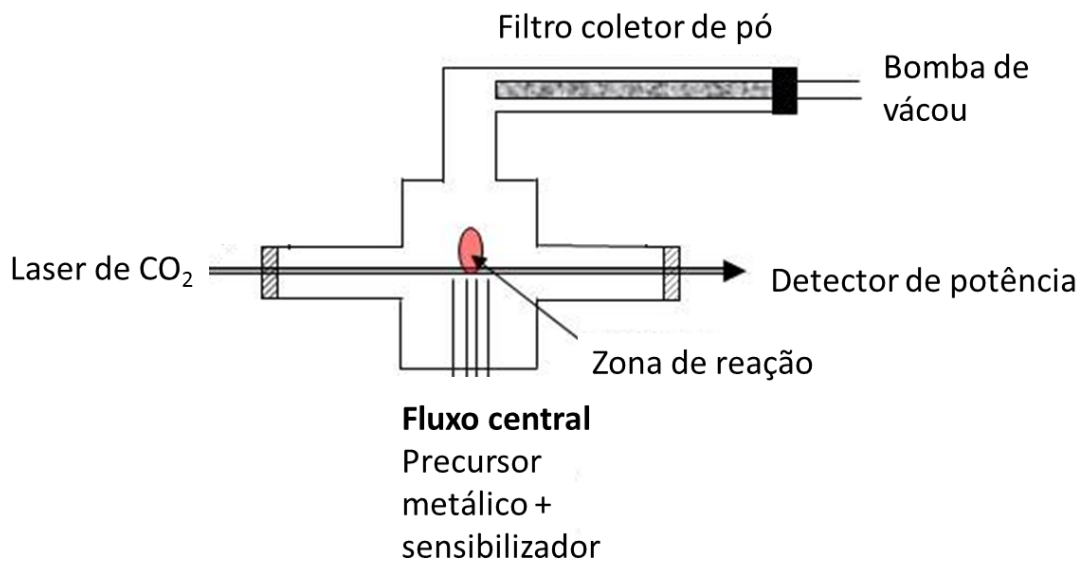


Figura 14. Ilustração dos componentes envolvidos na pirólise a laser (ICMM-CSIC-Pirólise a laser).

A técnica consiste no aquecimento de uma mistura e gases com um laser de dióxido de carbono de comprimento de onda contínuo que inicia e mantém a reação química. A partir de determinada pressão e potência do laser, uma concentração crítica de núcleos é atingida na zona de reação levando à nucleação homogênea de partículas que são em seguida filtradas pelo deslocamento de gás inerte que preenche a câmara (ALEXANDRESCU *et al.*, 2010).

A caracterização deste nanossistema foi detalhada em estudos já publicados (ALEXANDRESCU *et al.*, 2010). Resumidamente, microscopia eletrônica de transmissão identificou as NPs utilizadas neste estudo como tendo tamanho aproximado de 3 nm. Microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução identificou espaços entre os planos que compõem os cristais, um indício da composição combinada de magnetita (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) e maghemita (γ-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>), com teor de 2,5% (p/p) de carbono residual. As nanopartículas apresentaram propriedade superparamagnética, com valor de saturação da magnetização à temperatura ambiente de 7,9 emu/g Fe, índice de polidispersão de 0,218 e carga de + 43,5 mV.

### 2.3 Preparo de nanossistemas NE, NE-Ft, NE-MAG, NE-MAG-Ft

No presente trabalho foram investigados cinco nanossistemas:

- 1) Nanopartículas de óxido de ferro – “NP”
- 2) Nanoemulsão branca – “NE” (óleo de rícino + cremophor);
- 3) Nanoemulsão contendo AICIFt – “NE-Ft” (óleo de rícino + cremophor + AICIFt);
- 4) Nanoemulsão magnética branca – “NE-MAG” (óleo de rícino + cremophor + NP)
- 5) Nanoemulsão magnéticas contendo AICIFt – “NE-MAG-Ft” (óleo de rícino + cremophor + NP + AICIFt)

As NPs foram recebidas em estado sólido e para preparo de suspensão de NP, 8 mg de NP foram adicionados a 10 mL de tampão fosfato e submetidas a ultrassonicação em processador ultrassônico Vibra Cell VCX750 (Sonics, CT, EUA) com sonda de titânio e potência de 20% até obtenção de completa homogeneidade da solução.

As nanoemulsões utilizadas neste estudo foram obtidas a partir de adaptações ao protocolo de preparo de nanoemulsão (NE) de óleo de rícino com uso do surfactante cremophor descrita por MUEHLMANN *et al.*, (2015).

Para preparo de 10 mL de NE, 300 µL de óleo de rícino foram adicionados a 900 µL cremophor e em seguida a mistura foi submetida à ultrassonicação em processador ultrassônico com sonda de titânio e potência de 20% até obtenção de completa homogeneidade da solução (~30 s). A mistura óleo de rícino + cremophor, se encontrava a temperatura de ~50°C após ultrassonificação, foi transferida para 8,5 mL de tampão fosfato sob agitação e aquecido a 70°C. Nesse momento, se observa o fenômeno de inversão de fase e formação da nanoemulsão. A amostra foi mantida sob agitação até a suspensão atingir a temperatura ambiente e então completada para 10 mL com tampão fosfato.

Previamente à obtenção de NE-Ft, uma solução de óleo de rícino contendo AICIFt foi preparada pela adição de 766,6 µg de AICIFt em etanol para cada mL de óleo de rícino. Em seguida a mistura foi deixada agitando a 80°C até a evaporação completa do etanol. Esta solução foi utilizada no descrito acima no lugar do óleo de rícino para a obtenção de NE-Ft.

No preparo de NE-MAG, as NPs secas foram dispersas diretamente no óleo de rícino. Para preparo de 10 mL de nanoemulsão magnética (NE-MAG), 8 mg de NP foram adicionadas a 300 µL

de óleo de rícino. A mistura foi submetida a ultrassonicação com sonda de titânio e potência de 20% até obtenção de completa homogeneidade da solução (~30 segundos). Em seguida foram adicionados 900 µL de Cremophor à mistura e novamente homogeneizado em processador ultrassônico (~30 segundos). A mistura NP + óleo de rícino + cremophor se encontrava em temperatura de ~50°C após ultrassonicação e foi transferida para 8,5 mL de tampão fosfato sob agitação e aquecido a 70°C. A amostra foi mantida sob agitação até suspensão atingir a temperatura ambiente e então completada para 10 mL com tampão fosfato.

Para o preparo de NE-MAG-Ft, a solução de óleo de rícino contendo AICIFt (766 µg/mL) foi utilizada no lugar do óleo do rícino.

A quantificação de AICIFt em NE-Ft e NE-MAG-Ft foi realizada como descrito no tópico “Extração e quantificação de AICIFt em nanoemulsão” do capítulo 2. Resumidamente, AICIFt foi extraída dos nanossistemas com etanol 70%, a solução foi passada em sistema filtrante Amicon e o eluído foi quantificado em equipamento de cromatografia líquida com detecção de fluorescência. Na Tabela 9. estão descritos os componentes presentes em cada nanossistema.

Tabela 9. Descrição dos componentes presentes nos nanossistemas desenvolvidos e suas concentrações finais.

<b>Componentes</b>	<b>NP</b>	<b>NE</b>	<b>NE-Ft</b>	<b>NE-MAG</b>	<b>NE-MAG-Ft</b>
<b>NP (mg/mL)</b>	0,8	0	0	0,8	0,8
<b>AICIFt (µg/mL)</b>	0	0	23	0	23
<b>Óleo + Surf* (mg/mL)</b>	0	120	120	120	120

\*Surf= surfactante cremophor

## 2.4 Caracterização de NP, NE, NE-Ft, NE-MAG e NE-MAG-Ft

### 2.4.1 Dispersão dinâmica de luz e mobilidade eletroforética

Para determinar o diâmetro hidrodinâmico (DH) e o potencial Zeta (Zp) dos nanossistemas propostos, foi utilizado o equipamento Zetasizer Nano ZS® (Malvern Instruments Ltd., Reino Unido; laser 633 nm).

As amostras foram diluídas em PBS, na proporção de 50:950 (v:v) e agitadas por 1 minuto em vortex. As amostras foram estabilizadas no equipamento Zetasizer Nano ZS° por 120

segundos e a análise foi realizada a 25°C com ângulo de leitura de 90°. Foram realizadas três leituras de cada amostra.

#### 2.4.2 Morfologia e tamanho

Como as dimensões de nanossistemas têm grande influência na interação com sistemas biológicos, o tamanho das partículas obtidas foi identificado por microscopia eletrônica de transmissão (MET), crio-microscopia eletrônica de transmissão (Crio-MET) e microscopia de força atômica.

Para imagens de MET, foi utilizado microscópio eletrônico da JEOL® (JEM 2100 F, Japão) do CIC biomaGUNE, San Sebastian, Espanha, com o auxílio do software Image ProPlus® (Media Cybernetics, Rockville, EUA). Antes da análise, as amostras foram diluídas em água ultrapura na concentração de 3% (v:v). Foram utilizadas telas de cobre recobertas com carbono e imediatamente antes da deposição da amostra, foram tratadas com descarga de brilho para dar carga à superfície da tela e aumentar sua hidrofiliabilidade. Os agentes de contrastação negativa acetato de uranila (0,05%) e molibdato de amônio (2%) foram utilizados visando identificar o tamanho das nanoemulsões antes da sua deformação pela desidratação. Telas de cobre foram também preparadas pela técnica de eletrospray, que utiliza um jato rarefeito da amostra que seca antes de chegar na tela. Esta técnica evita efeitos de agregação decorrente da secagem do material.

Para imagens de Crio-MET as amostras foram analisadas em microscópio JEOL (JEM-2200FS/CR) com auxílio do técnico responsável David Gil-Carton (CIC bioGUNE, Derio, Espanha). As amostras foram crio-fixadas de forma a conservar um ambiente semelhante ao ambiente aquoso evitando artefatos ou deformações decorrentes do processo de desidratação, com uso do Vitrobot (FEI Thermo Fischer Scientific, Massachusetts, EUA). Antes da análise, as amostras foram diluídas em água ultrapura na concentração de 3% (v:v). Foram utilizadas telas de cobre cobertas com carbono ultra-fino.

Para imagens de microscopia de força atômica foi utilizado o microscópio Nanoscope V MultiMode (Bruker, Massachusetts, EUA). A microscopia de força atômica é uma técnica de análise que consiste na varredura da superfície de uma amostra com uma sonda a fim de obter imagem topográfica com resolução atômica, além de mapear certas propriedades mecânicas e

físico-químicas dos materiais que as compõe. Para análise, amostra de NE-MAG-Ft foi adicionada diretamente a discos de silício ou a discos previamente tratados com  $\text{H}_2\text{O}:\text{NH}_4\text{OH}:\text{H}_2\text{O}_2$  (1,5:1:1, v:v:v), a 55°C por 10 min, e funcionalizados com solução de aminosilano 20 mM a 70°C por 16 h em ambiente de nitrogênio. Foram analisados tantos espécimes secos como líquidos, com o fator de diluição e número de lavagens variando para o tipo de análise (sólida/líquida). A aquisição foi realizada com auxílio do pesquisador Nikolaos Politakos (CIC biomaGUNE, San Sebastian, Espanha).

#### 2.4.3 Propriedades fotofísica

A caracterização das propriedades fotofísicas dos nanossistemas foi realizada com auxílio de espectrofotômetro. Os espectros de absorbância e fluorescência dos nanossistemas foram obtidos em volume de 200  $\mu\text{L}$  em placas de 96 poços em espectrofotômetro (Spectramax M2, Molecular Devices, EUA). Espectros de absorbância e de emissão de fluorescência (com excitação a 350nm) foram obtidos de 360 a 750 nm, respectivamente.

#### 2.4.4 Geração de oxigênio singleto de AICIFt

A funcionalidade de AICIFt como fotossensibilizante uma vez incorporada aos nanossistemas foi verificada como descrito no capítulo 1 no tópico “Caracterização de potencial terapêutico de F127/AICIFt – produção de oxigênio singleto”. Resumidamente, foi determinada a capacidade de geração de oxigênio singleto ( $^1\text{O}^2$ ) ao ser fotoativada com LED de comprimento de onda de 660 nm, pela observação da degradação da sonda 1,3-difenil-isobenzofurano (DBF), uma vez que a absorbância de DBF a 410 diminui de forma proporcionalmente à quantidade de moléculas de  $^1\text{O}^2$  geradas.

#### 2.4.5 Magnetização

Curvas de magnetização dos nanossistemas foram estudadas pelo uso de um magnetômetro de amostra vibrante (mais conhecido pela sigla em inglês – VSM – *Vibrating samples magnetometer*) da Oxford Instruments (VSM, MLVSM9 MagLab 9 T, Oxon, Reino Unido). Foi registrada a curva de magnetização à temperatura ambiente depois de aplicado um campo máximo de entre 1 e 5 T. Este tipo de medida permite conhecer o valor de magnetização de saturação, que é o valor da magnetização quando os momentos magnéticos se encontram

alinhados com o campo magnético externo aplicado. Para as análises 100 µL das amostras foram adicionados a algodão e colocados no interior do VSM.

#### **2.4.6 Espectroscopia no Infravermelho por transformada de Fourier**

A espectroscopia no infravermelho é um tipo de espectroscopia de absorção, que utiliza a interação de radiação infravermelha com a amostra de interesse visando esclarecer a estrutura das moléculas pela absorbância de frequências específicas. A espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (mais conhecida pela sigla em inglês FTIR - *Fourier transform infrared spectroscopy*), é uma adaptação da técnica que coleta os dados de absorção pela passagem da luz infravermelha em um interferograma, o que torna a técnica mais rápida e barata. Todos os componentes utilizados no preparo dos nanossistemas e os nanossistemas finais foram analisados em FTIR Thermo Nicolet 6700 (Thermo Electron Corporation, ThermoFischer Scientific, Massachusetts, EUA). As amostras foram liofilizadas e misturadas com brometo de potássio na proporção de 1:5 e por pressão transformadas em discos e lavadas ao FTIR. Foram realizadas 32 leituras de cada amostra na região de 4.000 a 400  $\text{cm}^{-1}$ ; ganho de 8,0 vezes; e resolução 4.000.

#### **2.4.7 Avaliação de possíveis contaminantes biológicos**

Visando evitar a possível contaminação dos nanossistemas desenvolvidos, todos os frascos e ponteiros utilizados foram previamente esterilizados e a manipulação dos nanossistemas foi realizada em fluxo laminar. Para verificação de contaminantes, 20 µL dos nanossistemas foram adicionados a placas de 12 poços contendo 2 mL de uma das seguintes condições: soro fetal bovino (SFB) puro, tampão PBS, meio de cultivo DMEM (Meio Eagle modificado por Dulbecco) e meio DMEM suplementado com 10% (v:v) SFB e 1% (v:v) de solução de antibiótico (100 unidades/mL de penicilina e 100 mg/mL de estreptomicina). As placas foram observadas em microscópio invertido diariamente por 10 dias e incubadas a 37°C durante os dias de análise.

### **2.5 Estudos *In vitro***

As células de adenocarcinoma pulmonar (A549) são um modelo celular extensamente utilizado na literatura tanto por serem um modelo de câncer de pulmão de grande interesse

terapêutico, quanto por preservar muitas características de células epiteliais alveolares humanas primárias (JIANG; SHEN; PIAO, 2010). Diversos nanossistemas já foram testados nesta linhagem permitindo a comparação entre os trabalhos desenvolvidos em termos de toxicidade e de efetividade terapêutica (SOUZA *et al.*, 2014; AHLINDER *et al.*, 2013; KHAN *et al.*, 2012; WATANABE *et al.*, 2013).

Os macrófagos são elementos chave na defesa do hospedeiro: removem células mortas, detritos e patógenos; modulam a resposta inflamatória secretando citocinas e afins; modulam a imunidade adaptativa atuando como apresentadores de antígenos (WEISSLEDER; NAHRENDORF; PITTET, 2014) (VILSINSKI, BRUNO HENRIQUE *et al.*, 2015). Nanomateriais expostos a seres vivos, tem como regra contato captação pelos macrófagos, pela distribuição desta célula em todos os tecidos e sua alta atividade endocítica. Com isso, estudos que avaliam a interação de macrófagos com nanomateriais são de extrema importância uma vez que possuem papel chave no primeiro contato e na degradação deste nanossistemas. Várias linhagens de macrófagos estão disponíveis para estudos *in vitro*, incluindo a célula murina RAW 264,7. Essas células apresentam diferença em relação a células primárias por serem modificadas para crescer continuamente em cultivo (BERGHAUS *et al.*, 2010). Não obstante, muitos estudo descrevem o uso desta célula para testes com nanossistemas permitindo a comparação do presente trabalho em termos de toxicidade e de efetividade terapêutica (GONZALES *et al.*, 2010; WANG, YI-XIANG J *et al.*, 2013; ZHU *et al.*, 2012)

### 2.5.1 Cultivo celular

Células de adenocarcinoma pulmonar humano (A549 - ATCC-CCL-185TM) e de macrófago murino (RAW 264.7 - ATCC TIB-71TM) foram utilizadas nos ensaios *in vitro*. As células A549 foram cultivadas em meio RPMI 1640, e as RAW 164.7 em DMEM, ambos suplementados com 10% (v:v) de soro fetal bovino (SFB) e 1% (v:v) de solução de antibiótico (100 unidades/mL de penicilina e 100 mg/mL de estreptomicina). As células foram mantidas em incubadora a 37°C, 80% de umidade e 5% de CO<sup>2</sup>. RPMI 1640, DMEM e antibióticos utilizados foram adquiridos da Gibco (Life Technologies, Inc., EUA).

### 2.5.2 Estudo de viabilidade celular

A citotoxicidade dos nanossistemas às células A549 e RAW 264.7 foi avaliada após exposição aos nanossistemas pelo período de 24 h. Os nanossistemas foram preparados para

conter a mesma concentração de óleo/surfactante, AICIFt ou NPs, de forma que a concentração mais alta testada foi avaliada pela diluição dos nanossistemas recém-preparados 4x no meio de cultivo da célula. As demais concentrações testadas foram obtidas pela diluição seriada com um fator de diluição de 2x, rendendo ao total nove concentrações de nanossistemas. Foi utilizado o ensaio de redução do 3,4,5-dimetiltiazol-2,5 bifenil tetrazolio bromide (MTT) como descrito no tópico “Terapia fotodinâmica” do capítulo 1 para verificar a viabilidade celular. Resumidamente, foram utilizadas  $5 \times 10^3$  células/poço de placa de 96 de A549 ou RAW 264.7 e após 24 h, 100  $\mu$ L dos nanossistemas diluídos em meio foram adicionados aos poços. Após 24 h, o meio foi removido e as células foram incubadas com 0,5 mg/mL de MTT em meio de cultivo por 2 h e em seguida os cristais de formazan foram dissolvidos com 200  $\mu$ L de DMSO por poço e a absorbância a 595 nm foi lida em espectrofotômetro de placa.

### 2.5.3 Citometria de fluxo

Visando confirmar a captação de AICIFt pelas células e estudar o tempo ótimo de exposição às células, foi utilizada a técnica de citometria de fluxo. O procedimento utilizado foi o mesmo descrito no capítulo 1 no tópico “Citometria de fluxo”. Resumidamente, as células de A549 ou RAW 264.7 foram dispostas em placas de 24 poços, na concentração de  $5 \times 10^4$  células/poço e os nanossistemas NE-Ft e NE-MAG-Ft na concentração de 1  $\mu$ g/mL foram adicionados aos poços. Após os tempos de 10, 15, 30, 45, 60 e 120 min, as células foram retiradas da placa e observadas em citômetro de fluxo BD FACs Canto II, (EUA), 10000 eventos foram contados por amostra em três experimentos independentes e a fluorescência de AICIFt foi observada no canal APC-A (detecção de emissão de  $660 \pm 20$ nm).

### 2.5.4 Microscopia confocal

Para confirmação da interiorização de AICIFt após exposição das células A549 e RAW 264.7 aos nanossistemas NE-Ft e NE-MAG-Ft, as células foram analisadas por microscopia confocal como descrito no tópico “Microscopia confocal” no capítulo 1. Resumidamente,  $5 \times 10^4$  células/poço foram dispostas em placas pretas de 24 poços de fundo em vidro e após 24 h de cultivo, o meio de cultivo foi removido e foram adicionados 400  $\mu$ L de tampão fosfato, NE-Ft ou



NE-MAG-Ft, incubadas por 2 h e antes de levar ao microscópio, fixadas com paraformaldeído e o núcleo marcado com DAPI (0,1 µg/mL - ThermoFischer Scientific, Massachusetts, EUA).

### **2.5.5 Terapia fotodinâmica**

Foi realizada terapia fotodinâmica das células A549 e RAW 264.7, como descrita no tópico “Terapia fotodinâmica” do capítulo 1, visando verificar a eficiência terapêutica de NE-Ft e NE-MAG-Ft. Resumidamente, as células foram cultivadas em microplacas de 96 poços na concentração de  $5 \times 10^3$  células/poço e após 24 h as células foram expostas com tampão fosfato (controle), NE-Ft ou NE-MAG-Ft por 15 min (condição já estabelecida para outros nanossistemas contendo AlClFt). Em seguida o sobrenadante foi removido e as células foram lavadas com tampão fosfato, enquanto uma placa foi submetida à irradiação para verificação da fototoxicidade com fluência total de  $25,3 \text{ J/cm}^2$ , outra idêntica era mantida no escuro para verificação da toxicidade nessa condição. Após 18 min de irradiação ou incubação no escuro as células foram lavadas com tampão fosfato e o meio reestabelecido. Após 24 h, as células foram incubadas com 0,5 mg/mL MTT e em seguida, o meio com MTT foi removido e 200 µL de DMSO foram adicionados por poço e as placas foram analisadas em espectrofotômetro de placa.

## **2.6 Estudos *in vivo***

### **2.6.1 Animais**

Camundongos machos C57BL/6 pesando aproximadamente 25 g, com idade de 8 a 11 semanas, foram utilizados em todos os experimentos. Os animais foram alojados em gaiolas de polipropileno sob condições controladas de luminosidade (ciclos diários de 12 h de luz e 12 h de escuro) e foram abastecidos com alimento e água a vontade. Todos os procedimentos com animais realizados neste estudo foram aprovados pelo Comitê de Uso e Cuidado Animal da Universidade de Brasília (UnB), Brasília - Distrito Federal (UnBDoc nº 144446/2014 Anexo 1).

### **2.6.2 Radiomarcção e biodistribuição por tomografia computadorizada por emissão de fóton único**

A tomografia computadorizada por emissão de fóton único, mais conhecida pela sigla em inglês *single photon emission computerized tomography* – SPECT, foi utilizada para acompanhar a

distribuição de NPs marcadas com gálio-67 (Ga-67) e foi realizada em tomógrafo eXplore speCZT Vision120 (GE Healthcare, Waukesha, USA) com auxílio do técnico responsável Boguslaw Szczupak na unidade de Radioquímica do CIC biomaGUNE (San Sebastian, Espanha). A técnica de tomografia computadorizada por emissão de fóton único detecta a radiação gama produzida por radioisótopos com detalhes anatômicos em três dimensões nos tecidos (Müller e Schibli, 2013).

O protocolo utilizado para a marcação de NP com Ga-67 foi adaptado de protocolo de BURKE *et al.*, (2014) e BURKE *et al.*, (2015). O Ga-67 utilizado foi adquirido da empresa Molypharma (Alcobendas, Espanha) como solução de citrato de gálio. Inicialmente, o citrato de gálio foi convertido em cloreto de gálio pela retenção em coluna de sílica Sep-Pak light (Waters, Milford, MA, EUA), seguido por lavagem com água e eluído com ácido clorídrico 0,1 M. O eluído foi coletado em frações com volume de 100  $\mu$ L e os frascos contendo a maior atividade específica foram utilizados nas etapas posteriores com uso de 10  $\mu$ L por reação.

Para estabelecimento de melhor condição para reação de incorporação do gálio na estrutura do óxido de ferro, foram testados os seguintes parâmetros: tempo de reação (10, 20 ou 30 min de reação), temperatura da reação (25, 37 e 70°C), solução de reação (0,05 M e 0,2 M tampão acetato, água ultrapura e tampão fosfato) e concentração de NPs (3, 6, 9, 30, 90 e 140 mM). A condição estabelecida e utilizada e todos os demais experimentos foi de 30 min de reação a 70°C com uso do tampão acetato 0,05 M e concentração de NPs de 30 mM, exceto no preparado na NE-MAG-Ft onde se utilizou 140 mM de NPs. Nas etapas de estabelecimento de condição da determinação da estabilidade se utilizou por reação  $\sim$  370 kBq de forma a evitar excesso de exposição à radioatividade. Para o preparo de NP e NE-MAG-Ft para administração em animais se trabalhou com reação contendo 111 MBq.

NPs foram misturadas a cloreto de gálio em tampão acetato 0,05 M (volume final de 350  $\mu$ L com pH de 4,00) e após incubação a 70°C por 30 min, a reação foi centrifugada 2x a 10000 *g* por 10 min e lavadas duas vezes com água para remoção de gálio livre e retenção de NPs marcadas com gálio pelo uso de unidade filtrante (Amicon Ultracel 50k - MWCO 50 kDa, Merck). Em seguida as NPs foram recuperadas da unidade filtrante com a adição de 100  $\mu$ L de água e transferência para novo tubo. A quantificação do gálio livre eluído, assim como o aderido à unidade filtrante e recuperado na forma de NPs foi quantificado em um contador de emissão de raios gamma automático 2470 WIZARD2 (PerkinElmer) e expresso como % da atividade total.

Após preparo de NP-Ga-67, esperou-se que a amostra decaísse até valor abaixo do aceito como referência de lixo contendo gálio, para ser caracterizada quanto à dispersão dinâmica de luz e microscopia eletrônica de transmissão.

A estabilidade da marcação de NP com gálio foi estabelecida pela manutenção das NPs marcadas com gálio em tampão fosfato a 37°C por 0, 5, 10, 20, 30, 60 min, 3, 5, 24 e 48 h. Após os tempos citados NPs eram centrifugadas em dispositivo de ultrafiltração, como descrito acima, e o gálio livre eluído, a fração aderida à unidade filtrante e o recuperado foram quantificados.

Durante todas as etapas de desenvolvimento, foi realizado controle contendo somente gálio em solução, para confirmação que a condição sendo testada não levava à precipitação de gálio livre, impedindo a remoção de gálio livre pela unidade filtrante.

Para o preparo dos nanossistemas NP e NE-MAG-Ft para administração nos animais, duas preparações com 8 mg de NP foram incubadas com cloreto de gálio como descrito acima e, após remoção de gálio livre por unidade filtrante, uma preparação foi reconstituída em 10 mL de PBS (NP- Ga-67) enquanto a segunda preparação foi utilizada para constituir NE-MAG-Ft- Ga-67 com protocolo já descrito no tópico “Preparo de nanossistemas NE, NE-Ft, NE-MAG, NE-MAG-Ft” no capítulo 3. O peso dos animais variou de 25 – 27 g, o que permitiu que fosse padronizado o volume administrado de 100 µL dos nanossistemas puros por via endovenosa em camundongos C57BL/6, após a verificação da atividade total de cada seringa no calibrador de dose CRC-25R (Capintec, EUA). A quantidade de NP administrada por animal foi de 80 µg. Devido à dificuldade intrínseca do centro de pesquisa em que esta parte do estudo foi realizada (CIC biomaGUNE) de permitir o uso de animais para pesquisa, só foi possível utilizar dois animais para cada nanossistema testado.

Com os animais mantidos em anestesia por isoflurano (1,5 – 2% em oxigênio), imagens de SPECT/CT de corpo inteiro foram adquiridos nos tempos de 2, 22, 48 e 72 h após a administração. Dados foram adquiridos com janela de aquisição de energia de 125–150 keV a 84–102 keV e tempo de aquisição de 60 min. Após cada aquisição de SPECT, imagens de tomografia computadorizadas foram adquiridas para dar informações anatômicas, com aquisição de 220 planos com 0,88° de incremento ao redor do animal e 16 ms de exposição por plano. As imagens foram reconstruídas utilizando o algoritmo iterativo OSEM com (subgrupos de 5 e 15 e com iteração de 3 e 5).

Após o último tempo de aquisição, os animais foram sofrerem eutanásia e os órgãos de interesse (fígado, rins, baço, coração, pulmão e sangue) foram removidos, pesados e submetidos a contagem da atividade em contador de emissão de raios gamma automático.

Após aquisição as imagens foram processadas no programa *PMOD Analysis Software* (versão 3.4, PMOD Technologies Ltd, Zürich, Suíça).

### 2.6.3 Biodistribuição por fluorescência *in vivo/ex vivo*

Para estudo da distribuição da fluorescência de AIClFt após administração dos nanossistemas NE-Ft e NE-MAG-Ft, foi utilizado o equipamento IVIS Lumina XR (Caliper Life Sciences, Massachusetts, EUA). Esta técnica além de permitir a aquisição de forma não-invasiva é especialmente eficaz para moléculas que emitem fluorescência no espectro do infravermelho, como é o caso de AIClFt, entretanto com os animais utilizados neste estudo (C57BL/6) não foi possível quantificar a fluorescência sem a remoção dos órgãos. Desta forma, os mesmos órgãos que foram utilizados para a quantificação analítica de AIClFt por cromatografia líquida de alta eficiência, foram previamente analisados quanto à fluorescência por imagem *ex vivo*.

Os animais utilizados neste estudo tinham pesos que variavam de 26 a 28 g e se escolheu manter o padrão de volume de administração por animal adotado na técnica de SPECT, utilizando 100 µL de NE-Ft ou de NE-MAG-Ft por animal.

A biodistribuição nos órgãos foi aferida nos tempos de 2, 12, 24, 48 e 72 h após a administração endovenosa. Devido à intensa autofluorescência da pele e pelos, os animais foram anestesiados com 60 mg cetamina e 7,5 mg xilasina por kg de massa corporal; foi realizada punção cardíaca e o sangue total coletado em microtubos de centrífuga. Em seguida os órgãos foram extraídos, lavados em solução salina e o excesso de líquido foi removido com papel filtro. Os órgãos foram então pesados e organizados em cartolina preta para aquisição da fluorescência por imagem.

Foi utilizado o campo de aquisição C, com todas as combinações de excitações e emissões presentes no equipamento de forma a permitir o “espectral unmixing” - ferramenta que permite remover toda a autofluorescência das amostras. Para quantificação de fluorescência nos órgãos, as imagens foram processadas utilizando excitação e emissão de acordo com o já estabelecido como mais próximo de ideal para AIClFt por verificação em espectrofotômetro, excitação a 660 e

emissão a 710. Foram utilizados os parâmetros de “binning” de 8, f/stop de 4 e o tempo de exposição foi de 1 s. As imagens foram adquiridas e processadas no software Living Image®, versão 4.5.2 (Caliper Life Sciences, Massachusetts, EUA). Após aquisição das imagens os órgãos foram transferidos para microtubos de centrífuga e armazenados a -80°C para processamento para e utilização na técnica de cromatografia.

A intensidade de fluorescência nos órgãos foi analisada quanto ao parâmetro de eficiência radiante ( $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ ) e a mesma área foi utilizada para definir as seis regiões de interesse por imagem (fígado, pulmão, rins, baço, coração e sangue – Figura 15) para todos os animais. A intensidade da eficiência radiante dos órgãos de animais não expostos a AIClFt foi estabelecida como autofluorescência e seu valor foi descontado de cada órgão correspondente. Os dados obtidos por órgão foram representados tanto como eficiência radiante quanto como eficiência radiante por grama de tecido, de forma a normalizar a contribuição da massa de cada órgão para o sinal observado.



Figura 15. Organização utilizada para aquisição de imagem por fluorescência *ex vivo* demonstrando regiões de interesse (ROI) contendo os órgãos de animais controle. ROI 1: fígado, ROI 2: pulmão, ROI 3: rins, ROI 4: coração, ROI 5: baço, ROI 6: sangue.

#### 2.6.4 Biodistribuição por cromatografia líquida de alta eficiência

Método de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) utilizado foi adaptado do método desenvolvido no capítulo 2 para cromatografia líquida de ultra alta eficiência (CLUE)

Foi utilizado um cromatógrafo Shimadzu-Prominence, equipamento cromatográfico de alta performance constituído por desgaseificador em linha (Modelo DGU 20A5), módulo de distribuição de solvente (modelo LC-20AT), injetor automático (modelo SIL-20AHT), forno de coluna (Modelo CTO-20A), detector de fluorescência (modelo RF-10AXL) e controlador do sistema

CBM-20A. Foi utilizada uma coluna de fase reversa C8 Vydac (25 x 0,4 cm com 5 µm de tamanho de partícula) (Separations Group, Ltd., Deeside, Inglaterra) com pré-coluna (1 x 0,4 cm, 5 µm de tamanho de partícula) (Separations Group, Ltd., Deeside, Inglaterra).

A fase móvel foi obtida a partir da mistura de 0,12% de TFA em água Tipo 1 (bomba A) e metanol (bomba B) com proporção 40:60 (v:v), rendendo uma fase móvel isocrática. Medições fluorimétricas foram realizadas em célula de fluxo de 12 µL com comprimentos de onda de 600 e 675 de excitação e emissão, respectivamente. O volume de injeção foi de 5 µL e vazão durante os ensaios foi de 1 mL / min a uma pressão de trabalho de 120 kgf/cm<sup>2</sup>. A coluna foi mantida a 30°C durante as análises. O software LCsolution (Shimadzu, Tóquio, Japão) foi utilizado para o processamento de dados e identificação de parâmetros cromatográficos.

A condição de extração utilizada foi a mesma descrita anteriormente: etanol:DMSO:ácido acético (89:10:1). Soluções de AICIFt para realização da curva padrão e AICIFt extraídas de nanossistemas e órgãos foram injetadas no CLAE na solução extratora para evitar diferenças nos picos observados pela composição dos solventes de AICIFt. Como a condição extratora para recuperação se mostrou eficiente na validação realizada por CLUE, não foram desenvolvidas curvas de matriz biológica para o método de CLAE, e sim uma curva no solvente de extração.

Plasma, fígado, baço, pulmão e rim de animais sem exposição a fármacos foram utilizados como matriz biológica basal para confirmação da seletividade do método. As amostras utilizadas na biodistribuição por CLAE foram as mesmas obtidas na biodistribuição de fluorescência por imagens citada anteriormente, sendo que a sua extração já foi explicada no tópico anterior.

Para a quantificação de AICIFt no sangue, o volume total obtido após foi pesado e extraído com 0,7 mL da solução extratora etanol:DMSO:ácido acético (89:10:1, v:v:v). As amostras foram agitadas em um vórtex durante 1 minuto e centrifugadas durante 5 min a 6000 g. O sobrenadante foi transferido para um balão volumétrico de 2 mL e 1 mL de solução extratora foi adicionado às amostras para repetir a extração. As amostras foram agitadas durante 1 min, seguido por centrifugação durante 5 min a 24000 g e transferidas para o mesmo frasco volumétrico. Os órgãos inteiros e 400 mg de fígado foram homogeneizados em tubos de microcentrífuga com homogenizadores de tecidos manuais e extraídos utilizando o mesmo processo descrito para o plasma.

## **2.7 Análise estatística**

Os resultados foram analisados no software GraphPad Prisma® 5.0 e submetidos a testes estatísticos específicos com confiança estatística de 95% ( $p < 0,05$ ). Possíveis diferenças estatísticas foram avaliadas pelos testes ANOVA, de uma ou de duas vias, Mann-Whitney e Kruskal-Wallis, empregando-se pós-testes de Tukey ou de Bonferroni. Os resultados quantitativos foram descritos como média  $\pm$  erro padrão da média.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 Caracterização morfológica de NP, NE, NE-Ft, NE-MAG e NE-MAG-Ft

As nanopartículas de óxido de ferro de maguemita+magnetita (NP) utilizadas neste estudo foram inicialmente caracterizadas quanto à dispersão no óleo de rícino e em água. Foi observado que mesmo após uso de ultrassonicação, as NP dispersas em água deixadas à temperatura ambiente em concentrações acima de 1 mg/mL de NP, após uma hora já apresentavam precipitados no fundo do frasco, o mesmo não sendo observado no óleo de rícino. NP diluídas em água ultrapura, seguida pela sua ultrassonicação por 1 min foram analisadas pela técnica de dispersão dinâmica de luz (DDL) e o resultado pode ser observado na Figura 16.

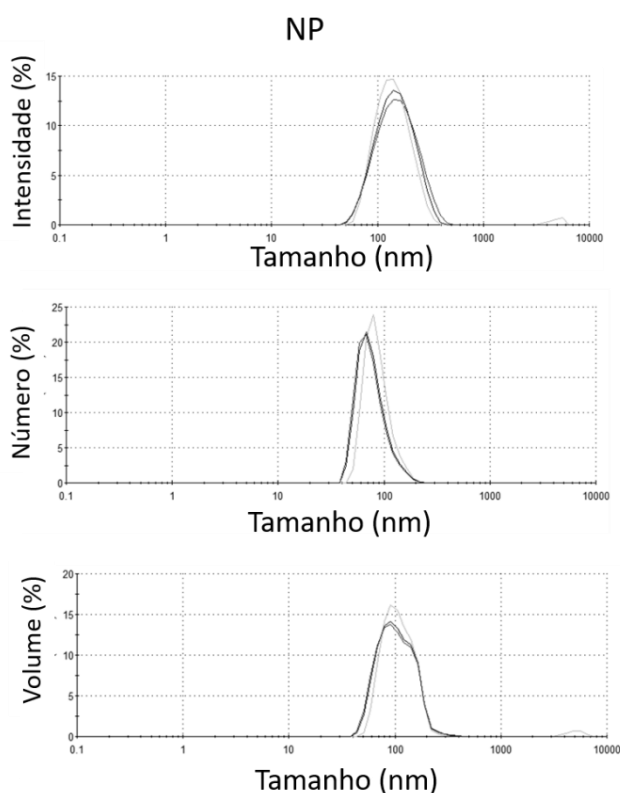


Figura 16. Distribuição do tamanho de NP (nm) identificado por dispersão dinâmica e luz. Diluição de 20x em água ultrapura.

Foram feitas tentativas de dispersar NP tanto por banho de ultrassom por 15 min de como por ultrassonicação por até 15 min, entretanto, a amostra sempre foi observada por DDL como contendo partículas de  $138,3 \pm 5,24$  nm com índice de polidispersão de 0,15. Na distribuição por



intensidade é observada uma única população de tamanho de 164,6 nm. O potencial Zeta de NP foi aferido como +44 mV.

As nanoemulsões NE, NE-Ft, NE-MAG e NE-MAG-Ft foram preparadas com adaptações ao protocolo de (MUEHLMANN *et al.*, 2015) e o diâmetros hidrodinâmicos “z-average”, tamanho das populações identificadas pelo parâmetro intensidade, índices de polidispersão e potencial Zeta dos nanossistemas diluídos 20x em água estão listados na Tabela 10. A instabilidade química observada em testes biológicos de nanoemulsões magnéticas com mais de 30 dias (descrito posteriormente), resultou no preparo a cada 14 dias de novo lote de nanossistemas. Os resultados apresentados na Tabela 10 são a média de três lotes de sínteses.

Tabela 10. Diâmetros hidrodinâmicos “z-average”, tamanho das populações identificadas pelo parâmetro intensidade, índices de polidispersão e potencial zeta dos nanossistemas NE, NE-Ft, NE-MAG e NE-MAG-Ft diluído 20x em água.

<b>Nanossistema</b>	<b>Diâmetro hidrodinâmico (nm) “Z-average”</b>	<b>Populações identificadas por intensidade</b>	<b>Índice de polidispersão</b>	<b>Potencial Zeta (mV)</b>
<b>NE</b>	26,99 ± 0,75	29,17	0,062	-3,37 ± 0,45
<b>NE-Ft</b>	36,18 ± 0,88	44,91	0,172	-2,09 ± 0,72
<b>NE-MAG</b>	63,08 ± 1,29	37,66 e 241,6	0,444	-10,81 ± 0,23
<b>NE-MAG-Ft</b>	106,3 ± 1,89	48,22 e 291,4	0,465	-11,30 ± 0,11

Os histogramas de diâmetro hidrodinâmico de NE, NE-Ft, NE-MAG e NE-MAG-Ft quanto à intensidade, número e volume estão representados na Figura 17. Apesar do diâmetro hidrodinâmico apresentado pelo equipamento como “Z-average”, nas apresentações dos dados pelos diferentes parâmetros (intensidade, número e volume) é possível observar as diferentes populações que compõem a amostra. Tanto em NE como em NE-Ft, foi identificada apenas uma população enquanto que para NE-MAG e para NE-MAG-Ft foram identificadas duas subpopulações, com sua contribuição sendo mais expressiva na análise por intensidade. A presença de ALCIFt nos nanossistemas resultou no aumento do diâmetro hidrodinâmico de NE-Ft e NE-MAG-Ft em relação a NE e NE-MAG, respectivamente em 53% e 20% nos tamanhos identificados por intensidade (NE = 29,17 nm; NE-Ft 44,91 nm; NE-MAG = 241,6 nm; NE-MAG-Ft =

291,4 nm). Foi observado que a população que provavelmente contém as partículas magnéticas NP, tanto em NE-MAG quanto em NE-MAG-Ft, apresentam diâmetro 46% maior do que o encontrado para NP dispersa em água (NP = 164,4 nm; NE-MAG = 241,6 nm; NE-MAG-Ft = 291,4 nm). A verificação de diâmetro hidrodinâmico, potencial Zeta e índice de polidispersividade foi realizado com os nanossistemas recém-sintetizados e após 7 e 14 dias e não foi possível verificar modificação nos parâmetros analisados nesse período. Nanoemulsões novas foram preparadas a cada duas semanas.

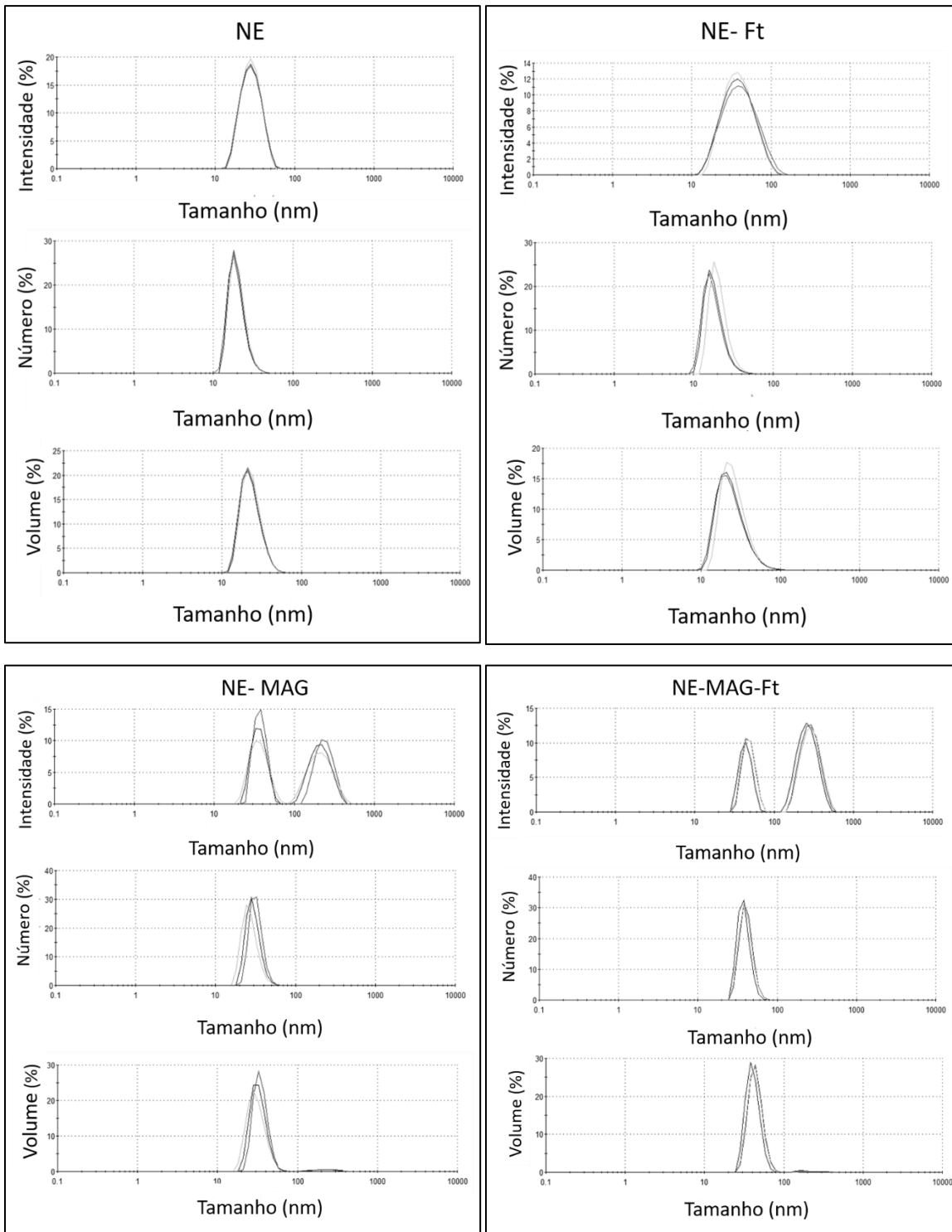


Figura 17. Distribuição do tamanho de populações de NE, NE-Ft, NE-MAG, NE-MAG-Ft quanto à intensidade, número e volume.

Após identificação de duas subpopulações nas nanoemulsões magnéticas, foi realizada a separação magnética por 48 h visando isolar a população que responderia a um campo magnético. Após duas etapas de separações magnéticas, o conteúdo que respondia ao campo magnético apresentava coloração esverdeada indicando a presença tanto de ferro quanto de AlClFt, entretanto o isolamento desta subpopulação resultava em nanossistemas de intensa agregação e precipitação, e o sobrenadante remanescente também apresentava intensa coloração verde (indicando remoção insatisfatória de ferro da solução). Desta forma, escolheu-se não trabalhar com os nanossistemas isolados. A estabilidade visual das nanoemulsões foi observada por duas semanas a 25°C e resultou na identificação de nanoemulsões estáveis, sem precipitados na primeira semana, mas que após 7 dias apresentam acúmulo residual de depósitos marrons em NE-MAG e verdes em NE-MAG-Ft no fundo do frasco.

NP e os nanossistemas desenvolvidos no presente estudo foram estudados por microscopia eletrônica de transmissão. Na eletromicrografia de NP (Figura 18) é possível observar que nanopartículas de aproximadamente 5 nm se organizam em agregados de aproximadamente 120 nm.

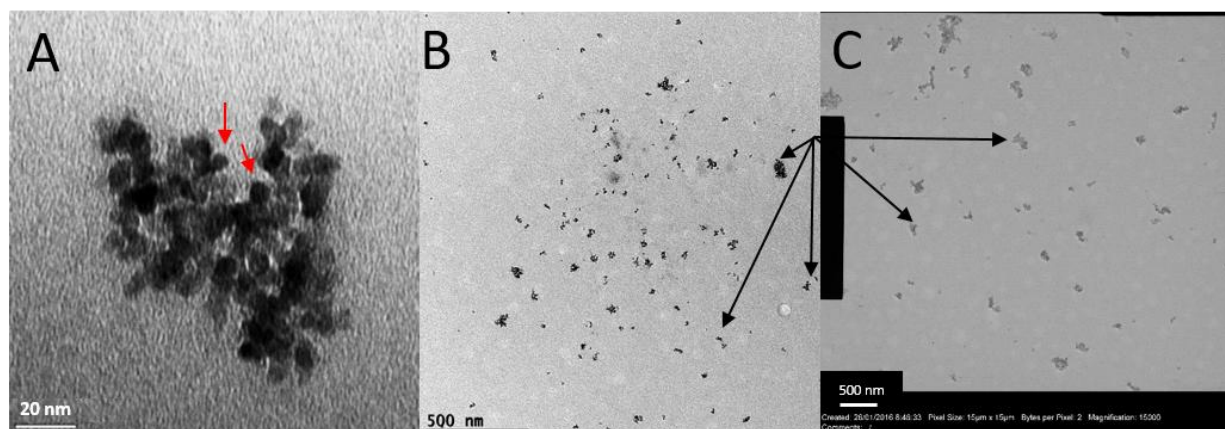


Figura 18. Eletromicrografia de nanopartículas de óxido de ferro (NP). Em A e B amostra preparada por adição direta ao grid. Em C) grid preparado por deposição em eletrospray. Setas vermelhas indicam nanopartículas de ~5 nm obtidas por pirólise a laser. Setas pretas indicam agregados de 50 a 150 nm observados tanto pela adição direta quanto por deposição por eletrospray.

Eletromicrografias da nanoemulsão magnética NE-MAG (Figura 19, “A”) demonstraram imagens parecidas às observadas de NP, exceto que as mesmas apresentaram menor resolução provavelmente pela presença de matéria orgânica sobre as amostras. Os contrastes negativos

acetato de uranila e molibdato de amônio foram utilizados visando observar a estrutura das nanoemulsões previamente aos possíveis efeitos de perda de estrutura decorrentes da secagem (Figura 19, “B” e “C”). Os mesmos artefatos foram observados para o nanossistema NE-MAG-Ft (dados não mostrados).

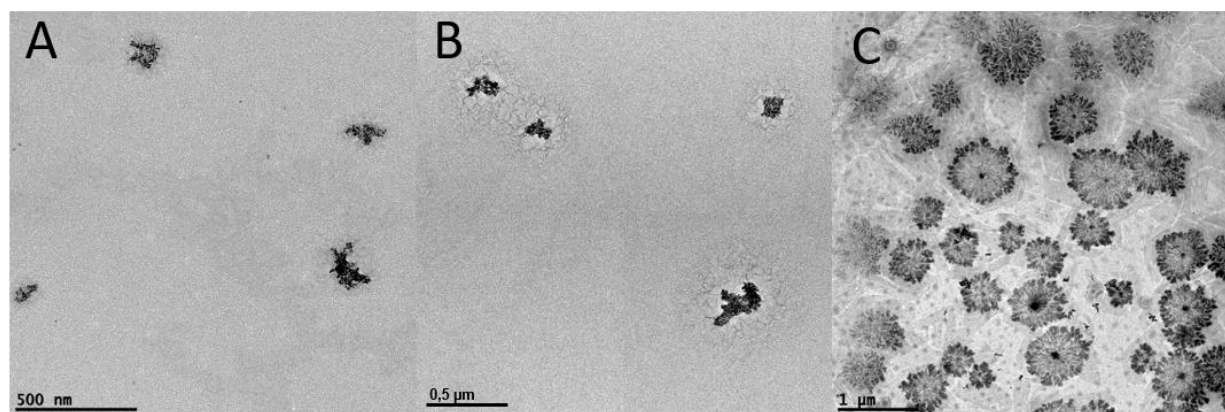


Figura 19. Eletromicrografias de NE-MAG. A = NE-MAG sem contrastação. B = NE-MAG contrastada com 0,05% de acetato de uranila por 30 segundo. C = NE-MAG contrastada com molibdato de amônio 2% por 15 segundos.

A contrastação com acetato de uranila permitiu a visualização de elementos tipo halos circundando as nanopartículas metálicas. Já a contrastação com molibdato de amônio resultou em halos maiores escuros com centros de intensa eletrondensidade. O observado na presença das nanoemulsões magnéticas não foi observado em telas preparadas somente com os agentes contrastantes (telas controle de contrastantes – dados não mostrados).

Em seguida foi utilizada a técnica de crio-microscopia eletrônica de transmissão (crio-MET) visando obter imagens das nanoemulsões com água para evitar a desestruturação decorrentes da desidratação. Na Figura 20 observa-se eletromicrografias de NE, NE-Ft e NE-MAG. Nas imagens de NE Fig. 21 (A), observam-se estruturas circulares de diâmetro que variam entre 25 e 40 nm. Em Fig. 21 (B), nas imagens de NE-Ft são identificados pontos eletrondensos dentro das estruturas circulares que foram identificados como prováveis agregados de AlClFt. Em Fig. 21 (C), imagens de NE-MAG demonstram estruturas que se assemelham as observadas em NE assim como agregados de nanopartículas envoltas em estrutura de mesma eletrondensidade das

gotículas das nanoemulsões. Foi encontrado aproximadamente uma estrutura com partículas magnéticas por imagem adquirida.

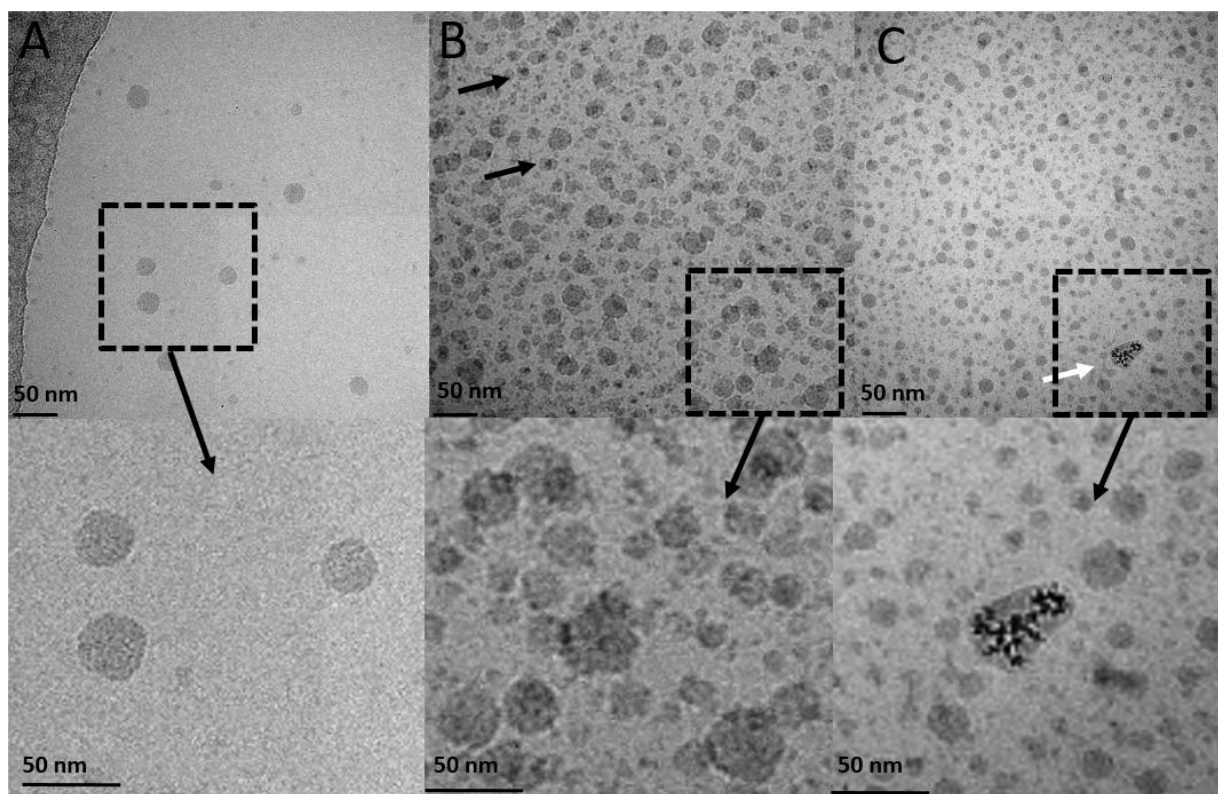


Figura 20. Eletronmicrografias de análise por crio-MET de NE (A), NE-Ft (B) e NE-MAG (C). As setas pretas apontam pontos eletrondensos de NE-Ft e a seta branca aponta nanopartículas eletrondensas.

Também pela técnica de crio-TEM foram analisadas três nanoemulsões que variavam entre si somente pela quantidade de NP utilizadas no seu preparo (0,2, 0,8 e 1,6 mg de NP por mL de nanoemulsão final). Nanopartículas em nanogotículas foram encontradas em todas as amostras NE-MAG testadas; entretanto, na concentração de 1,6 mg de NP foram visualizados grandes agregados de NPs aparentemente não associadas à nanoemulsão (Figura 21). Foi obtido um número restrito de imagens de cada amostra (mínimo de 10 imagens) tanto pela dificuldade de obtenção de áreas adequadamente preservadas quanto pelo alto custo/hora da técnica. Não obstante, é possível que existam nanopartículas livres nas concentrações de 0,2 e de 0,8 mg de NP, mas a não identificação de agregados na concentração de 0,8 mg de NP, resultou no uso desta concentração de NP em todos os nanossistemas utilizados neste estudo.

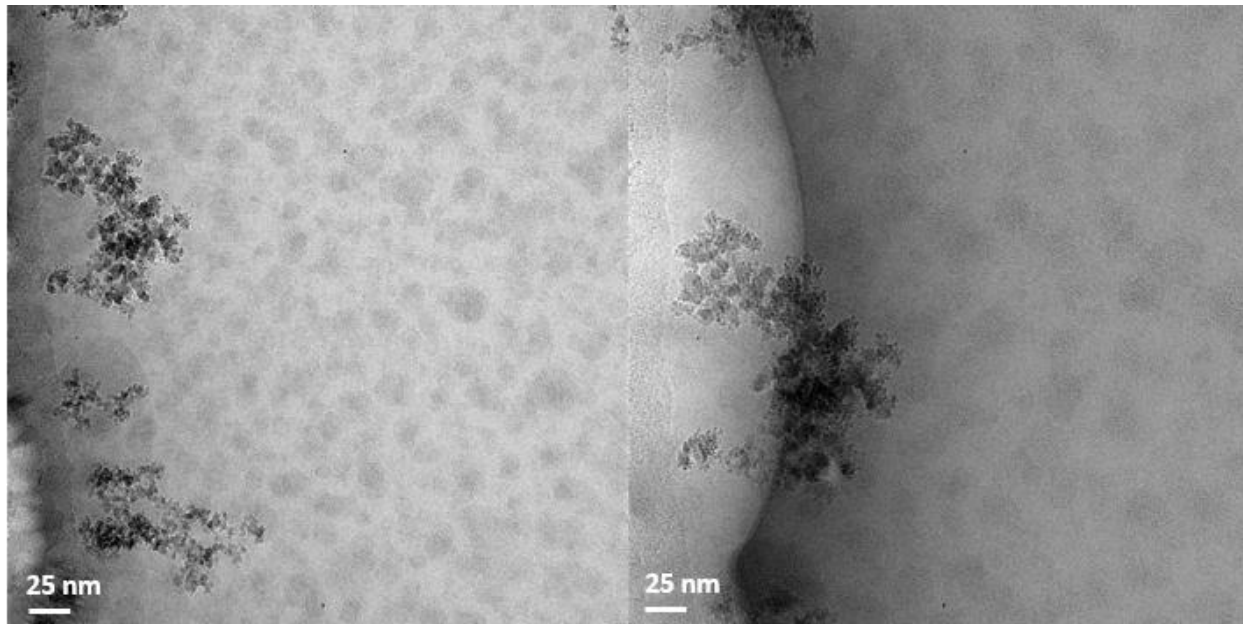


Figura 21. Eletronmicrografias de análise por crio-MET de NE-MAG com 1,6 mg de NP com a identificação de NPs sem o envoltório encontrado na NE-MAG (0,8 mg/mL de NP) utilizado no restante do trabalho.

Pela técnica de microscopia de força atômica foi analisado somente o nanossistema NE-MAG-Ft (Figura 22). Foram identificadas populações de 100-200 nm no eixo x-y e 20-30 nm de altura no eixo z, indicando uma organização mais plana dos agregados de NPs. A análise da rugosidade das regiões identificadas como “1” e “2” na Figura 22 “A”, resultou nos valores 0,77 e 3,62 nm, respectivamente, indicando uma fase mais rugosa nas NPs do que no fundo, composto por provável conteúdo oleosos. Na Figura 22 “B” o perfil da superfície pode ser observado indicando que além de unidades de 100 nm, existem populações rentes a esta de 20 – 50 nm (setas amarelas).

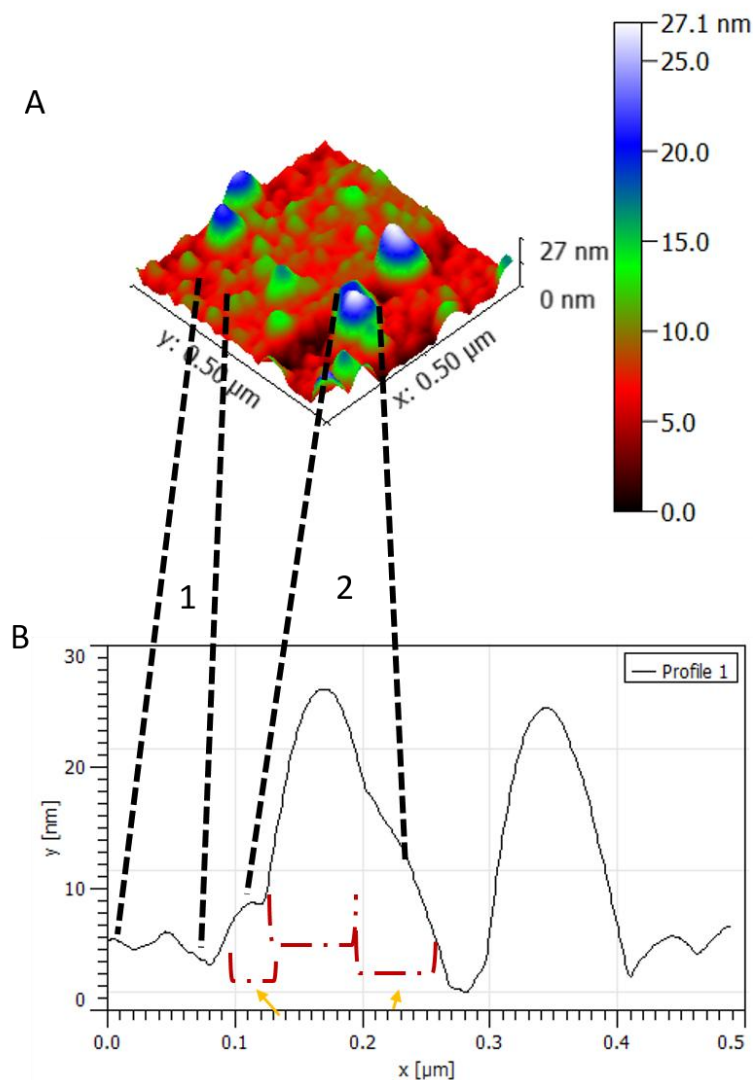


Figura 22. Análise por microscopia de força atômica de relevo de superfície de silício contendo NE-MAG-Ft (A). Em B, perfil de secção da imagem A demonstrado populações de partículas próximas, mas de tamanho diferentes (linhas pontilhadas vermelhas e setas amarelas).

### 3.2 Caracterização fotofísica de NP, NE, NE-Ft, NE-MAG e NE-MAG-Ft

As propriedades ópticas dos nanossistemas foram estudadas pelos espectros de absorção e emissão de luz (Figuras 23 e 24).

Somente os nanossistemas com AICIFt (NE-Ft e NE-MAG-Ft) apresentaram um pico de absorvância em 680 nm, compatível com o observado para AICIFt quando em etanol e ausente para este fotossensibilizante quando em tampão fosfato. Em 610 nm pode ser observado pico de menor intensidade da banda  $Q_1$  de AICIFt em seu estado dimérico. Foi observado que tanto nas



NPs quanto nas nanoemulsões NE-MAG e NE-MAG-Ft houve intensa absorbância na faixa de 350-550 nm. Os nanossistemas NE e NE-MAG não apresentam absorção na faixa de AICIFt.

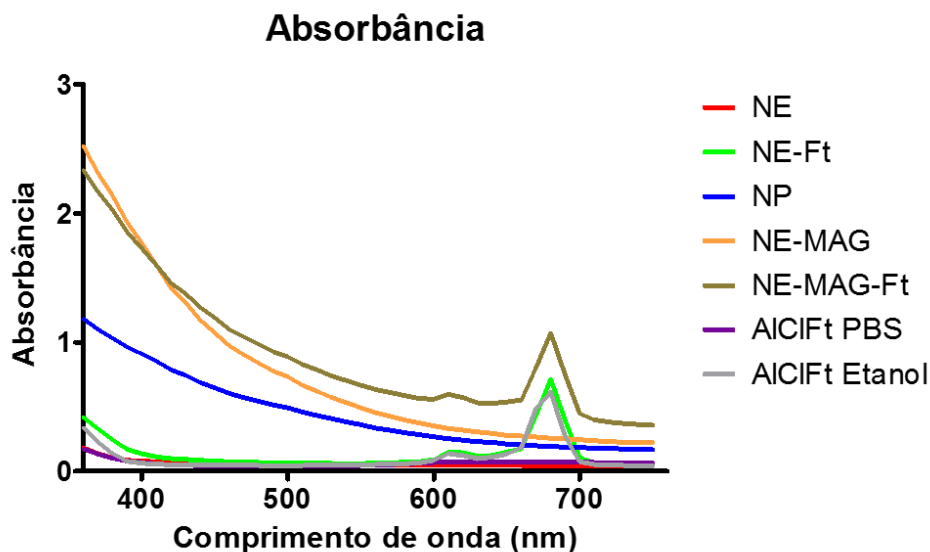


Figura 23. Espectro de absorbância de NE, NE-Ft, NP, NE-MAG e NE-MAG-Ft diluídos 4x em água (concentração de AICIFt em NE-Ft e NE-MAG-Ft, PBS e Etanol de 5,75  $\mu\text{g/mL}$ ). Espectro de 360 a 750 nm.

A análise de espectro de emissão de fluorescência dos nanossistemas (Figura 24) demonstra que AICIFt tem deslocamento do pico de emissão máximo de 680 nm em etanol para 690 nm em NE-Ft e NE-MAG-Ft. Não é observado emissão de AICIFt em tampão fosfato (PBS). NE e NE-MAG não apresentam emissão em 690 nm e o pico observado em 710 nm nos espectros de fluorescência é decorrente do comprimento de onda utilizado na excitação (difração de segunda ordem).

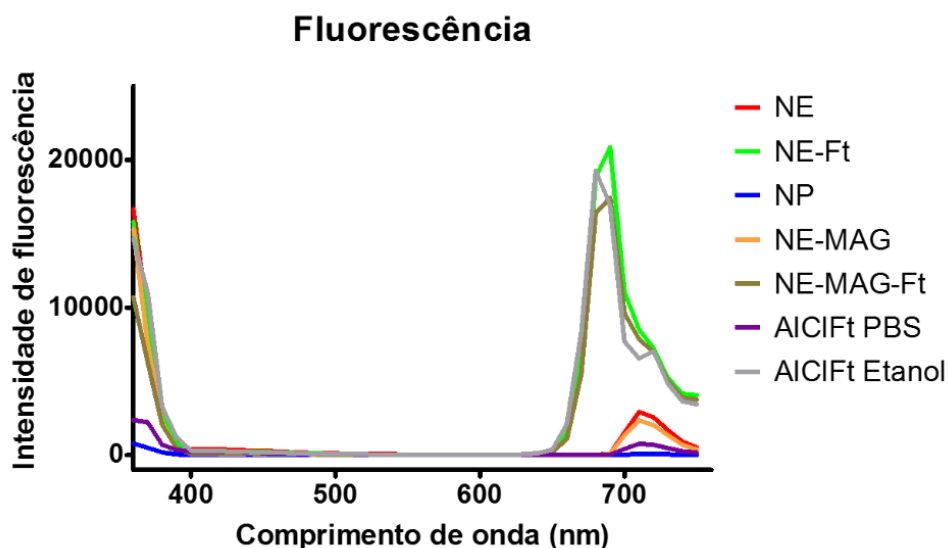


Figura 24. Espectro de fluorescência de NE, NE-Ft, NP, NE-MAG e NE-MAG-Ft diluídos 4x em água (concentração de AICIFt em NE-Ft e NE-MAG-Ft, PBS e Etanol de 5,75  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Excitação a 350 nm e aquisição de espectro de emissão de 360 a 750 nm.

### 3.3 Geração de oxigênio singleto de nanossistemas

Em seguida, foi verificado se os nanossistemas apresentavam capacidade de gerar espécies reativas de oxigênio devido à presença do fotossensibilizante AICIFt, quando irradiados com LED de 660 nm. Para isso, foi utilizada a sonda de oxigênio singleto 1,3-difenil- isobenzofurano (DBF), que sofre degradação quando exposta ao fotossensibilizante ativado pela luz. Como os nanossistemas puros possuem alta absorção a 410 nm, foram diluídos 32x e em seguida foram expostos ao DBF, irradiados e a absorbância foi registrada (Figura 25).

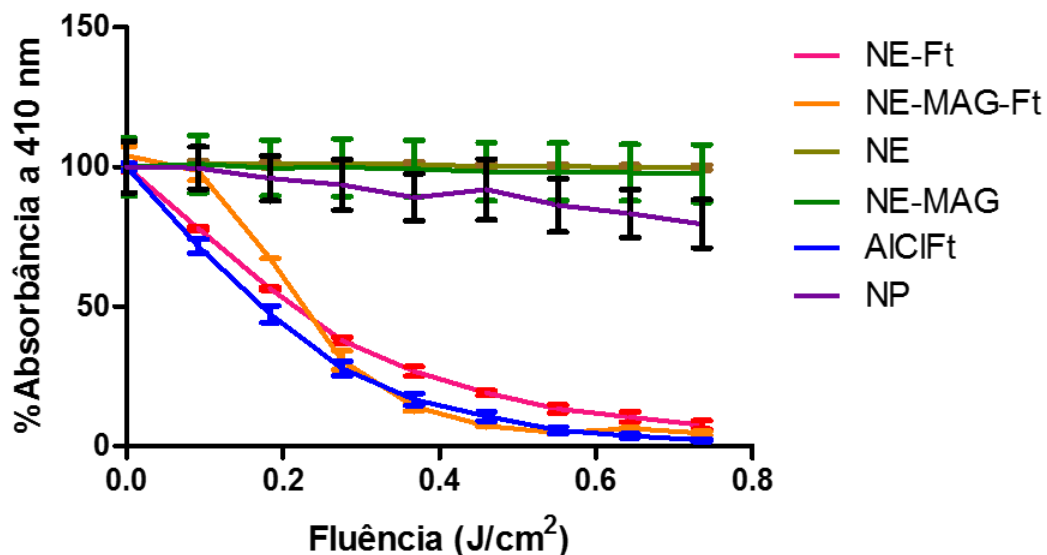


Figura 25. Absorbância a 410 nm normalizada por teor inicial de DBF exposto aos nanossistemas NE, NE-Ft, NP, NE-MAG, NE-MAG-Ft e irradiados com LED a 660nm com sessões de irradiação de 0,092 J/cm<sup>2</sup>. Nanossistemas foram diluídos 32x, resultando na concentração de AICIFt nos nanossistemas NE-Ft e NE-MAG-Ft de 0,7 µg/mL. AICIFt= AICIFt em etanol 0,7 µg/mL.

Na Figura 25 observa-se que NE-Ft, NE-MAG-Ft e AICIFt, todos com a mesma concentração de AICIFt, levam à degradação de DBF quando irradiados. Não foi observada diferença estatística entre NE-Ft, NE-MAG-Ft e AICIFt, exceto na fluência de 0,092 J/cm<sup>2</sup> onde foi observada diferença estatística significativa ( $p < 0,001$ ), em que NE-MAG-Ft degradou menos DBF do que NE-Ft e AICIFt. Já em NE, NE-MAG e NP não é observado degradação significativa de DBF e não pode ser observada diferença estatística significativa entre o efeito dos três nanossistemas, não obstante, em NP, NE-MAG e NE foi observada diminuição da absorbância de DBF em 20, 3 e 0,7%, respectivamente, no tempo total do ensaio.

### 3.4 Caracterização magnética de NE-MAG e NE-MAG-Ft

NE-MAG e NE-MAG-Ft foram caracterizados quanto à sua magnetização quando sujeito a campo magnético externo (Figura 26), e os resultados confirmaram a propriedade magnética das amostras. Em A, se observa faixa do campo de 4 T aplicado às amostras ( $\pm 0,5$  T) e há indicação de maior concentração de ferro em NE-MAG e em segundo lugar NE-MAG-Ft. Ao corrigir o sinal diamagnético e normalizar por sinal  $\pm 1$  foi obtida a magnetização relativa (B) que indica que NE-

MAG apresenta partículas de menor tamanho ou mais isoladas. Para obtenção de curva de magnetização normalizada pela concentração de ferro (C) as amostras foram digeridas com ácido nítrico:ácido clorídrico, 1:1 (v:v) e o teor de ferro foi quantificado por espectrometria de massa por plasma acoplado e indica maior magnetização de NE-MAG-Ft em relação à NE-MAG por g de ferro.

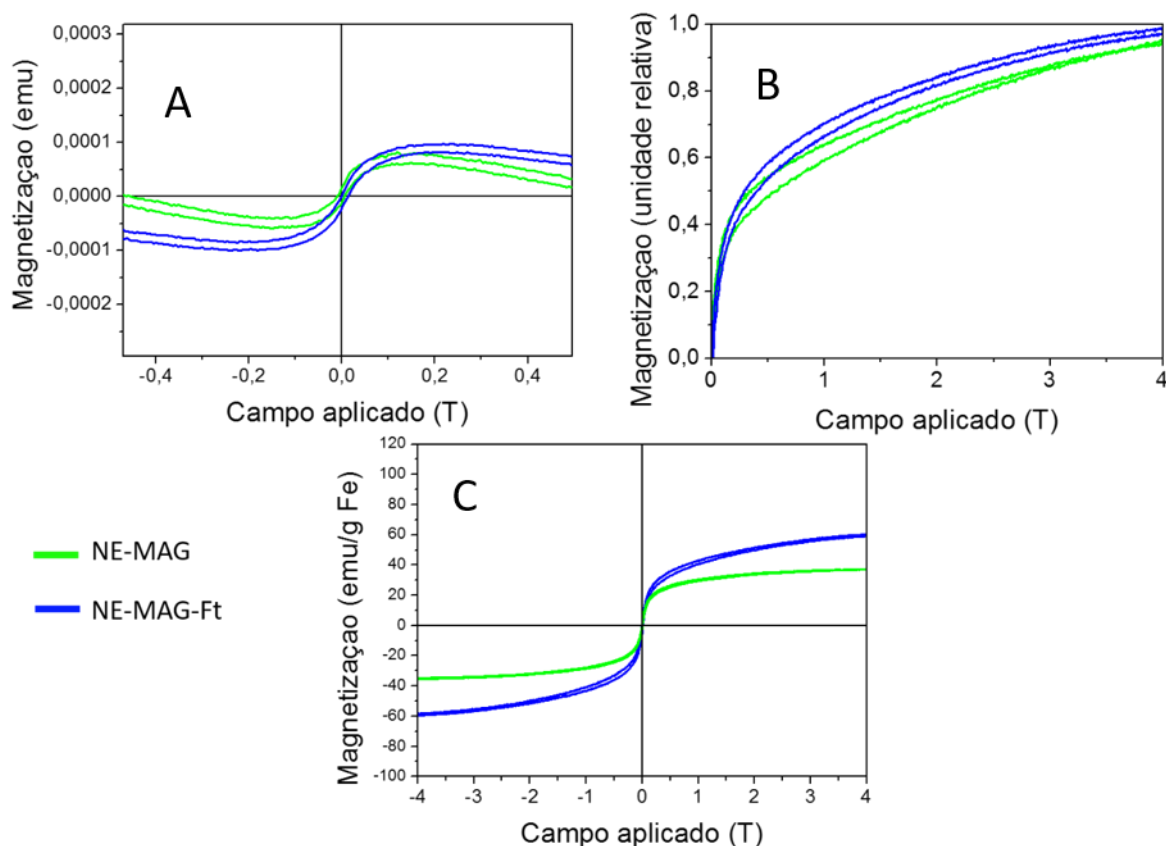


Figura 26. Curva de magnetização de NE-MAG e NE-MAG-Ft após aplicação de campo magnético. A: Curva de magnetização (região de  $\pm 0,5$  T de curva de total de  $\pm 4$  T). B: Curva de magnetização relativa após correção do sinal diamagnético e normalização do sinal para  $\pm 1$ . C: Curva de magnetização após normalização por concentração de ferro.

Foi identificado para NE-MAG e NE-MAG-Ft valores de saturação magnética de 36,6 e 47,7 emu/g de ferro, respectivamente.

### 3.5 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier de NP, NE-MAG e NE-MAG-Ft

Pela técnica de espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier foi estudada a estrutura das ligações químicas presentes tanto nos componentes isolados utilizados no preparo dos nanossistemas, quanto nos nanossistemas preparados (Figura 27).

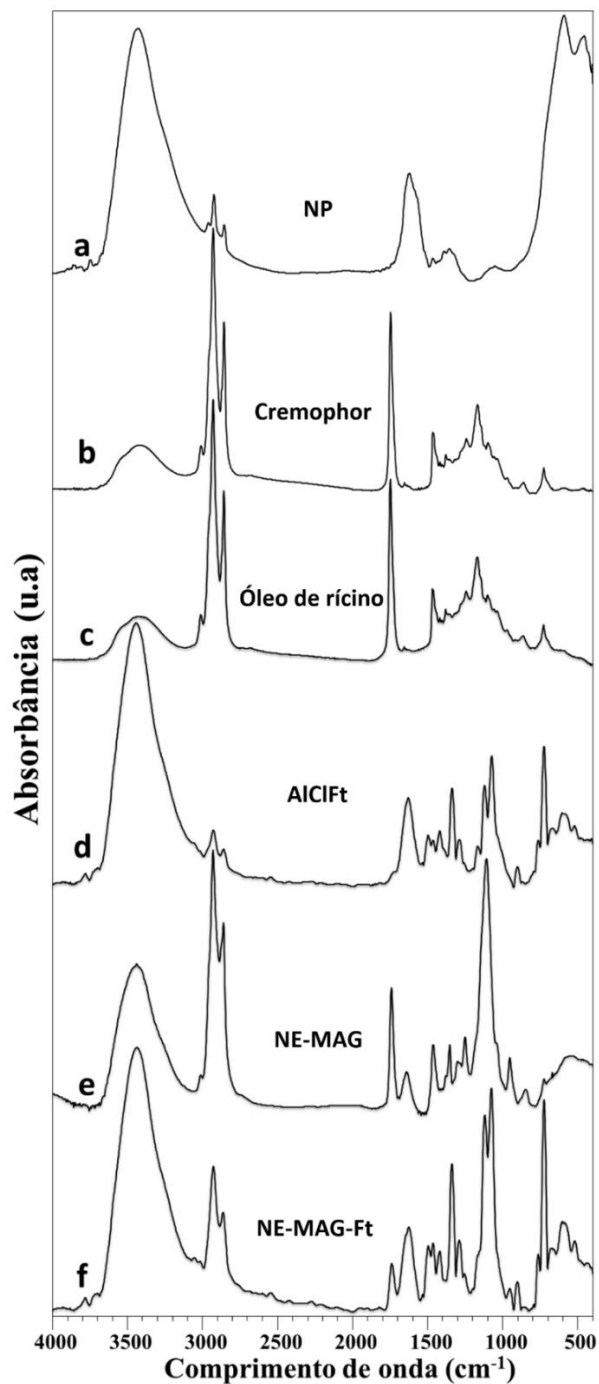


Figura 27. Espectros de espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier dos componentes utilizados nos nanossistemas e dos nanossistemas finais NE-MAG e NE-MAG-Ft.

No espectro de NP, observam-se os estiramentos em  $3423\text{ cm}^{-1}$  correspondente a ligação O-H do FeOH; em  $2919\text{-}2847\text{ cm}^{-1}$  há o estiramento C-H atribuído do carbono, contaminante gerado durante a síntese; em  $1612\text{ cm}^{-1}$  observa-se estiramento relacionado à presença de água estrutural; em  $1355\text{ cm}^{-1}$  referente a vibração do monômero O-H do grupo hidroxil também proveniente da estrutura do FeOH; em  $586$  e  $455\text{ cm}^{-1}$  há os estiramentos atribuídas a ligação Fe-O das fases  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  e  $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ , respectivamente.

Para o surfactante cremophor observam-se as bandas em  $3438\text{ cm}^{-1}$  referente à ligação –OH da água absorvida, em  $2925\text{-}2859\text{ cm}^{-1}$  referente à ligação C-H alifática, em  $1733\text{ cm}^{-1}$  referente à ligação C=O do grupo carboxílico; em  $1457\text{ cm}^{-1}$  referente à deformação da vibração assimétrica do  $\text{CH}_2$ ; em  $1349\text{ cm}^{-1}$  referente à vibração assimétrica do  $\text{CH}_3$ ; em  $1249\text{ cm}^{-1}$  referente à ligação C-O; em  $1112\text{ cm}^{-1}$  referente à ligação C-O-C; em  $950\text{ cm}^{-1}$  referente à ligação O-H devido à deformação angular fora do plano do C=O do ácido carboxílico e em  $725\text{ cm}^{-1}$  se observa estiramento que indica a presença da ligação CH fora do plano.

No espectro do óleo de rícino há os estiramentos em  $3426\text{ cm}^{-1}$  referente à ligação –OH da água absorvida, em  $3008\text{ cm}^{-1}$  que indica as duplas ligações em moléculas do óleo; em  $2927\text{-}2854\text{ cm}^{-1}$  referente à ligação C-H alifáticos; em  $1745\text{ cm}^{-1}$  referente à ligação C=O atribuída ao grupo éster de moléculas; em  $1454\text{ cm}^{-1}$  referente à deformação da vibração assimétrica do  $\text{CH}_2$ ; em  $1376\text{ cm}^{-1}$  referente à vibração simétrica do  $\text{CH}_3$ ; em  $1241\text{-}1099\text{ cm}^{-1}$  referente à ligação C-O e em  $725\text{ cm}^{-1}$  que indica a presença da ligação CH fora do plano.

As principais banda observadas para a AICIFt estão em  $3436\text{ cm}^{-1}$  referente ao estiramento da ligação –OH da água absorvida; em  $2923\text{-}2852\text{ cm}^{-1}$  referente ao estiramento C-H; em  $1631\text{ cm}^{-1}$  referente à ligação C=C, em  $1499\text{-}1463\text{ cm}^{-1}$  referente à vibração do estiramento C=N;  $1421\text{ cm}^{-1}$  referente à deformação da vibração assimétrica do C-H do anel aromático; em  $1334\text{ cm}^{-1}$  referente à ligação C-C de aromáticos; em  $1288\text{ cm}^{-1}$  há o estiramento da ligação C-N, em  $1164\text{ cm}^{-1}$  aparece o estiramento atribuído à vibração C-C, em  $1120\text{ cm}^{-1}$  há a deformação fora do plano da vibração =C-H do anéis aromáticos, em  $1071\text{ cm}^{-1}$  há a vibração do estiramento C-N; em  $902\text{ cm}^{-1}$  há a banda característica de metaloftalocianinas e em  $759\text{-}723\text{ cm}^{-1}$  referente ao anel aromático.

O espectro da NE-MAG apresenta uma banda em  $3436\text{ cm}^{-1}$  correspondente ao estiramento O-H do FeOH; em  $2927\text{-}2858\text{ cm}^{-1}$  referente à ao C-H; em  $1737\text{ cm}^{-1}$  referente à

ligação C=O do grupo éster provenientes do surfactante e do óleo de rícino; em  $1641\text{ cm}^{-1}$  relacionado à presença de água estrutural; em  $1249\text{ cm}^{-1}$  há à vibração C-O; em  $1107\text{ cm}^{-1}$  referente à ligação C-O-C; em  $952\text{ cm}^{-1}$  referente a ligação O-H devido à deformação angular fora do plano do C=O do grupo éster proveniente do surfactante; em  $726\text{ cm}^{-1}$  indica a presença da ligação CH fora do plano e  $582\text{ cm}^{-1}$  há o estiramento atribuído a ligação Fe-O da fase  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ .

Já no espectro de NE-MAG-Ft observa-se bandas em  $3463\text{ cm}^{-1}$  atribuída à ligação O-H do FeOH; em  $2925\text{-}2854\text{ cm}^{-1}$  referente ao C-H; em  $1737\text{ cm}^{-1}$  referente à ligação C=O do grupo éster presente no óleo de rícino e no surfactante; em  $1641\text{ cm}^{-1}$  relacionado à presença de água estrutural; em  $1499\text{-}1463\text{ cm}^{-1}$  aparece a vibração do estiramento C=N; em  $1421\text{ cm}^{-1}$  há a deformação da vibração assimétrica do C-H do anel aromático; em  $1334\text{ cm}^{-1}$  há a vibração do C-C do anel aromáticos; em  $1288\text{ cm}^{-1}$  observa-se o estiramento da ligação C-N, em  $1249\text{ cm}^{-1}$  referente à ligação C-O; em  $1164\text{ cm}^{-1}$  aparece o estiramento atribuído à vibração C-C, em  $1120\text{ cm}^{-1}$  há a deformação no plano da vibração =C-H de aromáticos; em  $1071\text{ cm}^{-1}$  há a vibração C-N, em  $952\text{ cm}^{-1}$  referente a ligação -O-H devido à deformação angular fora do plano do C=O de éster, em  $902\text{ cm}^{-1}$  há o sinal da banda característica de metaloftalocianinas, em  $759\text{-}723\text{ cm}^{-1}$  referente ao anel aromático, em  $669\text{ cm}^{-1}$  aparece a deformação da vibração C-H fora do plano, e em  $554$  e  $520\text{ cm}^{-1}$  há os estiramentos atribuídos ao Fe-O das fases  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  e  $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ , respectivamente presentes na NP. A partir disto, verifica-se que o espectro da NE-MAG-Ft apresenta contribuições da NE-MAG e da AICIFt.

### **3.6 Caracterização de contaminação biológica de NE, NE-Ft, NE-MAG, NE-MAG-Ft**

Para verificação possível de contaminação biológica dos nanossistemas, os mesmos foram incubados com (1) meio de cultivo DMEM, (2) DMEM suplementado com soro fetal e antibiótico, (3) apenas soro fetal bovino, ou (4) tampão fosfato, na concentração sempre de 1% (v:v) do volume total por poço de placa de 24 poços, e em nenhuma das condições citadas foi possível verificar aumento de turbidez ou visualizar microrganismos em microscópio invertido, após observação diária por uma semana. Foi observada maior turbidez para os poços contendo NP, NE-MAG e NE-MAG-Ft assim que foram adicionados às condições citadas devido à turbidez natural desses nanossistemas.

### 3.7 Exposição de nanossistemas NP, NE, NE-Ft, NE-MAG e NE-MAG-Ft a células de adenocarcinoma pulmonar humano e macrófago murino

Os nanossistemas utilizados no presente estudo apresentam concentrações equivalentes dos componentes quando presentes, mas não possuem sempre os mesmos componentes. Portanto, para apresentação de dados dos nanossistemas em conjunto, foi utilizado o fator de diluição de forma que os componentes mantivessem sempre as mesmas concentrações nos diversos nanossistemas. Exemplificando, 25% dos nanossistemas, representa condição em que nanossistemas foram diluídos 4x em meio de cultivo.

Na Figura 28 observa-se a viabilidade das células A549 e RAW 264,7 após 24 h de exposição aos nanossistemas.

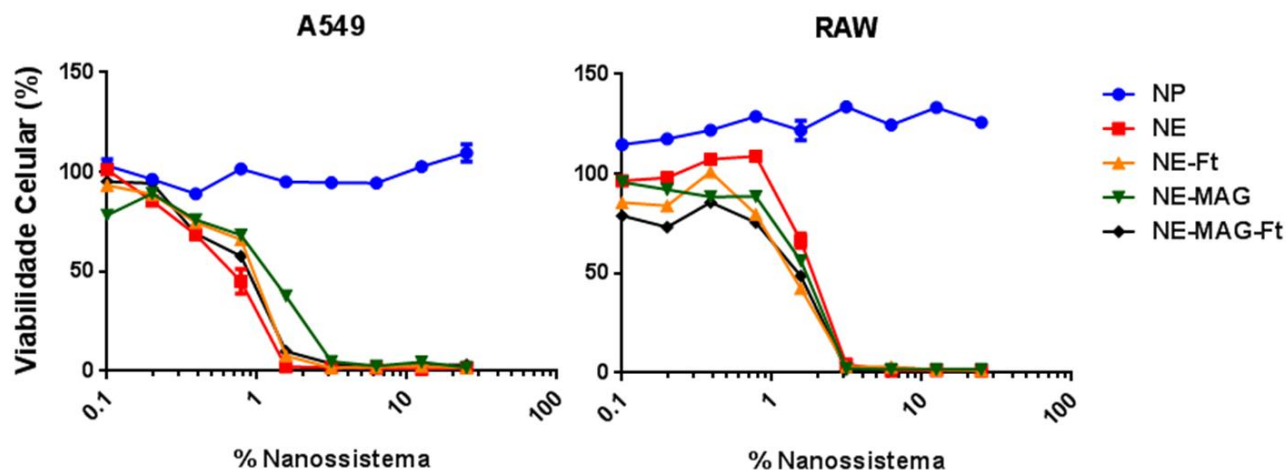


Figura 28. Viabilidade celular das células A549 e RAW 264,7 após exposição por 24 h a diluição seriada dos nanossistemas NP, NE, NE-Ft, NE-MAG e NE-MAG-Ft.

Para as células A549 foi observada diferença estatística ( $p < 0,05$ ) entre as células não tratadas (controle) e as células tratadas com NP somente nas concentrações 0,39% e 25%. Já para o tratamento com os demais nanossistemas, há diferença estatística ( $p < 0,001$ ) entre as células não-tratadas e as concentrações a partir de 0,2% (0,2 – 25%).

Para as células RAW 264,7 há diferença estatística ( $p < 0,001$ ) entre as células não tratadas e as tratadas com NP em todas as concentrações testadas, como também há diferença estatística ( $p < 0,001$ ) entre as células não tratadas e tratadas com NE a partir da concentração 1,56% (1,56% – 25%). Há diferença estatística ( $p < 0,001$ ) entre as células não tratadas e tratadas com NE-Ft em todas as concentrações exceto 0,39%. Há diferença estatística ( $p < 0,001$ ) entre as células não



tratadas e tratadas com NE-MAG a partir da concentração de 0,2% (0,2-25%). Há diferença estatística ( $p < 0,001$ ) entre as células não tratadas e as tratadas com NE-MAG-Ft em todas as concentrações testadas.

Em resumo, estudo da citotoxicidade dos nanossistemas às células A549 e RAW 264,7 mostrou que as NPs não foram citotóxicas para ambas linhagens celulares em nenhuma das concentrações testadas. Na célula RAW264,7 o tratamento com NP aumentou a viabilidade celular em todas as concentrações testadas. Para os demais nanossistemas, houve redução em 100% da viabilidade das células em concentrações maiores que 3%.

As células A549 foram mais sensíveis do que as células RAW 264,7 à exposição dos nanossistemas uma vez que as concentrações citotóxicas que reduziram em 50% a viabilidade celular (CC50) foram mais altas para RAW 264,7 (Tabela 11).

Tabela 11. Concentrações citotóxica (CC50) de NP, NE, NE-Ft, NE-MAG e NE-MAG-Ft que reduzem em 50% a viabilidade das células A549 e RAW 264,7 após 24 h de exposição.

	<b>NP</b>	<b>NE</b>	<b>NE-Ft</b>	<b>NE-MAG</b>	<b>NE-MAG-Ft</b>
<b>A549</b>	Não definido	0,61 %	0,83 %	1,02 %	0,74 %
<b>RAW 264,7</b>	Não definido	1,74 %	1,36 %	1,63 %	1,25 %

A concentração de 0,78% de NE-Ft e NE-MAG-Ft no meio de cultivo das células foi a condição escolhida para realizar os estudos de citometria e microscopia confocal uma vez que nesta condição a diminuição da viabilidade não será maior do que 50% nos tempos curtos de exposição que foram estudados (até 2 h). A concentração de AICIFt nesta diluição de NE-Ft e NE-MAG-Ft é de 0,18  $\mu\text{g/mL}$ .

Testes com nanossistemas produzidos há mais de 30 dias e mantidos a temperatura ambiente demonstraram aumento da toxicidade de NE-MAG, NE-MAG-Ft e NP em 15% em relação aos nanossistemas recém-sintetizados ou às nanoemulsões NE e NE-Ft após 30 dias de preparo. O mesmo não foi observado para nanossistemas testados até 14 dias após o seu preparo e por esse motivo nanossistemas foram produzidos a cada 14 dias.

A quantificação da fluorescência de AICIFt nas células A549 e RAW 264,7 após exposição de até 2 h de NE-Ft e NE-MAG-Ft, foi realizada por citometria de fluxo (Figura 29). Foi observado que

a intensidade do sinal de AICIFt em A549 foi maior por célula do que o observado para RAW 264,7, chegando a ter 5x mais sinal do que RAW no tempo de 2 h. Enquanto A549 apresenta um platô de aproximadamente 50% da captação nos tempos de 30 a 60 min e um aumento significativo a 120 min ( $p>0,001$ ), RAW 264,7, a partir de 30 min já apresenta ~90% do sinal total detectado nas 2 h do ensaio.

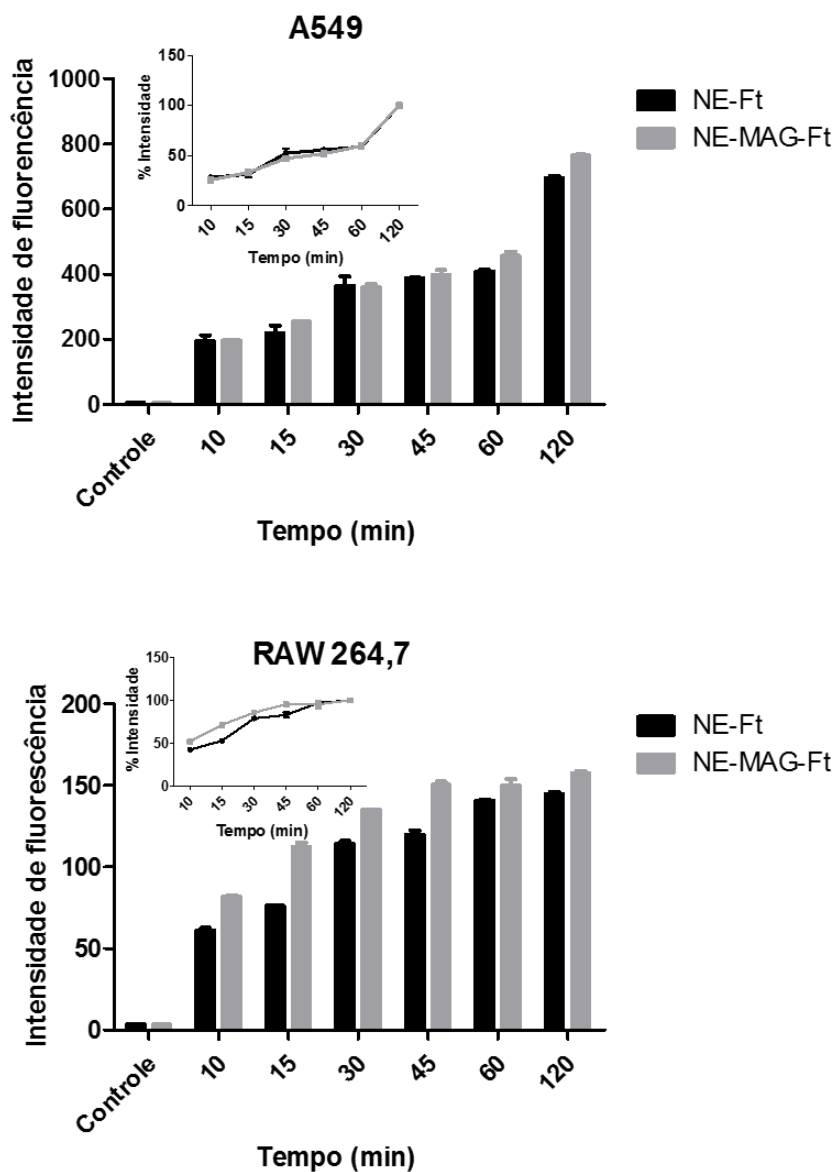


Figura 29. Análise por citometria de fluxo de captação de AICIFt pelas células A549 e RAW 264,7 após exposição a NE-Ft e NE-MAG-Ft. Em detalhe interno nos gráficos, se observa representação da normalização pelo tempo total de 2 h de análise.

O estudo do tamanho e granulosidade das células tratadas com NE-Ft e NE-MAG-Ft por citometria de fluxo não identificou mudanças associadas à incorporação dos nanossistemas.

Por microscopia confocal as células foram expostas por 15 min a NE-Ft e NE-MAG-Ft (Figura 30). Não foi observada diferença entre a localização da fluorescência de AIClFt entre as células testadas, sendo identificada somente no citoplasma das células, com maior intensidade na região perinuclear. A intensidade da fluorescência identificada em A549 foi maior e mais espalhada no citoplasma do que a encontrada nas células RAW 264,7. Foram observados pontos escuros nas células tratadas com NE-MAG-Ft que não apresentaram fluorescência detectável no canal utilizado para AIClFt.

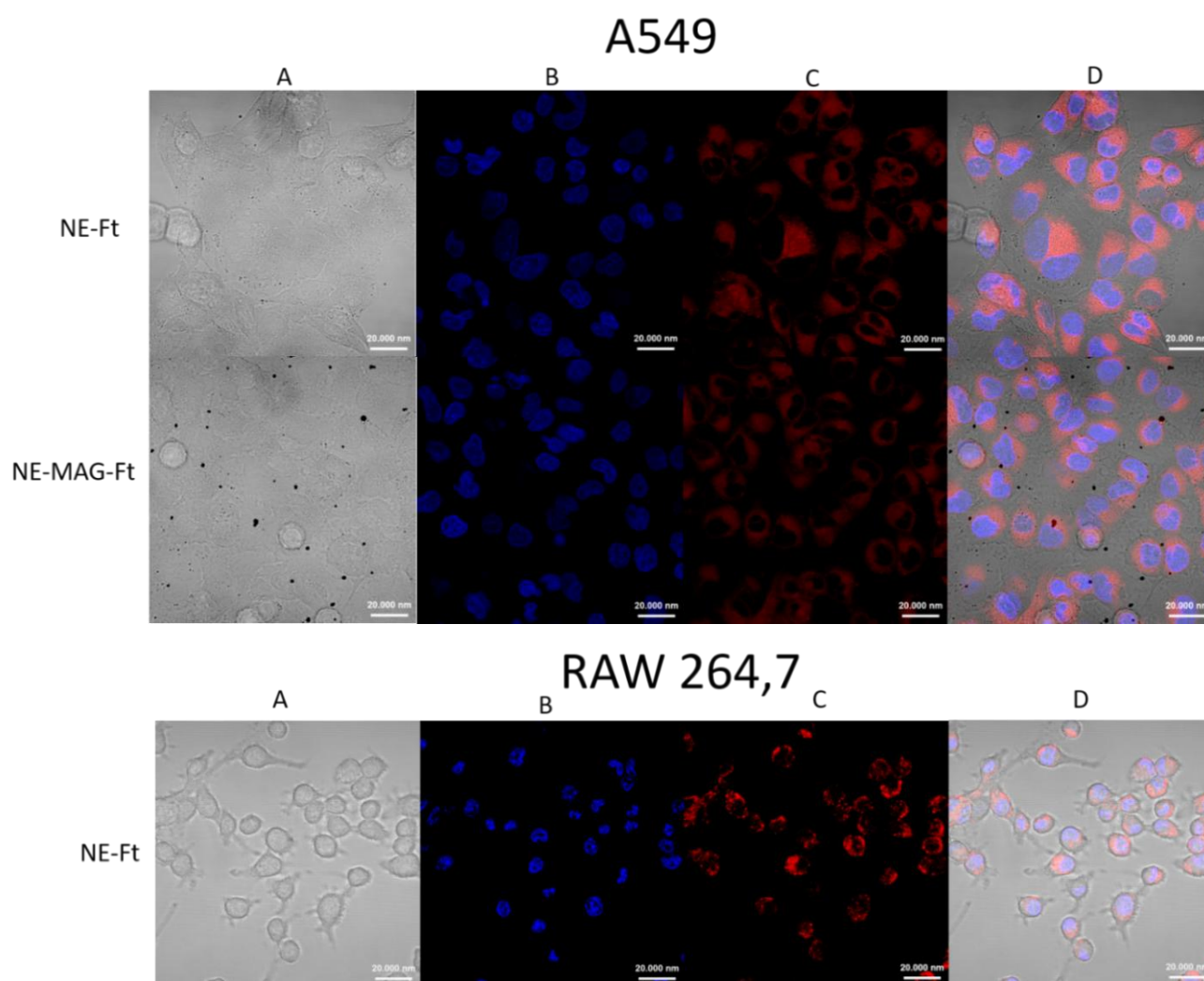


Figura 30. Fotomicrografia confocal de células A549 e RAW 264,7 incubadas com NE- Ft e NE-MAG-Ft por 15 min. Concentração de AIClFt em ambos os nanossistemas é de 0,18  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . A) Campo claro; B) Marcação de ADN com DAPI C) Fluorescência de AIClFt; D) Sobreposição das imagens. Todas as barras de escala representam 20  $\mu\text{m}$ .

Terapia fotodinâmica de células expostas a NE-Ft e NE-MAG-Ft por 15 min demonstrou efetividade terapêutica dos nanossistemas com o uso de LED de 660 nm (Figura 31). O CC50 obtido pode ser observado na Tabela 12. Em ambas as células tratadas todas as concentrações testadas de NE-Ft e NE-MAG-Ft tiveram diferença estatística em relação ao controle ( $p < 0,001$ ). Na célula A549, não foi observada diferença estatística entre os dois nanossistemas em todas as concentrações testadas. Já para a célula RAW 264,7, foi encontrada diferença estatística entre os tratamentos dos nanossistemas na concentração 0,006% com NE-MAG-Ft sendo mais eficiente do que NE-Ft ( $p < 0,001$ ).

Para verificação da toxicidade no escuro no tempo de ensaio da terapia fotodinâmica, as células foram incubadas com os nanossistemas também por 15 min, em seguida mantidas no escuro pelo mesmo tempo das placas que foram irradiadas com LED (18 min). Não foi observada diminuição da viabilidade celular de ambas as células após 24 h quando não tratadas com LED 660 nm (Figura 31).

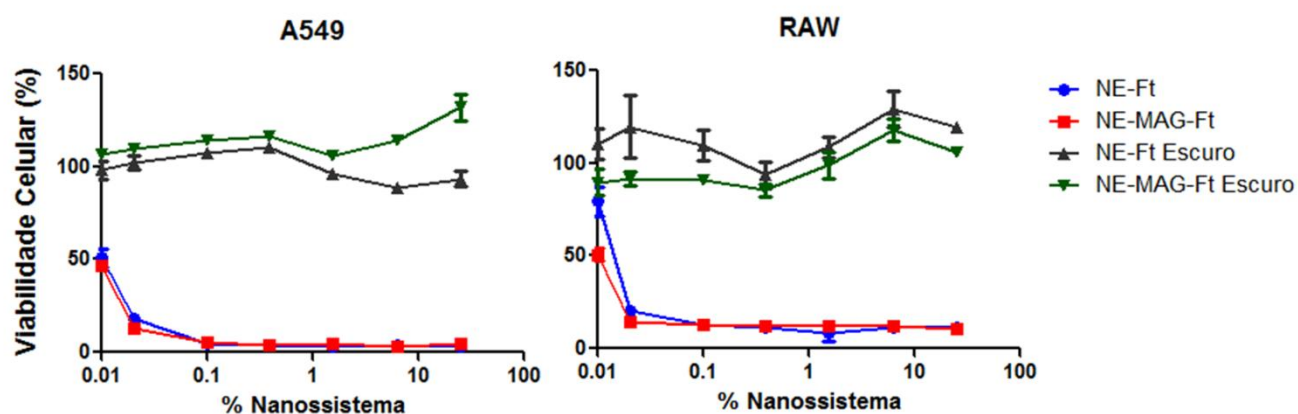


Figura 31. Viabilidade de células A549 e RAW 264,7 após exposição à diluição seriada de NE-Ft e NE-MAG-Ft por 15 min e em seguida, tratadas com LED de 660 nm (fluência de 25,3 J/cm<sup>2</sup>) ou mantidas no escuro após exposição.

O cálculo da CC50 para as células tratadas como terapia fotodinâmica pode ser observada na Tabela 12.

Tabela 12. CC50 de A549 e RAW 264,7 após terapia fotodinâmica com NE-Ft e NE-MAG-Ft. Entre parênteses equivalência de AClFt presente na % de nanossistema utilizada expressa em ng/mL e nM.

	<b>% de NE-Ft em cultivo de cultivo</b>	<b>% de NE-MAG-Ft em meio de cultivo</b>
<b>A549</b>	0,0102% (0,023 ng/mL- 0,04 nM)	0,0094% (0,022 ng/mL- 0,04 nM)
<b>RAW 264,7</b>	0,0142% (0,033 ng/mL- 0,06 nM)	0,0014% (0,003 ng/mL- 0,01 nM)

### 3.8 Estudos *in vivo*

#### 3.8.1 Radiomarcção de NP para uso em tomografia computadorizada por emissão de fóton único

A melhor condição para a marcação de NP com Ga-67 foi estabelecida como sendo a incubação de NP (na concentração mínima de 30 mM de ferro) com Ga-67 por 30 min a 70°C e com tampão acetato de sódio na concentração de 0,05M. Somente nesta condição se obteve marcação e recuperação de NP com pelo menos 93% de eficiência. A condição mais importante para melhor recuperação, foi o estabelecimento da concentração mínima de NP uma vez que ocorre perda de NP aderida ao sistema de ultrafiltração e esta perda se mostra menos significativa com mais NP na reação. NP-Ga-67 produzidas na condição descrita foram mantidas em ambiente chumbado até o decaimento da atividade para valores abaixo do limite para o seu manuseio sem risco e foram analisadas quanto à forma por microscopia eletrônica de transmissão e por dispersão dinâmica de luz, e quanto à carga por mobilidade eletroforética. Não foi observado diferença entre NP-Ga-67 e as propriedades já descritas de NP neste trabalho.

Foi verificada a estabilidade da marcação de NP com Ga-67 em tampão fosfato, pH 7,2 assim como após sua incorporação na nanoemulsão magnética NE-MAG-Ft. Nas 48 h de estudo da estabilidade da marcação de NP em tampão fosfato, 99% do gálio foi encontrado associado ao nanossistema em todos os tempos estudados. Já após sofrer incorporação em nanoemulsão magnética, foi observado que pelo menos 94% do gálio se manteve ligado ao nanossistema NE-MAG-Ft durante todos os tempos estudados (Figura 32).

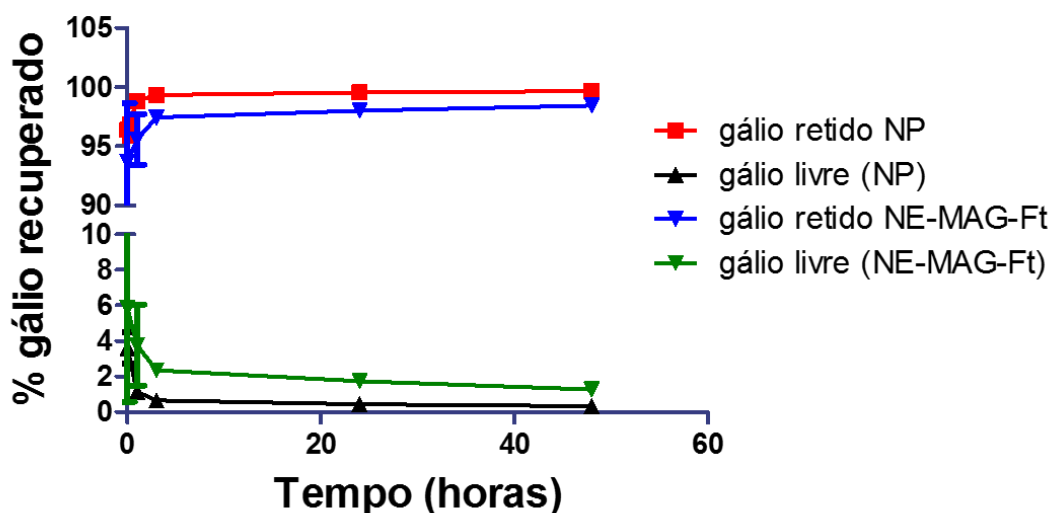


Figura 32. Estabilidade de gálio-67 após incorporação em NP e em NE-MAG-Ft por 48 h.

Com a alta eficiência de ligação e após confirmação que o gálio inicialmente associado a NP se mantém ligado em condição fisiológica por até 48 h, os nanossistemas NP-Ga-67 e NE-MAG-Ft-Ga-67 foram utilizados para o estudo de biodistribuição em camundongos machos saudáveis da linhagem C57BL/6 (Figura 33).

As formulações foram injetadas por via endovenosa em dois animais para cada um dos nanossistemas testados, NP e NE-MAG-Ft, e as imagens de emissão de fóton único decorrente da interação com a radiação gamma foram obtidas nos tempos de 2, 22, 48 e 72 h após administração.

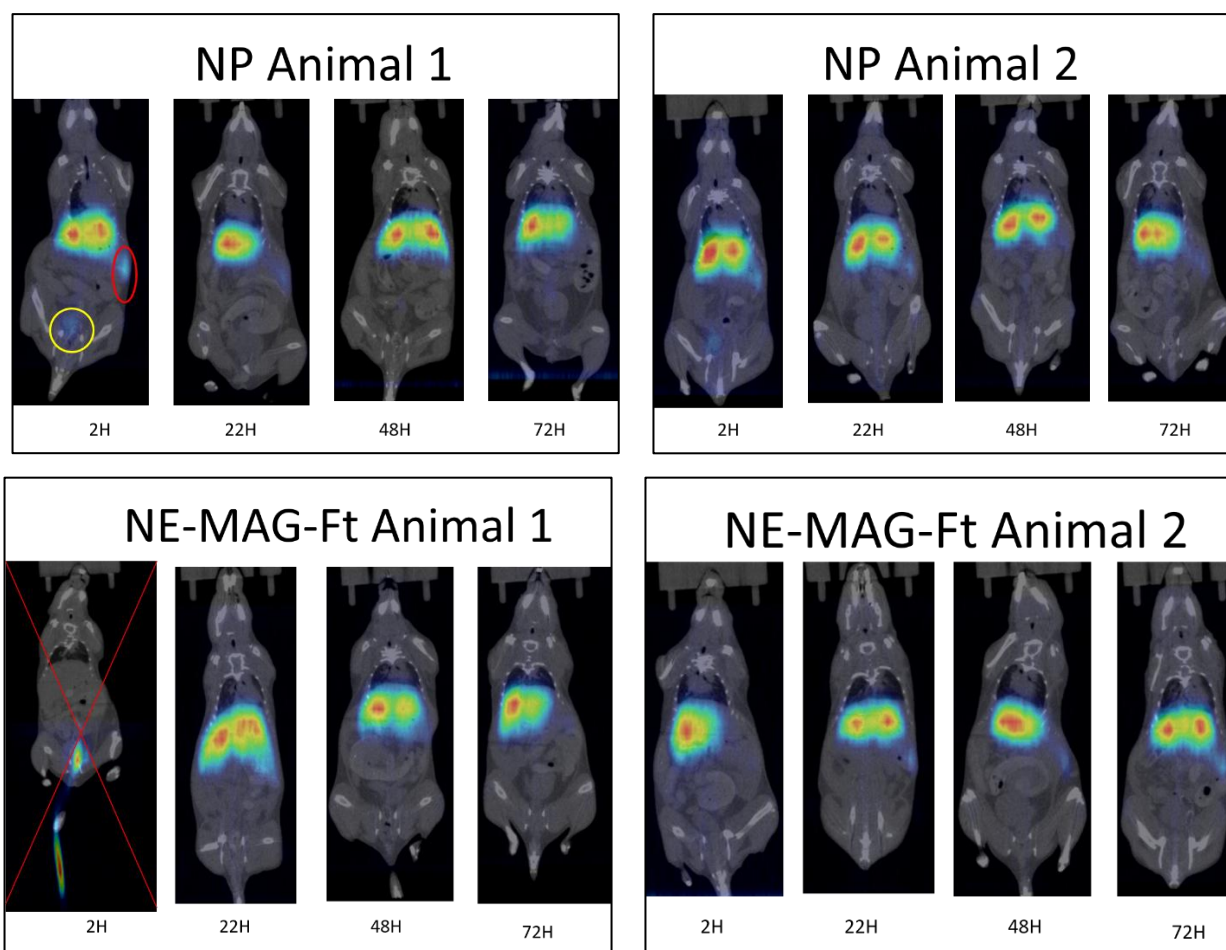


Figura 33. Imagens de SPECT-CT de animais injetados com NP ou NE-MAG-Ft ao longo dos tempos de 2, 22, 48 e 72 h. Toda radiação detectada nos planos de aquisição foi somada e representada em uma única imagem sobreposta a imagem de plano de tomografia computadorizada. Círculo amarelo: bexiga; círculo vermelho: baço

Em ambos os animais que receberam NP-Ga-67, foi observado intenso sinal no fígado e sinal baixo no baço em todos os tempos estudados. No tempo de 2 h após administração de NP-Ga-67, foi identificada atividade na bexiga em ambos os animais testados, não sendo mais detectada nos demais tempos. Nos animais que receberam NE-MAG-Ft-Ga-67, um deles precisou ser substituído uma vez que a radioatividade se manteve por longo período retida na cauda do animal. De forma semelhante à exposição com NP, foi observado intenso sinal no fígado e sinal baixo no baço em todos os tempos estudados, porém não foi observada atividade na bexiga.

Após o tempo de 72 h, os animais foram submetidos à eutanásia e os órgãos e sangue foram pesados e a atividade específica de cada órgão registrada (Figura 34). Foi identificado que

para NP ~75% da dose foi identificada no fígado enquanto que para NE-MAG-Ft 100% foi identificado no fígado.

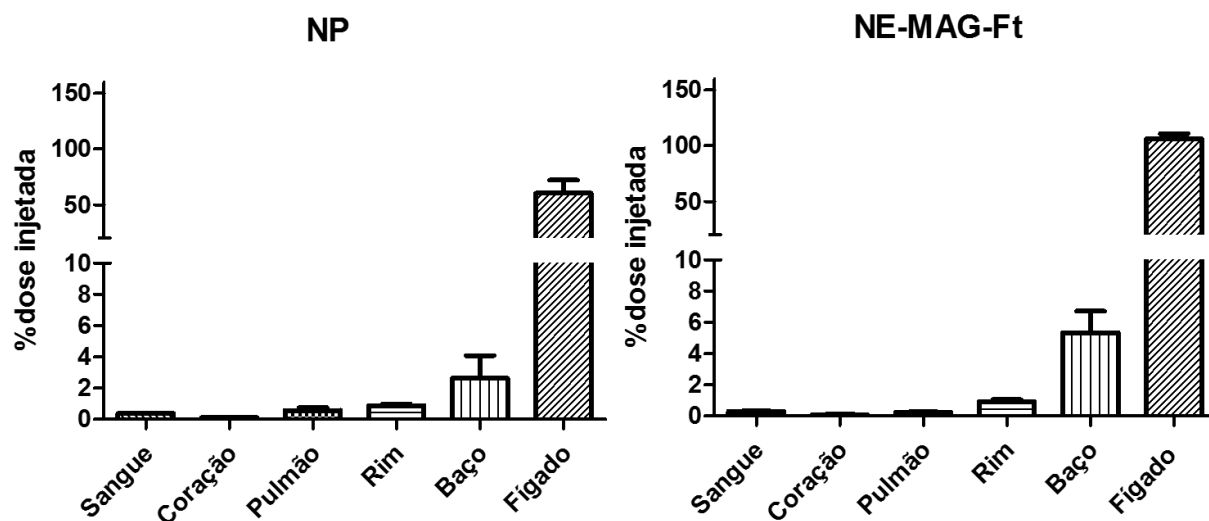


Figura 34. Quantificação em contador de raios gamma de Ga-67 nos órgãos após 72 h de administração de NP-Ga-67 e NE-MAG-Ft-Ga-67 em camundongos.

A soma da radiação total nos órgãos analisados por animal permitiu a quantificação de  $64,86\% \pm 19,25$  e  $113,12\% \pm 4,26$  da dose inicial, para NP-Ga-67 e NE-MAG-Ft-Ga-67, respectivamente.

Em seguida o observado por órgão e no sangue foi normalizado pelo peso do tecido e pode ser observado na Figura 35.



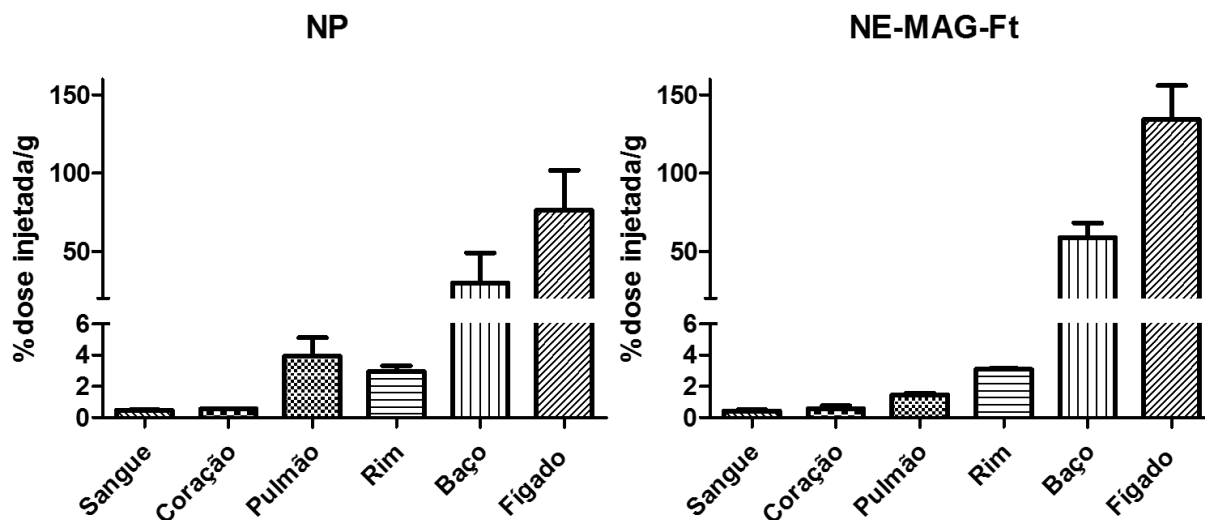


Figura 35. Quantificação de radiação gamma/g de tecido emitida pelos órgãos ex vivo de animais injetados com NP-Ga-67 e NE-MAG-Ft-Ga-67 após 72 h.

A observação *ex vivo* da radiação permitiu quantificar gálio 67 nos órgãos de interesse e foi observado diferença significativa ( $p < 0,001$ ) no observado no fígado entre os dois nanossistemas, sendo a captação maior neste órgão após administração de NE-MAG-Ft.

Foi observada diferença estatística entre o observado no fígado e no baço em relação aos demais órgãos para ambos os nanossistemas.

### 3.8.2 Biodistribuição de NE-Ft e NE-MAG-Ft pela técnica de Imageamento de fluorescência.

Foi realizada a biodistribuição da fluorescência de AICIFt após administração de NE-Ft e NE-MAG-Ft (Figura 36). A eficiência radiante encontrada por órgãos foi normalizada pelo peso dos órgãos e pode ser encontrada na Figura 37. Foi feita análise de diferenças estatísticas entre o sinal dos órgãos dos animais controle e os órgãos dos animais que receberam NE-Ft e NE-MAG-Ft nos tempos de análise (2, 12, 24, 48 e 72 h) (1). Foi analisada também a possível diferença estatística entre o observado entre os órgãos para cada nanossistema nos diferentes tempos (2). Por último foi comparado a eficiência radiante encontrada por órgãos nos diferentes tempos entre os dois nanossistemas (3).

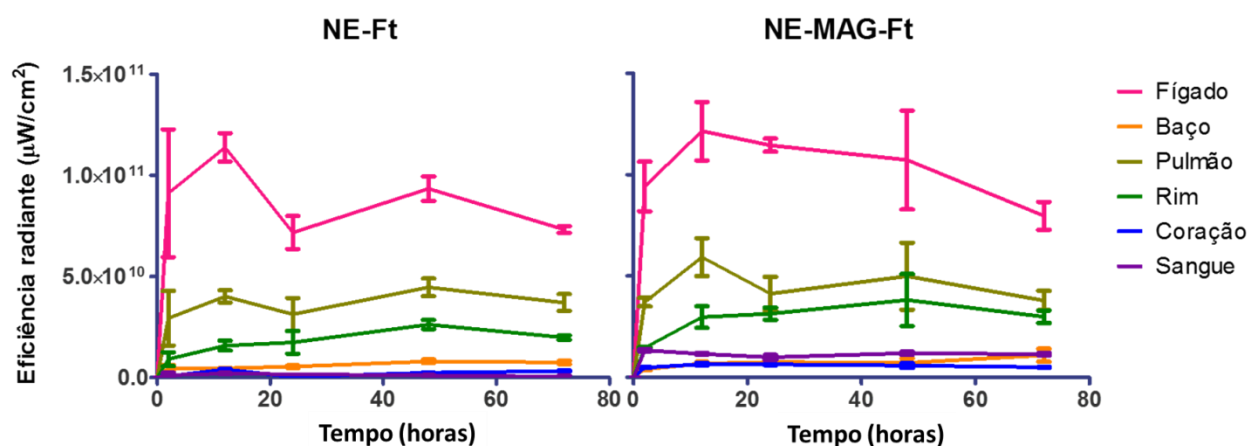


Figura 36. Biodistribuição de NE-Ft e NE-MAG-Ft em órgãos de camundongos C57BL/6 medida por eficiência radiante de fluorescência *ex vivo*.

Ambos os tratamentos apresentaram resultados semelhantes para os órgãos analisados. Tanto para NE-Ft quanto para NE-MAG-Ft, foi observada diferença estatística em todos os tempos estudados nos valores encontrados para fígado e pulmão e para o rim no tempo de 48 h, em relação aos órgãos dos animais controle. O observado no fígado foi estatisticamente diferente do encontrado nos demais órgãos em todos os tempos estudados. No pulmão foi observada diferença estatística em relação a todos os órgãos, exceto o rim, onde foi encontrada somente no tempo de 12 h. No baço, o observado foi estatisticamente diferente do encontrado no pulmão e fígado em todos os tempos, em relação ao rim somente no tempo de 48 h. No rim o encontrado foi estatisticamente diferente de fígado e pulmão em todos os tempos, e no tempo de 48 h para

o encontrado tanto no baço quanto no coração. No coração e no sangue o encontrado foi estatisticamente diferente de fígado, pulmão e baço para todos os tempos. A única particularidade da análise estatística de NE-MAG-Ft em relação a NE-Ft é que foi encontrada diferença estatística entre o observado no pulmão e o encontrado no sangue nos tempos de 12, 24 e 48 h. Nas demais comparações não citadas, não foi observada diferença estatística.

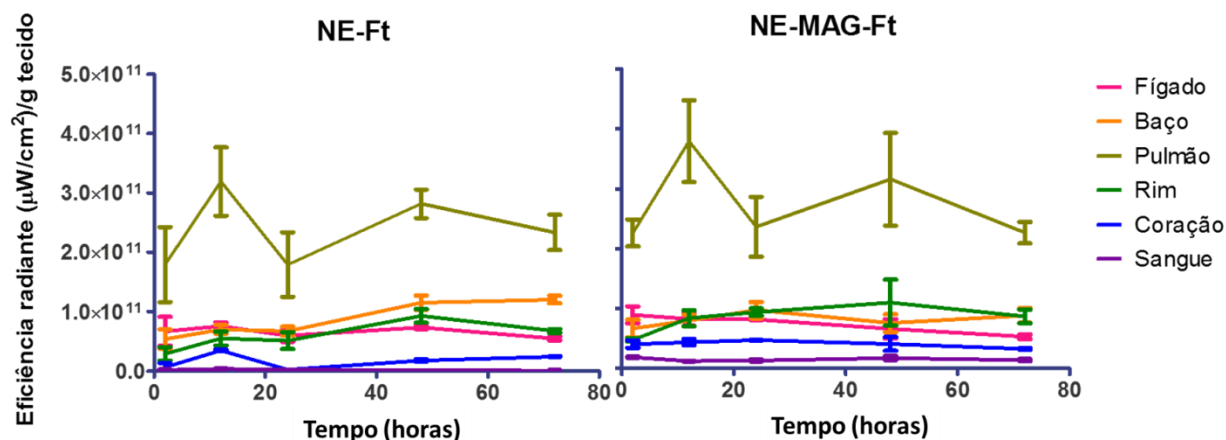


Figura 37. Normalização por peso da amostra de biodistribuição de NE-Ft e NE-MAG-Ft em órgãos de camundongos C57BL/6 medida por eficiência radiante de fluorescência *ex vivo*.

Após normalização por grama de tecido, de forma semelhante ao encontrado para a intensidade identificada por órgãos, a análise estatística entre os órgãos dos animais tratados com NE-Ft e NE-MAG-Ft foi extremamente semelhante para os dois tratamentos. Tanto para NE-Ft quanto para NE-MAG-Ft, foi observada diferença estatística do encontrado no pulmão em relação aos demais órgãos em todos os tempos. Foi identificada diferença estatística entre o encontrado no rim e o sangue no tempo de 48 h. A única diferença observada entre a análise estatística de NE-Ft e NE-MAG-Ft foi a diferença encontrada no baço em relação tanto ao coração quanto ao sangue nos tempos de 48 e 72 h somente para o NE-Ft, o mesmo não sendo observado em NE-MAG-Ft.

Ao comparar os resultados obtidos para cada nanossistema (NE-Ft x NE-MAG-Ft), por órgão, só foi possível observar diferença significativa entre os nanossistemas no sangue em todos os tempos (NE-MAG-Ft>NE-Ft) e no coração nos tempos de 2, 24 e 48 h (NE-MAG-Ft > NE-Ft).

### 3.8.3 Biodistribuição de NE-Ft e NE-MAG-Ft pela técnica de cromatografia líquida de alta eficiência

Foi realizada a biodistribuição da fluorescência de AICIFt após administração de NE-Ft e NE-MAG-Ft e pode ser observada na Figura 38. A fluorescência encontrada por órgãos foi normalizada pelo peso dos órgãos e pode ser encontrada na Figura 39.

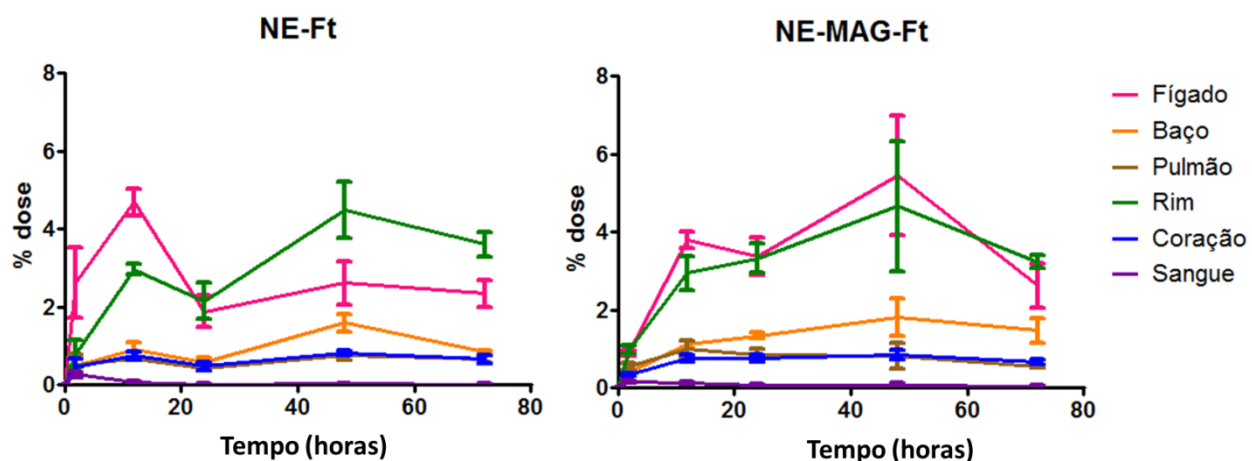


Figura 38. Biodistribuição de AICIFt após administração de NE-Ft e NE-MAG-Ft em órgãos de camundongos C57BL/6 e detecção por fluorescência em CLAE.

Não foram observados picos de interferências nas matrizes biológicas no tempo de retenção de AICIFt.

Na biodistribuição de NE-Ft, foi identificada diferença estatística entre o encontrado para o fígado e os demais órgãos, exceto no rim nos tempos de 24, 48 e 72 h. Para NE-MAG-Ft foi encontrada diferença entre o fígado e os demais órgãos, exceto para o pulmão de 12 a 72 h e no rim nos tempos de 12 e 48 h. Tanto para NE-Ft quanto para NE-MAG-Ft, o baço foi significativamente diferente do rim nos tempos de 12 a 72 h e do sangue em 48 h. Também para ambos os nanossistemas houve diferença estatística entre o encontrado no pulmão e nos rins nos tempos de 12, 24, 48 e 72 h. Para NE-Ft houve diferença estatística entre o observado no pulmão e no sangue nos tempos de 48 e 72 h. Para ambos os nanossistemas, houve diferença entre o encontrado nos rins em relação ao coração e sangue nos tempos de 12, 24, 48 e 72 h.

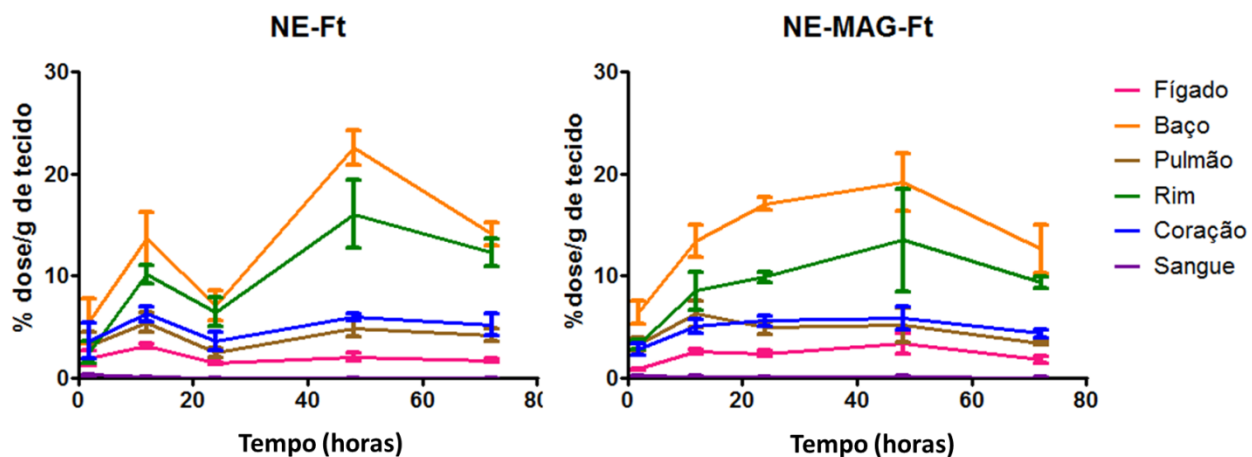


Figura 39. Normalização de biodistribuição de AIClFt por grama de tecido após administração de NE-Ft e NE-MAG-Ft em órgãos de camundongos C57BL/6 em CLAE.

Após normalização por peso, foi encontrada diferença estatística entre o fígado e em relação tanto ao baço quanto ao rim nos tempos de 12, 24, 48 e 72 h para ambos os nanossistemas. Foi observada diferença significativa entre baço e pulmão nos tempos de 12, 24, 48 e 72 h para ambos os nanossistemas; entre baço e rim, no tempo de 24 h para NE-Ft, e 24 e 48 h para NE-MAG-Ft; entre o baço e o coração nos tempos de 12, 24, 48 e 72 h para ambos os nanossistemas; entre pulmão e rim, nos tempos de 12, 48 e 72 h para NE-Ft e nos tempos de 48 e 72 h para NE-MAG-Ft; entre pulmão e sangue, nos tempos de 12 e 48 h para NE-Ft e no tempo de 12 h para NE-MAG-Ft; entre rim e coração, nos tempos de 48 e 72 h para NE-Ft e no tempo de 48 h para NE-MAG-Ft; entre rim e sangue, nos tempos de 12, 24, 48 e 72 h para ambos os nanossistemas; entre coração e sangue, nos tempos de 12, 48 e 72 h para NE-Ft e nos tempos de 24 e 48 h para NE-MAG-Ft.

Ao comparar os resultados obtidos para cada nanossistema (NE-Ft x NE-MAG-Ft), por órgão, só foi possível observar diferença significativa entre o observado para os nanossistemas no baço no tempo de 24 h (NE-MAG-Ft > NE-Ft).

#### 4. DISCUSSÃO

No presente estudo, uma nanoemulsão magnética foi desenvolvida, caracterizada e sua interação biológica foi estudada *in vitro* e *in vivo*. Foram utilizadas nanopartículas de óxido de ferro (NP) sintetizadas por pirólise induzida por laser. Uma das maiores dificuldades do uso clínico de nanossistemas é a transição da bancada para o mercado, uma vez que indústrias farmacêuticas preferem processos de preparo de “cima para baixo”, e a complexidade dos nanossistemas sendo propostos não permite este tipo de manufatura dos nanomateriais (PALIWAL; BABU; PALAKURTHI, 2014). Neste contexto, as nanopartículas magnéticas utilizada no presente estudo já foram desenvolvidas visando ter uma produção contínua, homogênea e em grande escala pelo uso da técnica de pirólise a laser (ALEXANDRESCU *et al.*, 2010).

Mesmo produzida há quase sete anos (ALEXANDRESCU *et al.*, 2010), as propriedades de potencial Zeta, morfologia e tamanho, descritas originalmente para a partícula foram confirmadas (Figuras 16 e 18). Uma característica não descrita que foi observada foi a organização das unidades fundamentais de 3 nm em aglomerados de 138 nm que não foram modificados pelos tempos de sonicação utilizados neste estudo (ALEXANDRESCU *et al.*, 2010). A dispersão de NP no óleo de rícino rendeu dispersão homogênea e estável por vários dias, não sendo o mesmo observado para as demais partículas testadas com diferentes coberturas e sintetizadas tanto por coprecipitação quanto por decomposição térmica. A ausência de cobertura de NP confere sua suspensão em água e em demais condições polares devido aos grupos Fe-O presentes na superfície de óxidos de ferro (PARKINSON, 2016), portanto a estabilidade da NP observada no óleo pode ser por ela estar em forma de suspensão já que possivelmente a viscosidade natural do óleo não permita a sua precipitação ou formação de fase. Não obstante, vale ressaltar que o óleo de rícino, apesar de hidrofóbico, tem como 90% dos ácidos graxos que o compõem o triacilglicerídeo de ácido ricinoleico que possui um grupo funcional hidroxila no 12º carbono, que o torna um óleo mais polar que a maioria dos óleos (CALLIGARIS *et al.*, 2014) e possivelmente justifique o observado na dispersão de NP.

O óleo de rícino, óleo vegetal não comestível, tem tido crescentemente utilizado em diversas áreas, em grande parte devido a ser de origem renovável, ser biodegradável, ter baixo custo e ser eco-sustentável (MUBOFU, 2016). Já o Cremophor ELP, uma versão purificada do

produto Cremophor EL, ambos derivados da reação de associação de óxidos de etileno ao ácido ricinoleico, tem sido utilizado com cautela devido a efeitos adversos e hipersensibilidades associadas ao seu uso (GELDERBLOM *et al.*, 2001; KISS *et al.*, 2013). Não obstante, muitos relatos continuam descrevendo a eficiência do seu uso em nanossistemas com finalidades terapêuticas (BERTHELSEN *et al.*, 2015; SHAO *et al.*, 2013).

Em protocolo já descrito de preparo de nanoemulsão contendo AICIFt (MUEHLMANN *et al.*, 2015), utiliza-se agitação magnética com aquecimento para solubilizar AICIFt, óleo de rícino e cremophor e esta mistura aquecida é adicionada a tampão fosfato aquecido formando nanoemulsão. No presente trabalho, foi utilizada sonda ultrassônica para homogeneizar a fase oleosa de forma a permitir o preparo de pequenos volumes dos nanossistemas, uma vez que para os 10 mL produzidos por lote, se utiliza 1200 mg da mistura óleo+surfactante para dispersão de NP, e o uso de sonda ultrassônica, se mostrou eficiente na homogeneização. O diâmetro hidrodinâmico obtido para NE sem fotosensibilizante (26,99 nm) está de acordo com o obtido por MUEHLMANN *et al.*, (2015) (24 nm) enquanto que para NE-Ft (36,18 nm) foi observado aumento no diâmetro hidrodinâmico em 33 % em relação ao relatado por MUEHLMANN *et al.*, (2015), de 25 nm. Uma possível desvantagem da redução de volume utilizado no presente estudo é o maior erro por perdas associada a pequenos volumes, o que pode ter levado às diferenças observadas. Não obstante, a associação de fármacos hidrofóbicos no núcleo também hidrofóbico de diversos nanossistemas já foi descrito resultando no aumento final do seu diâmetro (ALEXANDER *et al.*, 2012; BHARDWAJ; SHUKLA; COLLINS, 1995).

Apesar de diversas tentativas de preparo de nanoemulsões magnéticas com diferentes proporções dos constituintes, não foi possível obter condição com somente uma população homogênea de nanoestruturas, sendo sempre observada uma população de diâmetro hidrodinâmico semelhante ao de NE e outra de diâmetro maior do que o observado para NP, mesmo aumentando a quantidade de NP adicionada ao sistema (Figura 17). Os resultados do diâmetro obtidos pela técnica de dispersão dinâmica de luz quanto à intensidade, número e volume, descrevem como a contribuição das nanoemulsões não magnéticas são mais representativas em número e volume. O aumento do tamanho da população magnética em NE-MAG e NE-MAG-Ft em relação ao tamanho de NP, indica associação dos componentes da

nanoemulsão à NP. Já a diferença entre NE-MAG e NE-MAG-Ft indica a presença de AICIFt semelhante ao observado no aumento do tamanho de NE-Ft em relação a NE.

Índices de polidispersividade e potencial Zeta de nanoemulsões NE e NE-Ft condiz com o reportado por MUEHLMANN *et al.* (2015) Já as nanoemulsões magnéticas apresentam índice de polidispersividade mais alto, como esperado para suspensões polidispersas, uma vez que mais de uma subpopulação foi identificada (ARLETH; PEDERSEN, 2001). O potencial Zeta observado para as nanoemulsões magnéticas ( $\sim -11$  mV) indica uma organização química de superfície diferente da observada nas nanoemulsões ( $\sim -3$  mV) e de NP (+44mV) e mais estudos de interação química dos componentes talvez ajudem a esclarecer o valor observado.

Nanoemulsões são um desafio para a aquisição de imagens por microscopia eletrônica de transmissão uma vez que muitos artefatos e modificações da forma ocorrem no processo de desidratação. Apesar de muitos relatos de uso de contrastantes negativos na aquisição de imagens de nanoemulsões (DESAI; VYAS; AMIJI, 2008; NESAMONY *et al.*, 2013; THAKKAR *et al.*, 2011), a crio-microscopia de transmissão é tida como a que melhor técnica para demonstrar as características morfológicas reais de nanossistemas orgânicos (GIL-CARTON *et al.*, 2016). Desta forma, o uso da contração negativa nas nanoemulsões magnéticas indicou concentrações maiores de matéria orgânica circundando as partículas magnéticas, mas somente a técnica de crio-MET preservou e identificou a estrutura fundamental das nanoemulsões (Figuras 19 e 20). As imagens obtidas de crio-MET demonstram pela primeira vez por microscopia a nanoemulsão de óleo de rícino/cremophor e os pontos eletrondensos associados à AICIFt, além de demonstrar NPs envoltas em matéria orgânica. Não foram encontrados relatos de nanoemulsão magnética com NPs sem coberturas, demonstrando pela primeira vez sua estabilidade no óleo de rícino.

A irregularidade da forma ou o tamanho de agregados de NPs de maior diâmetro podem justificar a identificação de NP sem associação ao óleo de rícino encontrado na amostra contendo o dobro de NP para a mesma quantidade de óleo e surfactante (Figura 21).

A microscopia de força atômica de NE-MAG-Ft confirmou a heterogeneidade das nanoemulsões magnéticas observada por crio-microscopia e demonstrou a distinção da rugosidade das diferentes populações. A maior rugosidade das grandes partículas se deve provavelmente às irregularidades dos agregados de NPs que devem dar às gotículas de óleo que a envolvem mais relevo.



As propriedades fotofísicas dos nanossistemas desenvolvidos foram caracterizadas e demonstraram que a AICIFt nos nanossistemas possui absorvância semelhante ao observado em etanol, indicando que a molécula não está aglomerada quando incorporada a NE-Ft e NE-MAG-Ft (Figura 23). É observada absorvância em toda a faixa analisada que já é esperada para soluções com nanopartículas magnéticas (EL GHANDOOR *et al.*, 2012) e se observa predominância de banda QIII em 680 nm, associada a absorvância de monômeros de AICIFt (VILSINSKI, BRUNO H. *et al.*, 2015). No espectro de fluorescência (Figura 24) é observado que tanto NE-Ft quanto NE-MAG-Ft preservaram a propriedade de AICIFt de ser excitada a 350 nm e emitir a 680-690 nm, reforçando também que as moléculas estão disponíveis para a irradiação e não aglomerada devido a meio hidrofílico (como observado para AICIFt em tampão fosfato). A aglomerada de AICIFt em tampão fosfato se dá pela interação de ligações  $\pi$ - $\pi$  entre as moléculas e resulta em significativa redução da fluorescência e da capacidade de geração de oxigênio singlete de fotossensibilizantes (BAE; NA, 2010).

A degradação da sonda DBF foi utilizada para confirmar a capacidade de AICIFt em gerar espécies reativas de oxigênio após irradiação com LED 660 nm. A eficiência do uso desta sonda com nanossistemas contendo AICIFt já foi estabelecida (MUEHLMANN *et al.*, 2014, 2015) e no presente estudo indicou não haver perda do rendimento quântico de AICIFt após sua incorporação nos nanossistemas quando comparada com AICIFt em solução etanólica. A preservação do rendimento quântico e das propriedades ópticas de AICIFt nos nanossistemas propostos justifica seu uso em sistemas biológicos uma vez que como molécula livre AICIFt perde suas propriedades úteis à terapia fotodinâmica (BAE; NA, 2010). Apesar da absorvância de NPs na faixa de emissão do LED de 600 nm utilizado no presente estudo, não foi observada perda de eficiência NE-MAG-Ft em relação a NE-Ft (Figura 25).

As curvas de magnetização das amostras demonstram não somente que as nanoemulsões magnéticas respondem ao campo magnético como indicam que a presença de AICIFt pode afetar positivamente as propriedades magnéticas das nanoemulsões (Figura 26). O tamanho das partículas magnéticas afeta o valor da sua saturação magnética de forma positiva, ou seja, quanto maior o tamanho das partículas, maior a saturação magnética. Não obstante, tamanhos reduzidos de partícula possibilitam a obtenção de paramagnetismo, condição muito desejada em aplicações biológicas. Além do tamanho, formato, composição e modificações da superfície

afetam a magnetização de forma menos óbvia, e é o balanço da contribuição de todos estes fatores que modulam a magnetização final (KOLHATKAR *et al.*, 2013). A associação de uma superfície a núcleos magnéticos normalmente diminui o valor de saturação magnética pela desorganização de camadas de spins superficiais, algo não observado em relação ao valor de saturação magnética descrito originalmente para NP, e como a interação interfacial modifica a anisotropia e tem consequência na sua magnetização (IGLESIAS; LABARTA; BATLLE, 2008). Mais estudos precisam ser realizados para verificar a possível influência da interação de AICIFt na maior magnetização do nanossistema NE-MAG-Ft em relação a NE-MAG.

A identificação dos modos vibracionais das ligações moleculares presentes nos nanossistemas pela técnica de espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier permitiu analisar como as ligações moleculares se modificaram após associação em nanossistemas. Os estiramentos encontrados para NP foram os mesmos descritos originalmente para NP por Alexandrescu *et al.* 2010 e validam o já descrito para nanopartículas de óxido de ferro previamente à funcionalização da superfície (ARCOS *et al.*, 2012). Foram observadas pequenas modificações entre os picos dos estiramentos identificados no óleo e no cremophor, mas todos de acordo com o esperado para ambos (YUSUF *et al.*, 2015) uma vez que o cremophor ELP é simplesmente o resultado da reação do óleo de rícino com óxidos de etileno. Os estiramentos identificados para AICIFt corroboram com o encontrado por EL-NAHASS *et al.*, 2015. Estiramento encontrado nos espectros de NE-MAG-Ft permite a verificação da interação de AICIFt com NE-MAG, interação já esperada inclusive pelas propriedades fotofísicas de NE-MAG-Ft que indicam a localização de AICIFt em ambiente hidrofóbico.

Em seguida, a toxicidade dos nanossistemas às células de adenocarcinoma pulmonar humano e macrófago murino, após 24 h foi avaliada. A toxicidade observada condiz com o esperado para nanossistemas contendo o surfactante cremophor de reconhecida citotoxicidade (GELDERBLOM *et al.*, 2001; KISS *et al.*, 2013), mas não foi observada na exposição a NP. A concentração citotóxica que reduz em 50% a viabilidade celular observada entre os nanossistemas foi parecida, indicando que não houve aumento de toxicidade pela associação do teor magnético nos nanossistemas. Entretanto a toxicidade de NP se modifica após 30 dias em solução, indicando a provável instabilidade química dessas nanopartículas, possivelmente devido à maior oxidação em solução aquosa.

Estudos já examinaram a citotoxicidade e genotoxicidade de diversos tipos de nanopartículas magnéticas com diferentes coberturas e de forma geral identificaram ausência ou baixa citotoxicidade para concentrações abaixo de 100 µg/mL. Além disso a toxicidade depende de fatores como tipo de cobertura e seus produtos após sua degradação, composição química do meio de cultivo e estado de oxidação do ferro. Um conhecido mecanismo associado a toxicidade de nanopartículas de óxidos de ferro é pela liberação de ferro livre na forma de Fe<sup>2+</sup> que pode atravessar a membrana mitocondrial e reagir com peróxido de hidrogênio e oxigênio produzindo radicais livres (SINGH *et al.*, 2010; ZALOGA *et al.*, 2015).

No trabalho de ZALOGA *et al.*, (2015), as propriedades físico químicas de nanopartículas magnéticas mantidas de 4 a 45 °C por 12 semanas resultou na constatação de que, apesar da não observação de modificações de tamanho e carga da partícula, a magnetização e estado oxidativo das partículas se alterou ao longo do tempo, afetando também a sua interação com células de linfoma de células T, de forma semelhante ao observado no presente estudo. Desta forma, indica-se que ao avaliar a estabilidade de nanossistemas magnéticos, tente-se caracterizar o estado oxidativo e a citotoxicidade ao longo do tempo, uma vez que ela pode se alterar pela modificação química dos componentes.

A captação de AIClFt pelos nanossistemas diferiu entre as linhagens tanto quanto à intensidade quanto ao perfil de incorporação. Apesar do macrófago ter um papel endocítico mais pronunciado que a célula A549, a célula A549 apresenta diâmetro médio de 10 – 14 µm (JIANG; SHEN; PIAO, 2010) e a célula RAW 264,7 4 – 5 µm (WILHELMI *et al.*, 2013). Desta forma, a superfície das membranas disponível para interagir com os nanossistemas difere em ~2,6 vezes, possivelmente explicando a diferença entre as intensidades observadas.

Citometria de fluxo já foi descrita como interessante aliada ao estudo de captação de partículas de diferentes tamanhos pela consequência nas modificações de tamanho e granulosidades consequentes da exposição a nanossistemas (MUTZKE *et al.*, 2015). Desta forma, a ausência de diferença na análise do tamanho e morfologia das células após exposição aos nanossistemas, indica que a captação de AIClFt em ambos os nanossistemas é na forma de nanoemulsão não magnética (presente tanto em NE-Ft como em NE-MAg-Ft) uma vez que uma mudança na morfologia é esperada para a captação de partículas rígidas como a de óxido de ferro (ZUCKER *et al.*, 2010).

Tentativas de identificação da via de entrada na célula pelo uso de citometria de fluxo de NE-Ft e NE-MAG-Ft pela inibição das vias mais comuns de endocitose, não foram conclusivas uma vez que todos os inibidores permitiram a entrada de AICIFt sem diferença significativa ao encontrado nas células não inibidas.

A técnica de microscopia confocal foi utilizada para confirmar a captação de AICIFt pelas células A549 e RAW 264,7. Outros trabalhos com nanossistemas contendo AICIFt demonstram resultados semelhantes de distribuição celular ao encontrado no presente estudo em diversas células: distribuição estritamente citosólica, com maior concentração próxima ao núcleo, com possível indicativo de localização no retículo endoplasmático (MIJAN *et al.*, 2014; MUEHLMANN *et al.*, 2014, 2015). Neste trabalho, tentativas de colocalizar marcadores de retículo endoplasmático com AICIFt não foram bem sucedidas pela dificuldade de obter adequada marcação somente do retículo endoplasmático, portanto a localização vesículas não foi confirmada.

Não obstante, estudos que demonstraram o direcionamento de moléculas para o retículo endoplasmático, como o elegante estudo que descreve o direcionamento da partícula viral nao encapsulada SV40 (PELKMANS; KARTENBECK; HELENIUS, 2001), ou o direcionamento das toxinas Shiga e colérica (RAJENDRAN; KNÖLKER; SIMONS, 2010), ressaltam a importância da via de endocitose dependente de caveolina para a entrega reticular.

Nos grandes aglomerados observados no microscópio confocal, não foi possível identificar fluorescência compatível com a observada para AICIFt, indicando que parte dos componentes magnéticos podem não estar associados à nanoemulsão, independentemente da remoção magnética ou por centrifugação gerar pellets com coloração condizente à associação de AICIFt.

Foi realizada terapia fotodinâmica de A549 e RAW 264,7 e confirmada eficiência terapêutica já reportada para nanoemulsões de óleo de rícino e cremophor contendo AICIFt (MUEHLMANN *et al.*, 2015). Para as linhagens testadas no presente estudo, o CC50 com uso da terapia fotodinâmica foi ainda mais baixo do que o já descrito para as células de epitélio mamário humano (MCF10A) e adenocarcinoma mamário humano (MCF7), 1,6 e 3,3 ng/mL, respectivamente, utilizando mesma fluência (25,3 J/cm<sup>2</sup> no presente estudo, e 25,9 J/cm<sup>2</sup> no trabalho de (MUEHLMANN *et al.*, 2015). A grande semelhança dos resultados obtidos após a

terapia fotodinâmica com NE-Ft e NE-MAG-Ft indica que a associação do teor magnético a nanoemulsão não prejudicou a eficácia terapêutica já estabelecida da nanoemulsão.

O protocolo para a marcação de nanopartículas de óxido de ferro com gálio-67 foi adaptado de relatos prévios (BURKE *et al.*, 2014)(BURKE *et al.*, 2015) e confirmou a capacidade do gálio de intercalar de forma estável na matriz cristalográfica do óxido de ferro. Dentre as adaptações necessárias para otimização da marcação, a diminuição da concentração do acetato de sódio de 0,2 para 0,05 M permitiu maior recuperação de NP marcada, uma vez que foi observada menor precipitação e agregação na presença de menos sal, condição já descrita para melhor estabilidade de NPs não funcionalizadas (PFEIFFER *et al.*, 2014). A radiomarcação com gálio da nanopartículas magnética permitiu usar a técnica de alta sensibilidade de tomografia computadorizada por emissão de fóton único.

A detenção de fótons únicos pela técnica resulta em desvantagens na resolução e sensibilidade em comparação com a técnica de tomografia por emissão de pósitrons (PET). A acurácia da quantificação de traçadores é um desafio uma vez que atenuação decorrente da profundidade tecidual e a desfocagem do colimador não permitem a correção nas imagens, a não ser em equipamentos mais recentes (CHEN, DELPHINE L.; KINAHAN, 2014), aos quais não se teve acesso no presente estudo. Por esse motivo uma verificação qualitativa da distribuição do gálio foi feita pelo SPECT e, no final de 72 h, os órgãos foram analisados em contador de raios gamma, de alta sensibilidade e resolução.

No estudo da técnica de SPECT somente dois animais puderam ser utilizados para cada nanossistema, o que diminui o significado estatístico dos resultados, mas foram discutidos independentemente do número de animais. Não obstante, com a radiomarcação de NP, foi possível analisar a dinâmica diferenciada dos nanossistemas e entender como se comportou o teor magnético das nanoemulsões magnéticas.

O observado qualitativamente no SPECT e quantitativamente no contador de raios gamma condiz com o esperado para nanomateriais: intensa captação pelo fígado. A rede sinusoidal por onde o sangue passa ao percorrer fígado, de frenestrações de 100 a 150 nm onde se encontram as células de Kupffer, já foi descrita como responsável pela captação de 30 a 99% de nanomaterias administrados pela via endovenosa (ZHANG, YI-NAN *et al.*, 2016). A observação de gálio no baço indica a presença de nanossistemas neste órgão, o que é esperado devido ao

importante papel no baço no sistema fagocitário mononuclear (MOGHIMI; HUNTER; ANDRESEN, 2012).

Apesar do grande interesse médico e científico pelo uso de nanossistemas para aumentar a meia vida e direcionamento ao tecido alvo de fármacos, uma grande barreira a ser vencida é a da opsonização e conseqüente remoção pelo sistema fagocitário mononuclear, e vencer esta barreira é a meta de um número crescente de estudos (BLANCO; SHEN; FERRARI, 2015).

Para o preparo de NP-Ga-67 e NE-MAG-Ft houveram diferentes etapas de manipulação dos nanossistemas: uma vez tendo realizada a marcação da NP com gálio, para ambos os nanossistemas ocorre a filtração para remoção do gálio livre. Para NP-Ga-67, ocorre em seguida a sua dispersão direta em tampão fosfato enquanto que para preparo de NE-MAG-Ft, se utiliza etapas de agitação magnética e ultrassônica antes da obtenção do nanossistema final. A diferença da radioatividade detectada na bexiga entre os animais injetados com NP e NE-MAG-Ft pode ser devido à manipulação diferenciada das amostras uma vez que as etapas de agitação magnética e ultrassônica podem ter removido gálio livre da suspensão no preparo de NE-MAG-Ft. O gálio que chega à bexiga, precisa passar pela filtração glomerular que permite a passagem de estruturas com tamanho máximo de 6 nm, indicando que o detectado após 2 h na bexiga, seja gálio livre, que tem conhecida distribuição para a bexiga (BALL *et al.*, 2013; CHITAMBAR, 2012). Outra hipótese é que a nanoemulsão pode ter tido um papel importante na prevenção da liberação de gálio de NP, apesar de tanto NP-Ga-67 quanto NE-MAG-Ft-Ga-67 terem se mostrado estáveis em condições que simulam o ambiente fisiológico (37°C em tampão fosfato pH 7,2) por até 48 h.

A quantificação *ex vivo* permitiu identificar que ~45% da atividade inicial de NP-Ga-67 não foi observada nos órgãos analisados no tempo de 72 h, enquanto que a atividade inicial de NE-MAG-Ft-Ga-67 foi identificada mesmo após 72 h. Como a atividade da dose inicial é quantificada em calibrador de dose e a quantificação após 72 h é realizada em contador de raios gamma (após normalização da atividade pelo decaimento no tempo decorrido desde atividade inicial). É possível que a conversão não tenha sido exata e justifique a atividade encontrada de 113%. A normalização do encontrado após 72 h pelo peso dos tecidos indica a concentração observada nos órgãos. Para o observado no baço, apesar da baixa % dose identificada neste órgão, após a normalização por grama de tecido, observa-se concentração apenas duas vezes menor do que a

encontrada no fígado para ambos os nanossistemas, reforçando o papel também deste órgão no sistema fagocitário mononuclear (MOGHIMI; HUNTER; ANDRESEN, 2012).

A diferença estatística entre o observado para o fígado após a administração de NP e NE-MAG-Ft, indica o possível papel da associação da nanoemulsão à NP (NE-MAG-Ft) na maior captura por este órgão. O encontrado não corrobora com o esperado, uma vez que a maior carga superficial e irregularidade de NP, indicariam maior potencial para captação deste nanossistema pelos macrófagos (BLANCO; SHEN; FERRARI, 2015). Entretanto, já foi observado que a heterogeneidade de nanossistemas (ADJEI; PEETLA; LABHASETWAR, 2014; OGURA *et al.*, 2016), afeta a biodistribuição dos mesmos, indícios de que talvez a fração não magnética de NE-MAG-Ft tenha levado à maior opsonização de NE-MAG-Ft.

Pela técnica de Imageamento de fluorescência, o sinal de AICIFt pode ser observado nos órgãos e sua análise ao longo do tempo indicou a dinâmica biológica de AICIFt. Tentativas de obter imagem da biodistribuição de AICIFt *in vivo* não foram bem-sucedidas devido à intensa autofluorescência da pele e pelos dos animais, resultando na análise *ex vivo* dos órgãos de interesse. Além disso, já é bem relatado na literatura a grande diferença entre o sinal de fluorescência *in vivo* e *ex vivo* de órgãos por técnicas de fluorescência por imagem. Nos rins, a diferença da intensidade do sinal detectado *ex vivo* chega a ser 25-30 vezes maior do que o sinal detectado *in vivo* (WILLIAMS *et al.*, 2015).

De forma semelhante ao encontrado pela técnica de SPECT, a localização de ambos os nanossistemas no fígado foi significativa em todos os tempos analisados e é justificada pela fagocitose realizada pelas células de Kupffer do sistema fagocitário mononuclear. Uma limitação desta técnica é que não é possível quantificar a intensidade observada e consequentemente afirmar % dose/ órgão (EVJEN *et al.*, 2012). Entretanto, proporcionalmente aos demais órgãos, o encontrado por esta técnica no pulmão e nos rins foi mais expressivo do que o encontrado pela técnica de SPECT. O valor médio do sinal encontrado nos tempos analisados apresenta relação fígado:pulmão e fígado:rim de aproximadamente 2,3:1 e 4,6:1, respectivamente, para ambos os nanossistemas, indicando maior detecção da dose no pulmão e rins por esta técnica.

A distinção entre o observado pelas técnicas de SPECT e de fluorescência por imagem atribui-se às diferentes populações presentes nas nanoemulsões magnéticas do presente estudo. Como existe um número maior de nanoemulsões não magnéticas compondo os nanossistemas

NE-MAG e NE-MAG-Ft, a distribuição observada pelas técnicas que analisam a fluorescência de AICIFt, devem representar mais as unidades não magnéticas do que as magnéticas. Isso é corroborado pela semelhança na distribuição entre o observado para NE-Ft e para NE-MAG-Ft, tanto para a técnica de fluorescência por imagem, quanto por CLAE.

Tanto em estudo da biodistribuição de nanoemulsão contendo doxorrubicina, quanto em estudo de biodistribuição de nanoemulsão com o alcaloide licobetaína (*lycobetaine*), foi observada intensa concentração (normalizada por grama de tecido) nos rins (ZHANG, XUANMIAO *et al.*, 2011; ZHAO *et al.*, 2013), indicando possível papel dos rins na retenção de nanoemulsões. A quantificação nos rins só foi pronunciada em relação aos demais órgãos pela técnica de cromatografia líquida. Por esta técnica não depender da fluorescência de AICIFt no organismo, é possível que a AICIFt presente nos rins esteja na forma de agregados, com perda de intensidade de fluorescência em relação à técnica de fluorescência por imagem.

O mesmo pode ser interpretado para o observado no baço uma vez que pela técnica de fluorescência por imagem a detecção neste órgão foi residual, enquanto que por cromatografia líquida foi o órgão com a maior concentração de AICIFt em todos os tempos estudados. A disparidade entre o observado é um problema já conhecido da técnica de fluorescência de não apresentar intensidade linear em ambientes hidrofílicos devido ao “*self-quenching*” de fluoróforos em altas concentrações (WANG, YU *et al.*, 2013).

Vale ressaltar que pela técnica de fluorescência por imagem, não é possível quantificar AICIFt, tampouco normalizar pela dose inicial administrada aos animais; e pela técnica de cromatografia líquida, a dose total identificada nos órgãos analisados representou aproximadamente 15% do inicialmente administrado. Desta forma, apesar da propriedade analiticamente quantitativa da cromatografia líquida, a baixa recuperação da dose pode ser devido à distribuição de AICIFt para órgãos não analisados ou devido à baixa recuperação na extração (apesar do método ter apresentado recuperação adequada quando validado para cromatografia líquida de ultra alta eficiência).



## 5. CONCLUSÕES

Foi desenvolvida uma nanoemulsão magnética contendo o fotossensibilizante AIClFt. A caracterização físico-química, indica que as propriedades ópticas de AIClFt foram preservadas após associação de elemento magnético ao nanossistema. O nanossistema demonstrou eficiência na terapia fotodinâmica de células com uso de LED e concentração citotóxica identificada no presente estudo foi a mais baixa já encontrada para células tratadas com o mesmo fotossensibilizante. A análise da biodistribuição por diferentes técnicas permitiu identificar o comportamento diferenciado dos componentes magnéticos e fluorescentes e que as técnicas de fluorescência por imagem e por cromatografia líquida não identificaram a mesma proporção de AIClFt entre os órgãos estudados.

## CONCLUSÕES GERAIS

O presente estudo teve como objetivo principal ajudar a esclarecer a dinâmica da interação biológica de nanossistemas contendo AICIFt e conclui-se que as três abordagens utilizadas foram efetivas na agregação de mais informações sobre a vasta área da nanomedicina com uso do fotossensibilizante AICIFt.

Micelas de Pluronic® F127 contendo AICIFt, foram desenvolvidas como modalidade simplificada de nanossistema e sua efetividade foi estimada. A simplicidade, eficiência e biocompatibilidade das micelas são vantagens que indicam um caminho promissor do uso deste nanossistema. O estudo por espectrometria de massa de AICIFt esclareceu a massa molecular de AICIFt em solução e o método analítico validado indica sua adequabilidade para uso em estudos de biodistribuição.

Nanoemulsão magnética contendo AICIFt teve sua eficiência confirmada e o estudo de sua biodistribuição permitiu identificar diferenças decorrentes das vantagens e limitações do uso de cada técnica.

## REFERÊNCIAS

- ADJEI, Isaac M; PEETLA, Chiranjeevi; LABHASETWAR, Vinod. Heterogeneity in nanoparticles influences biodistribution and targeting. *Nanomedicine (London, England)*, v. 9, n. 2, p. 267–78, fev. 2014.
- AHLINDER, Linnea *et al.* Large uptake of titania and iron oxide nanoparticles in the nucleus of lung epithelial cells as measured by Raman imaging and multivariate classification. *Biophysical journal*, v. 105, n. 2, p. 310–9, 16 jul. 2013.
- AKASH, Muhammad Sajid Hamid; REHMAN, Kanwal. Recent progress in biomedical applications of Pluronic (PF127): Pharmaceutical perspectives. *Journal of Controlled Release*, v. 209, p. 120–138, 10 jul. 2015.
- ALEXANDER, Shirin *et al.* Growth and Shrinkage of Pluronic Micelles by Uptake and Release of Flurbiprofen: Variation of pH. *Langmuir*, v. 28, p. 6539–6545, 2012.
- ALEXANDRESCU, R. *et al.* Iron Oxide Materials Produced by Laser Pyrolysis. p. 22–25. 2010.
- ALEXIS, Frank *et al.* Factors Affecting the Clearance and Biodistribution of Polymeric Nanoparticles. *Molecular Pharmaceutics*, v. 5, n. 4, p. 505–515, ago. 2008.
- ALLEN, T M; CULLIS, P R. Drug delivery systems: entering the mainstream. *Science*, v. 303, n. 5665, p. 1818–1822, 2004.
- ALLISON, Ron R. *et al.* Photodynamic therapy for anal cancer. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, v. 7, n. 2, p. 115–119, jun. 2010.
- ALMEIDA, Joao Paulo Mattos *et al.* In vivo biodistribution of nanoparticles. *Nanomedicine*, v. 6, n. 5, p. 815–835, jul. 2011.
- ANASTAS, Paul; EGHBALI, Nicolas. Green Chemistry: Principles and Practice. *Chemical Society Reviews*. 39, 301-312. 2010.
- ANSELMO, Aaron C.; MITRAGOTRI, Samir. A Review of Clinical Translation of Inorganic Nanoparticles. *The AAPS Journal*, v. 17, n. 5, p. 1041–1054, 9 set. 2015.
- AOUN, Fouad *et al.* Next revolution in molecular theranostics: personalized medicine for urologic cancers. *Future Oncology*, v. 11, n. 15, p. 2205–2219, ago. 2015.
- ARCOS, Daniel *et al.* Supramolecular mechanisms in the synthesis of mesoporous magnetic nanospheres for hyperthermia. *J. Mater. Chem.*, v. 22, n. 1, p. 64–72, 2012.

ARLETH, Lise; PEDERSEN, Jan Skov. Droplet polydispersity and shape fluctuations in AOT [bis(2-ethylhexyl)sulfosuccinate sodium salt] microemulsions studied by contrast variation small-angle neutron scattering. *Physical Review E*, v. 63, n. 6, p. 61406, 24 maio 2001.

ARMENTA, S; GARRIGUES, S; DE LA GUARDIA, M. Green analytical chemistry. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, v. 27, n. 6, p. 497–511, 2008.

BAE, Byoung-chan; NA, Kun. Self-quenching polysaccharide-based nanogels of pullulan/folate-photosensitizer conjugates for photodynamic therapy. *Biomaterials*, v. 31, n. 24, p. 6325–6335, 2010.

BAEK, Seonmi *et al.* Smart multifunctional drug delivery towards anticancer therapy harmonized in mesoporous nanoparticles. *Nanoscale*, v. 7, n. 34, p. 14191–216, 14 set. 2015.

BALL, Katherine R *et al.* Synchrotron X-ray fluorescence microscopy of gallium in bladder tissue following gallium maltolate administration during urinary tract infection. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v. 57, n. 11, p. 5197–201, nov. 2013.

BANERJEE, Shibdas; MAZUMDAR, Shyamalava. Electrospray Ionization Mass Spectrometry: A Technique to Access the Information beyond the Molecular Weight of the Analyte. *International Journal of Analytical Chemistry*, v. 2012, p. 1–40, 2012.

BANGHAM, A.D.; HORNE, R.W. Negative staining of phospholipids and their structural modification by surface-active agents as observed in the electron microscope. *Journal of Molecular Biology*, v. 8, n. 5, p. 660–IN10, 1964.

BATRAKOVA, Elena V.; KABANOV, Alexander V. Pluronic block copolymers: Evolution of drug delivery concept from inert nanocarriers to biological response modifiers. *J. Controlled Release*, v. 130, n. 2, p. 98–106, 10 set. 2008.

BERGHAUS, Londa J *et al.* Innate immune responses of primary murine macrophage-lineage cells and RAW 264.7 cells to ligands of Toll-like receptors 2, 3, and 4. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, v. 33, n. 5, p. 443–54, set. 2010.

BERTHELSEN, Ragna *et al.* Kolliphor Surfactants Affect Solubilization and Bioavailability of Fenofibrate. Studies of in Vitro Digestion and Absorption in Rats. *Molecular Pharmaceutics*, v. 12, n. 4, p. 1062–1071, 6 abr. 2015.

BERTRAND, Nicolas; LEROUX, Jean-Christophe C. The journey of a drug-carrier in the body: An anatomo-physiological perspective. *Journal of Controlled Release*, v. 161, n. 2, p. 152–163, 20 jul. 2012.

BHARDWAJ, S. B.; SHUKLA, A. J.; COLLINS, C. C. Effect of varying drug loading on particle size distribution and drug release kinetics of verapamil hydrochloride microspheres prepared with cellulose esters. *Journal of Microencapsulation*, v. 12, n. 1, p. 71–81, 27 jan. 1995.

BICALHO, Leandro Santos *et al.* Photodynamic therapy leads to complete remission of tongue tumors and inhibits metastases to regional lymph nodes. *Journal of biomedical nanotechnology*, v. 9, n. 5, p. 811–8, maio 2013.

BLANCO, Elvin; SHEN, Haifa; FERRARI, Mauro. Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery. *Nature Biotechnology*, v. 33, n. 9, p. 941–951, 8 set. 2015.

BRAUN, Stefanie *et al.* Hedgehog signaling in glioblastoma multiforme. *Cancer Biology & Therapy*, v. 13, n. 7, p. 487–495, 5 maio 2012.

BROWN, Stanley B; BROWN, Elizabeth A; WALKER, Ian. The present and future role of photodynamic therapy in cancer treatment. *The Lancet Oncology*, v. 5, n. 8, p. 497–508, ago. 2004.

BUHLEIER, Egon; WEHNER, Winfried; VÖGTLE, Fritz. “Cascade” and “Nonskid-Chain-like” Syntheses of Molecular Cavity Topologies. *Synthesis*, v. 1978, n. 2, 1978.

BURKE, Benjamin P. *et al.* Chelator free gallium-68 radiolabelling of silica coated iron oxide nanorods via surface interactions. *Nanoscale*, v. 7, n. 36, p. 14889–14896, 2015.

BURKE, Benjamin P. *et al.* Final step gallium-68 radiolabelling of silica-coated iron oxide nanorods as potential PET/MR multimodal imaging agents. *Faraday Discuss.*, 2014.

CALLIGARIS, Sonia *et al.* Effect of Oil Type on Formation, Structure and Thermal Properties of  $\gamma$ -oryzanol and  $\beta$ -sitosterol-Based Organogels. *Food Biophysics*, v. 9, n. 1, p. 69–75, 23 mar. 2014.

CHANDAROY, Parthaprati *et al.* Utilizing temperature-sensitive association of Pluronic F-127 with lipid bilayers to control liposome–cell adhesion. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, v. 1559, n. 1, p. 32–42, 2002.

CHATTERJEE, Dev Kumar; FONG, Li Shan; ZHANG, Yong. Nanoparticles in photodynamic therapy: An emerging paradigm. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, v. 60, n. 15, p. 1627–1637, 14 dez. 2008.

CHEN, Dao-Jin *et al.* Cytotoxic activity of gypenosides and gynogenin against non-small cell lung carcinoma A549 cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 24, n. 1, p. 186–191, 1 jan. 2014.

CHEN, Delphine L.; KINAHAN, Paul E. Multimodality molecular imaging of the lung. *Clinical and*

*Translational Imaging*, v. 2, n. 5, p. 391–401, 16 out. 2014.

CHERTOK, Beata *et al.* Iron oxide nanoparticles as a drug delivery vehicle for MRI monitored magnetic targeting of brain tumors. *Biomaterials*, v. 29, n. 4, p. 487–496, fev. 2008.

CHITAMBAR, Christopher R. Gallium-containing anticancer compounds. *Future medicinal chemistry*, v. 4, n. 10, p. 1257–72, jun. 2012.

CHOY, G *et al.* Comparison of noninvasive fluorescent and bioluminescent small animal optical imaging. *Biotechniques*, v. 35, n. 5, p. 1022–1031, 2003.

CIELECKA-PIONTEK, J *et al.* UHPLC: The Greening Face of Liquid Chromatography. *Chromatographia*, v. 76, p. 1429–1437, 2013.

CUI, S *et al.* In Vivo Targeted Deep-Tissue Photodynamic Therapy Based on Near-Infrared Light Triggered Upconversion Nanoconstruct. *ACS nano*, 2012.

DAVIS, M E. Nanoparticle therapeutics: an emerging treatment modality for cancer. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 7, n. 9, p. 771–782, 2008.

DE PAULA, Leonardo B. *et al.* Combination of hyperthermia and photodynamic therapy on mesenchymal stem cell line treated with chloroaluminum phthalocyanine magnetic-nanoemulsion. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, v. 380, p. 372–376, 2015.

DE ROSA, Fernanda S.; BENTLEY, M. Vitória L. B. Photodynamic Therapy of Skin Cancers: Sensitizers, Clinical Studies and Future Directives. *Pharmaceutical Research*, v. 17, n. 12, p. 1447–1455, 2000. D

DEMOY, Marina *et al.* Spleen Capture of Nanoparticles: Influence of Animal Species and Surface Characteristics. *Pharmaceutical Research*, v. 16, n. 1, p. 37–41, jan. 1999.

DESAI, Ankita; VYAS, Tushar; AMIJI, Mansoor. Cytotoxicity and Apoptosis Enhancement in Brain Tumor Cells Upon Coadministration of Paclitaxel and Ceramide in Nanoemulsion Formulations. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 97, n. 7, p. 2745–2756, jul. 2008.

DINIZ, Ivana M. A. *et al.* Pluronic F-127 hydrogel as a promising scaffold for encapsulation of dental-derived mesenchymal stem cells. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 26, n. 3, p. 153, 15 mar. 2015.

DORN, Klaus; HOERPEL, Gerhard; RINGSDORF, Helmut. Polymeric Antitumor Agents on a Molecular and Cellular Level. *Bioactive Polymeric Systems*. Boston, MA: Springer US, 1985. p. 531–585.

DOUGHERTY, T J *et al.* Photodynamic therapy. *Journal of the National Cancer Institute*, v. 90, n. 12, p. 889–905, 1998.

EL-NAHASS, M.M. *et al.* Structural and optical properties of nanocrystalline aluminum phthalocyanine chloride thin films. *Materials Science in Semiconductor Processing*, v. 38, n. 38, p. 177–183, out. 2015.

EL GHANDOOR, H *et al.* Synthesis and some physical properties of magnetite (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) nanoparticles. *Int. J. Electrochem. Sci*, v. 7, p. 5734–5745, 2012.

ENK, C.D. *et al.* Cutaneous leishmaniasis responds to daylight-activated photodynamic therapy: proof of concept for a novel self-administered therapeutic modality. *British Journal of Dermatology*, v. 172, n. 5, p. 1364–1370, maio 2015.

ETTRE, Leslie. M.S. Tswett and the Invention of Chromatography. *LCGC North America*, v. 21, n. 5, p. 458–467, 2003.

EVJEN, T J *et al.* In vivo monitoring of liposomal release in tumours following ultrasound stimulation. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2012.

FAN, Yongyi *et al.* Modified Nanoemulsions with Iron Oxide for Magnetic Resonance Imaging. *Nanomaterials*, v. 6, n. 12, p. 223, 25 nov. 2016.

FARREN, Christopher *et al.* The first genuine observation of fluorescent mononuclear phthalocyanine aggregates. *Chemical communications (Cambridge, England)*, n. 6, p. 572–3, 21 mar. 2002.

FRANCHI, Leonardo Pereira *et al.* In vitro effects of photodynamic therapy induced by chloroaluminum phthalocyanine nanoemulsion. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, v. 16, p. 100–105, dez. 2016.

GANTA, Srinivas *et al.* EGFR Targeted Theranostic Nanoemulsion for Image-Guided Ovarian Cancer Therapy. *Pharmaceutical Research*, v. 32, n. 8, p. 2753–63, 4 mar. 2015.

GANTA, Srinivas *et al.* Nanoemulsions in translational research-opportunities and challenges in targeted cancer therapy. *AAPS PharmSciTech*, v. 15, n. 3, p. 694–708, jun. 2014.

GELDERBLOM, H *et al.* Cremophor EL: the drawbacks and advantages of vehicle selection for drug formulation. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*, v. 37, n. 13, p. 1590–8, set. 2001.

GHANI, Fatemeh; KRISTEN, Juliane; RIEGLER, Hans. Solubility properties of unsubstituted metal

phthalocyanines in different types of solvents. *Journal of Chemical & Engineering Data*, v. 57, n. 2, p. 439–449, 2012.

GIL-CARTON, David *et al.* Real-time and decision taking selection of single-particles during automated cryo-EM sessions based on neuro-fuzzy method. *Expert Systems with Applications*, v. 55, p. 403–416, 2016.

GILCHRIST, R K *et al.* Selective inductive heating of lymph nodes. *Annals of surgery*, v. 146, n. 4, p. 596–606, out. 1957.

GONG, C *et al.* Thermosensitive Polymeric Hydrogels As Drug Delivery Systems. *Curr. Med. Chem.*, v. 20, n. 1, p. 79–94, 2013.

GONZALES, Marcela *et al.* Cytotoxicity of iron oxide nanoparticles made from the thermal decomposition of organometallics and aqueous phase transfer with Pluronic F127. *Contrast media & molecular imaging*, v. 5, n. 5, p. 286–293, 2010.

GRIFFIN, Liezel; LEAR, John. Photodynamic Therapy and Non-Melanoma Skin Cancer. *Cancers*, v. 8, n. 10, p. 98, 22 out. 2016.

GUSTAVO GONZÁLEZ, A.; ÁNGELES HERRADOR, M. A practical guide to analytical method validation, including measurement uncertainty and accuracy profiles. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, v. 26, n. 3, p. 227–238, 2007.

HASANY, S. *et al.* Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Chemical Synthesis and Applications Review. *Current Nanoscience*, v. 9, n. 5, p. 561–575, 1 ago. 2013.

HAUME, Kaspar *et al.* Gold nanoparticles for cancer radiotherapy: a review. *Cancer nanotechnology*, v. 7, n. 1, p. 8, 2016.

HERBST, Roy S.; HEYMACH, John V.; LIPPMAN, Scott M. Lung Cancer. *New England Journal of Medicine*, v. 359, n. 13, p. 1367–1380, 25 set. 2008.

HOLMBERG, L. *et al.* National comparisons of lung cancer survival in England, Norway and Sweden 2001-2004: differences occur early in follow-up. *Thorax*, v. 65, n. 5, p. 436–441, 1 maio 2010.

HUANG, Guoming *et al.* Facile integration of multiple magnetite nanoparticles for theranostics combining efficient MRI and thermal therapy. *Nanoscale*, v. 7, n. 6, p. 2667–75, 14 fev. 2015.

HUANG, Hui S; HAINFELD, James F. Intravenous magnetic nanoparticle cancer hyperthermia. *International journal of nanomedicine*, v. 8, p. 2521–32, 2013.



ICH. ICH HARMONISED TRIPARTITE GUIDELINE VALIDATION OF ANALYTICAL PROCEDURES: TEXT AND METHODOLOGY Q2(R1) Guideline on Validation of Analytical Procedures: Methodology developed to complement the Parent Guideline. 2005.

IGLESIAS, Oscar; LABARTA, Amílcar; BATLLE, Xavier. Exchange bias phenomenology and models of core/shell nanoparticles. *Journal of nanoscience and nanotechnology*, v. 8, n. 6, p. 2761–80, jun. 2008.

ISO, T S. 80004-1: Nanotechnologies-Vocabulary-Part 1: Core terms. 2007. *International Standards Organization, Geneva, Switzerland, 2007.*

JAYME, C C; CALORI, I R; TEDESCO, A C. Spectroscopic analysis of aluminum chloride phthalocyanine in binary water/ethanol systems for the design of a new drug delivery system for photodynamic therapy cancer treatment. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, v. 153, p. 178–183, 2016.

JIANG, Run-de; SHEN, Hong; PIAO, Ying-Jie. The morphometrical analysis on the ultrastructure of A549 cells. *Romanian journal of morphology and embryology = Revue roumaine de morphologie et embryologie*, v. 51, n. 4, p. 663–7, 2010.

KAIJZEL, E L; VAN DER PLUIJM, G; LÖWIK, C.W.G.M. Whole-body optical imaging in animal models to assess cancer development and progression. *Clinical cancer research*, v. 13, n. 12, p. 3490–3497, 2007.

KALISZAN, Roman; WICZLING, Paweł. Gradient reversed-phase high-performance chromatography of ionogenic analytes. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, v. 30, n. 9, p. 1372–1381, 2011.

KAMBOJ, Vipin Kumar; VERMA, Prabhakar Kumar. Poloxamers based nanocarriers for drug delivery system. *Der Pharmacia Lettre*, v. 7, n. 2, p. 264–269, 2015.

KARIMI, Z.; KARIMI, L.; SHOKROLLAHI, H. Nano-magnetic particles used in biomedicine: Core and coating materials. *Materials Science and Engineering: C*, v. 33, n. 5, p. 2465–2475, 2013.

KELKAR, Sneha S.; REINEKE, Theresa M. Theranostics: combining imaging and therapy. *Bioconjugate chemistry*, v. 22, n. 10, p. 1879–1903, 19 out. 2011.

KHAN, Mohd Imran *et al.* Induction of ROS, mitochondrial damage and autophagy in lung epithelial cancer cells by iron oxide nanoparticles. *Biomaterials*, v. 33, n. 5, p. 1477–1488, fev. 2012.

KISS, Lóránd *et al.* Kinetic Analysis of the Toxicity of Pharmaceutical Excipients Cremophor EL and

RH40 on Endothelial and Epithelial Cells. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 102, n. 4, p. 1173–1181, abr. 2013.

KLOHS, J. *et al.* In vivo imaging of the inflammatory receptor CD40 after cerebral ischemia using a fluorescent antibody. *Stroke*, v. 39, n. 10, p. 2845–2852, 1 out. 2008.

KLOHS, Jan *et al.* Near-infrared fluorescence imaging with fluorescently labeled albumin: a novel method for non-invasive optical imaging of blood–brain barrier impairment after focal cerebral ischemia in mice. *Journal of neuroscience methods*, v. 180, n. 1, p. 126–132, 30 maio 2009.

KOLHATKAR, Arati G *et al.* Tuning the magnetic properties of nanoparticles. *International journal of molecular sciences*, v. 14, n. 8, p. 15977–6009, 31 jul. 2013.

KOU, Longfa *et al.* The endocytosis and intracellular fate of nanomedicines: Implication for rational design. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 8, n. 1, p. 1–10, 2013.

KRESGE, C. T. *et al.* Ordered mesoporous molecular sieves synthesized by a liquid-crystal template mechanism. *Nature*, v. 359, n. 6397, p. 710–712, 22 out. 1992. D

KRICHELDORF, Hans R.; ZANG, Qui-Zhen; SCHWARZ, G. New polymer syntheses: 6. Linear and branched poly(3-hydroxy-benzoates). *Polymer*, v. 23, n. 12, p. 1821–1829, 1982.

KWON, Glen S.; KATAOKA, Kazunori. Block copolymer micelles as longcirculating drug vehicles. *Adv. Drug Delivery Rev.*, v. 16, n. 2, p. 295, 1995.

LAKOWICZ, Joseph R. Introduction to Fluorescence. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Boston, MA: Springer US, 2006. p. 27–61.

LAU, Yit Nah; MOSELEY, Harry; IBBOTSON, Sally Helen. Topical photodynamic therapy for non-malignant skin conditions: experience from a university teaching hospital. *Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine*, v. 30, n. 5, p. 280–282, out. 2014.

LE, Thi Minh Phuc *et al.* Preparation of curcumin-loaded pluronic F127/chitosan nanoparticles for cancer therapy. *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology*, v. 4, n. 2, p. 25001, 2013.

LI, Zhiwei *et al.* PEG-functionalized iron oxide nanoclusters loaded with chlorin e6 for targeted, NIR light induced, photodynamic therapy. *Biomaterials*, v. 34, n. 36, p. 9160–9170, dez. 2013.

LIANG, Chao *et al.* Tumor Metastasis Inhibition by Imaging-Guided Photothermal Therapy with Single-Walled Carbon Nanotubes. *Advanced Materials*, v. 26, n. 32, p. 5646–5652, ago. 2014.

LIANG, Ruizheng *et al.* A supermolecular photosensitizer with excellent anticancer performance in photodynamic therapy. *Advanced Functional Materials*, v. 24, n. 21, p. 3144–3151, jun. 2014.

LILGE, Lothar; O'CARROLL, Cindy; WILSON, Brian C. A solubilization technique for photosensitizer quantification in ex vivo tissue samples. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v. 39, n. 3, p. 229–235, 1997.

LIN, Ta-Chun; LIN, Feng-Huei; LIN, Jui-Che. In vitro feasibility study of the use of a magnetic electrospun chitosan nanofiber composite for hyperthermia treatment of tumor cells. *Acta Biomaterialia*, v. 8, n. 7, p. 2704–2711, 2012.

LONGO, João Paulo F. *et al.* Photodynamic therapy disinfection of carious tissue mediated by aluminum-chloride-phthalocyanine entrapped in cationic liposomes: an in vitro and clinical study. *Lasers Med. Sci.*, v. 27, n. 3, p. 575–584, 2 maio 2012.

LONGO, João Paulo Figueiró *et al.* Photodynamic therapy with aluminum-chloro-phthalocyanine induces necrosis and vascular damage in mice tongue tumors. *J Photochem Photobiol B*, v. 94, n. 2, p. 143–146, 9 fev. 2009.

LYNCH, Iseult; DAWSON, Kenneth A. Protein-nanoparticle interactions. *Nano Today*, v. 3, n. 1, p. 40–47, 2008.

MA, Chunyu Y *et al.* Synthesis and hypochromic effect of phthalocyanines and metal phthalocyanines. *Dyes Pigm.*, v. 74, n. 1, p. 141–147, 2007.

MA, Xinxing *et al.* A functionalized graphene oxide-iron oxide nanocomposite for magnetically targeted drug delivery, photothermal therapy, and magnetic resonance imaging. *Nano Research*, v. 5, n. 3, p. 199–212, 11 mar. 2012.

MA, Yunn-Hwa *et al.* Magnetically targeted thrombolysis with recombinant tissue plasminogen activator bound to polyacrylic acid-coated nanoparticles. *Biomaterials*, v. 30, n. 19, p. 3343–3351, 2009.

MACAROFF, P.P. *et al.* Synthesis and Characterization of a Magnetic Nanoemulsion as a Promising Candidate for Cancer Treatment. *IEEE Transactions on Magnetics*, v. 42, n. 10, p. 3596–3598, out. 2006.

MAHENDRAN, V.; PHILIP, John. A methanol sensor based on stimulus-responsive magnetic nanoemulsions. *Sensors and Actuators B: Chemical*, v. 185, p. 488–495, 2013a.

MAHENDRAN, V.; PHILIP, John. Sensing of Biologically Important Cations Such as Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, and Fe<sup>3+</sup> Using Magnetic Nanoemulsions. *Langmuir*, v. 29, n. 13, p. 4252–4258, 2 abr.

2013b.

MARCIELLO, Marzia *et al.* Recent advances in the preparation and application of multifunctional iron oxide and liposome-based nanosystems for multimodal diagnosis and therapy. *Interface Focus*, v. 6, n. 6, 6 dez. 2016.

MIGNANI, Serge *et al.* Advances in Combination Therapies Based on Nanoparticles for Efficacious Cancer Treatment: An Analytical Report. *Biomacromolecules*, v. 16, n. 1, p. 1–27, 12 jan. 2015.

MIJAN, M C *et al.* Vascular Shutdown and Pro-inflammatory Cytokine Expression in Breast Cancer Tumors after Photodynamic Therapy Mediated by Nano-sized Liposomes Containing Aluminium-Chloride-Phthalocyanine. *J Nanomed Nanotechnol*, v. 5, n. 218, p. 2, 2014.

MIRANDA-VILELA, Ana Luisa *et al.* Dextran-functionalized magnetic fluid mediating magnetohyperthermia combined with preventive antioxidant pequi-oil supplementation: potential use against cancer. *Journal of biomedical nanotechnology*, v. 9, n. 7, p. 1261–71, jul. 2013.

MOGHIMI, S M; HUNTER, A C; ANDRESEN, T L. Factors controlling nanoparticle pharmacokinetics: an integrated analysis and perspective. *Annual review of pharmacology and toxicology*, v. 52, p. 481–503, 2012.

MORTIER, Kjell A *et al.* Adduct formation in quantitative bioanalysis: effect of ionization conditions on paclitaxel. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, v. 15, n. 4, p. 585–592, 2004.

MOSER, Frank Hans; THOMAS, Arthur Louis C N - QD441 .M6. *Phthalocyanine compounds*. New York,: Reinhold Pub. Co., 1963.

MOSMANN, Tim. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*, v. 65, n. 1, p. 55–63, 1983.

MUBOFU, Egid B. Castor oil as a potential renewable resource for the production of functional materials. *Sustainable Chemical Processes*, v. 4, n. 1, p. 11, 15 dez. 2016.

MUEHLMANN, Luis Alexandre *et al.* Aluminium-phthalocyanine chloride nanoemulsions for anticancer photodynamic therapy: Development and in vitro activity against monolayers and spheroids of human mammary adenocarcinoma MCF-7 cells. *J Nanobiotechnology*, v. 13, n. 1, p. 36, 13 dez. 2015.

MUEHLMANN, Luis Alexandre *et al.* Aluminum–phthalocyanine chloride associated to poly

(methyl vinyl ether-co-maleic anhydride) nanoparticles as a new third-generation photosensitizer for anticancer photodynamic therapy. *International journal of nanomedicine*, v. 9, p. 1199, 2014.

MÜLLER, Cristina; SCHIBLI, Roger. Single photon emission computed tomography tracer. *Molecular Imaging in Oncology*. Springer, 2013. p. 65–105.

MURPHY, Catherine J. *et al.* Gold Nanoparticles in Biology: Beyond Toxicity to Cellular Imaging. *Accounts of Chemical Research*, v. 41, n. 12, p. 1721–1730, 16 dez. 2008.

MUTZKE, Emily *et al.* Phagocytosis-coupled flow cytometry for detection and size discrimination of anionic polystyrene particles. *Analytical Biochemistry*, v. 483, p. 40–46, 2015.

NESAMONY, Jerry *et al.* Development and Characterization of Nanostructured Mists with Potential for Actively Targeting Poorly Water-Soluble Compounds into the Lungs. *Pharmaceutical Research*, v. 30, n. 10, p. 2625–2639, 31 out. 2013.

NEVRELOVA, Pavla *et al.* In vitro photodynamic effect by phthalocyanine in A549 cell line. 2 mar. 2007, [S.l: s.n.], 2 mar. 2007. p. 66042B–66042B–5.

NISHIYAMA, Nobuhiro *et al.* Enhanced photodynamic cancer treatment by supramolecular nanocarriers charged with dendrimer phthalocyanine. *Journal of Controlled Release*, v. 133, n. 3, p. 245–251, 10 fev. 2009.

NOORLANDER, Cornelle W *et al.* Horizon scan of nanomedicinal products. *Nanomedicine*, v. 10, n. 10, p. 1599–1608, maio 2015.

NUNES, S M T; SGUILLA, F S; TEDESCO, A C. Photophysical studies of zinc phthalocyanine and chloroaluminum phthalocyanine incorporated into liposomes in the presence of additives. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas*, v. 37, n. 2, p. 273–84, fev. 2004.

ODRIOZOLA-SERRANO, Isabel; OMS-OLIU, Gemma; MARTÍN-BELLOSO, Olga. Nanoemulsion-based delivery systems to improve functionality of lipophilic components. *Frontiers in nutrition*, v. 1, p. 24, 2014.

OGURA, Akihiro *et al.* Visualizing Trimming Dependence of Biodistribution and Kinetics with Homo- and Heterogeneous N-Glycoclusters on Fluorescent Albumin. *Scientific Reports*, v. 6, p. 21797, 23 fev. 2016.

OLIVEIRA, Líliam Teixeira *et al.* HPLC-FLD methods to quantify chloroaluminum phthalocyanine in nanoparticles, plasma and tissue: application in pharmacokinetic and biodistribution studies. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, v. 56, n. 1, p. 70–77, 25 ago. 2011.

OSTROWSKI, Anja *et al.* Overview about the localization of nanoparticles in tissue and cellular context by different imaging techniques. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, v. 6, n. 1, p. 263–280, 2015.

PALIWAL, Rishi; BABU, R Jayachandra; PALAKURTHI, Srinath. Nanomedicine scale-up technologies: feasibilities and challenges. *AAPS PharmSciTech*, v. 15, n. 6, p. 1527–34, dez. 2014.

PARK, Hyung; NA, Kun. Conjugation of the photosensitizer Chlorin e6 to pluronic F127 for enhanced cellular internalization for photodynamic therapy. *Biomaterials*, v. 34, n. 28, p. 6992–7000, set. 2013.

PARKINSON, Gareth S. Iron oxide surfaces. *Surface Science Reports*, v. 71, n. 1, p. 272–365, 2016.

PELKMANS, Lucas; KARTENBECK, Jürgen; HELENIUS, Ari. Caveolar endocytosis of simian virus 40 reveals a new two-step vesicular-transport pathway to the ER. *Nature Cell Biology*, v. 3, n. 5, p. 473–483, 1 maio 2001.

PETRYK, Aa *et al.* Iron oxide nanoparticle hyperthermia and chemotherapy cancer treatment. *Proceedings of SPIE--the International Society for Optical Engineering*, v. 7181, p. 71810N, 23 fev. 2009.

PFEIFFER, Christian *et al.* Interaction of colloidal nanoparticles with their local environment: the (ionic) nanoenvironment around nanoparticles is different from bulk and determines the physico-chemical properties of the nanoparticles. *Journal of the Royal Society, Interface*, v. 11, n. 96, p. 20130931, 6 jul. 2014.

PRIMO, Fernando L *et al.* Photosensitizer-loaded magnetic nanoemulsion for use in synergic photodynamic and magnetohyperthermia therapies of neoplastic cells. *Journal of nanoscience and nanotechnology*, v. 8, n. 11, p. 5873–5877, 2008.

PY-DANIEL, K R *et al.* Highly efficient photodynamic therapy colloidal system based on chloroaluminum phthalocyanine/pluronic micelles. *Eur J Pharm Biopharm*, v. 103, p. 23–31, 2016.

QUINTO, Christopher A *et al.* Multifunctional superparamagnetic iron oxide nanoparticles for combined chemotherapy and hyperthermia cancer treatment. *Nanoscale*, v. 7, n. 29, p. 12728–36, 7 ago. 2015.

QUMSEYA, Bashar J; DAVID, Waseem; WOLFSEN, Herbert C. Photodynamic Therapy for Barrett's Esophagus and Esophageal Carcinoma. *Clinical endoscopy*, v. 46, n. 1, p. 30–7, jan. 2013.

RAJENDRAN, Lawrence; KNÖLKER, Hans-Joachim; SIMONS, Kai. Subcellular targeting strategies for drug design and delivery. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 9, n. 1, p. 29–42, jan. 2010.

REUL, R *et al.* Near infrared labeling of PLGA for in vivo imaging of nanoparticles. *Polymer Chemistry*, v. 3, n. 3, p. 694–702, 2012.

RIBEIRO, C Accorsi. MTT Assay of High and low molecular weight hyaluronic acid with hydroxiapatite and b-tricalciumphosphate. 2014.

RIGUAL, Nestor R *et al.* Adjuvant intraoperative photodynamic therapy in head and neck cancer. *JAMA otolaryngology-- head & neck surgery*, v. 139, n. 7, p. 706–11, jul. 2013.

RILEY, J S *et al.* Prognostic and therapeutic relevance of FLIP and procaspase-8 overexpression in non-small cell lung cancer. *Cell Death and Disease*, v. 4, n. 12, p. e951, 5 dez. 2013.

ROCHA, Martha S T *et al.* Aluminum-chloride-phthalocyanine encapsulated in liposomes: activity against naturally occurring dog breast cancer cells. *Journal of biomedical nanotechnology*, v. 8, n. 2, p. 251–257, abr. 2012.

RODRIGUES, Mosar C *et al.* Photodynamic Therapy Based on Arrabidaea chica (Crajiro) Extract Nanoemulsion: In vitro Activity against Monolayers and Spheroids of Human Mammary Adenocarcinoma MCF-7 Cells. *Journal of Nanomedicine & Nanotechnology*, v. 6, n. 3, 2015.

RUIZ ESTRADA, Gladys Amalia. Desarrollo de un sistema de liberación de fármacos basado en nanopartículas magnéticas recubiertas con polietilenglicol para el tratamiento de diferentes enfermedades. 2014.

SADHUKHA, Tanmoy *et al.* Effective Elimination of Cancer Stem Cells by Magnetic Hyperthermia. *Molecular Pharmaceutics*, v. 10, n. 4, p. 1432–1441, abr. 2013.

SALUNKHE, A B; KHOT, V M; PAWAR, S H. Magnetic hyperthermia with magnetic nanoparticles: a status review. *Current topics in medicinal chemistry*, v. 14, n. 5, p. 572–94, mar. 2014.

SANGHA, R.; PRICE, J.; BUTTS, C. A. Adjuvant Therapy in Non-Small Cell Lung Cancer: Current and Future Directions. *The Oncologist*, v. 15, n. 8, p. 862–872, 1 ago. 2010.

SARGENT JR, John F. The National Nanotechnology Initiative: overview, reauthorization, and appropriations issues. 2013, [S.l.]: DTIC Document, 2013.

SHAO, Jingwei *et al.* Intracellular distribution and mechanisms of actions of photosensitizer Zinc(II)-phthalocyanine solubilized in Cremophor EL against human hepatocellular carcinoma HepG2 cells. *Cancer Letters*, v. 330, n. 1, p. 49–56, 1 mar. 2013.

SHARMA, Ashok Kumar *et al.* Dendrimer nanoarchitectures for cancer diagnosis and anticancer drug delivery. *Drug Discovery Today*, 2016.

SHIRMANOVA, M *et al.* In vivo study of photosensitizer pharmacokinetics by fluorescence transillumination imaging. *Journal of biomedical optics*, v. 15, n. 4, p. 48004–48008, 2010.

SIMONE, Charles B *et al.* Photodynamic therapy for the treatment of non-small cell lung cancer. *Journal of thoracic disease*, v. 4, n. 1, p. 63–75, fev. 2012.

SINGH, Neenu *et al.* Potential toxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPION). *Nano reviews*, v. 1, 2010.

SOUZA, Ludmilla Regina De *et al.* PVM / MA-shelled selol nanocapsules promote cell cycle arrest in A549 lung adenocarcinoma cells. *Journal of Nanomedicine & Nanotechnology*. 2014 Aug 23;12:32p. 1–17, 2014.

SUBIRATS, Xavier; ROSÉS, Martí; BOSCH, Elisabeth. On the Effect of Organic Solvent Composition on the pH of Buffered HPLC Mobile Phases and the  $pK_a$  of Analytes—A Review. *Separation & Purification Reviews*, v. 36, n. 3, p. 231–255, ago. 2007.

SWIERCZEWSKA, M. *et al.* Polysaccharide-based nanoparticles for theranostic nanomedicine. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 99, p. 70–84, 2016.

TABOGA SR, Calmon MF *et al.* High Efficacy in Hyperthermia-associated with Polyphosphate Magnetic Nanoparticles for Oral Cancer Treatment. *Journal of Nanomedicine & Nanotechnology*, v. 5, n. 3, p. 1–11, 2014.

TAŞLI, Pakize Neslihan *et al.* Effect of F68, F127, and P85 Pluronic Block Copolymers on Odontogenic Differentiation of Human Tooth Germ Stem Cells. *Journal of Endodontics*, v. 39, n. 10, p. 1265–1271, out. 2013.

TEDESCO, Antonio; ROTTA, Jeane; LUNARDI, Claire. Synthesis, Photophysical and Photochemical Aspects of Phthalocyanines for Photodynamic Therapy. *Current Organic Chemistry*, v. 7, n. 2, p. 187–196, 1 jan. 2003.

TEXIER, I *et al.* Cyanine-loaded lipid nanoparticles for improved in vivo fluorescence imaging. *Journal of biomedical optics*, v. 14, n. 5, p. 54005–54011, 2009.

THAKKAR, Hetal *et al.* Formulation and characterization of lipid-based drug delivery system of raloxifene-microemulsion and self-microemulsifying drug delivery system. *Journal of pharmacy & bioallied sciences*, v. 3, n. 3, p. 442–8, jul. 2011.

TOMBÁČZ, E *et al.* Magnetic iron oxide nanoparticles: Recent trends in design and synthesis of magnetoresponsive nanosystems. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2015.



TONG, R; KOHANE, D S. Shedding light on nanomedicine. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*, v. 4, n. 6, p. 638–662, 2012.

TREUEL, Lennart; JIANG, Xiue; NIENHAUS, Gerd Ulrich. New views on cellular uptake and trafficking of manufactured nanoparticles. *Journal of the Royal Society, Interface*, v. 10, n. 82, 6 maio 2013.

VAN ELK, Merel *et al.* Nanomedicines for advanced cancer treatments: Transitioning towards responsive systems. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 515, n. 1–2, p. 132–164, 30 dez. 2016.

VELLOSO, NV *et al.* Aluminum-phthalocyanine chloride-based photodynamic therapy inhibits PI3K/Akt/mTOR pathway in oral squamous cell carcinoma cells in vitro. *Chemotherapy* 1:107, 5, 2012

VERMA, Ruchi; KUMAR, Lalit; BHASKAR KURBA, Vijay. Green chemistry principles in organic compound synthesis and analysis. *International Journal of Pharmacological Research IJPR*, v. 4, n. 1, 2014.

VILLANUEVA, A. *et al.* Hyperthermia HeLa Cell Treatment with Silica-Coated Manganese Oxide Nanoparticles. *The Journal of Physical Chemistry C*, v. 114, n. 5, p. 1976–1981, 11 fev. 2010.

VILSINSKI, Bruno H. *et al.* Spectroscopic study of aluminum phthalocyanine chloride (alpccl) in homogeneous and micro-heterogeneous media consisting of p-123 and f-127 polymeric micelles. *Química Nova*, 2015.

VILSINSKI, Bruno Henrique *et al.* Formulation of Aluminum Chloride Phthalocyanine in Pluronic™ P-123 and F-127 Block Copolymer Micelles: Photophysical properties and Photodynamic Inactivation of Microorganisms. *Photochemistry and Photobiology*, v. 91, n. 3, p. 518–525, maio 2015.

WANG, Dongsheng *et al.* Targeted Iron-Oxide Nanoparticle for Photodynamic Therapy and Imaging of Head and Neck Cancer. *ACS Nano*, v. 8, n. 7, p. 6620–6632, 22 jul. 2014.

WANG, Fenglin *et al.* Recent Advances on Inorganic Nanoparticle-Based Cancer Therapeutic Agents. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, v. 13, n. 12, p. 1182, 25 nov. 2016.

WANG, Tiantian *et al.* Cellular Uptake of Nanoparticles by Membrane Penetration: A Study Combining Confocal Microscopy with FTIR Spectroelectrochemistry. *ACS Nano*, v. 6, n. 2, p. 1251–1259, 28 fev. 2012.

WANG, Yi-Xiang J *et al.* Recent advances in superparamagnetic iron oxide nanoparticles for cellular imaging and targeted therapy research. *Current pharmaceutical design*, v. 19, n. 37, p. 6575–93, 2013.

WANG, Yu *et al.* A fluorescence based method for the quantification of surface functional groups in closed micro- and nanofluidic channels. *Biomicrofluidics*, v. 7, n. 2, p. 26503, 2013.

WATANABE, Masatoshi *et al.* Effects of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> Magnetic Nanoparticles on A549 Cells. *International journal of molecular sciences*, v. 14, n. 8, p. 15546–60, 25 jul. 2013.

WATSON, J. Throck.; SPARKMAN, O. David (Orrin David). *Introduction to mass spectrometry : instrumentation, applications and strategies for data interpretation*. John Wiley & Sons, 2007.

WEISSLEDER, Ralph; NAHRENDORF, Matthias; PITTET, Mikael J. Imaging macrophages with nanoparticles. *Nature Materials*, v. 13, n. 2, p. 125–138, 23 jan. 2014.

WILHELMI, Verena *et al.* Zinc Oxide Nanoparticles Induce Necrosis and Apoptosis in Macrophages in a p47phox- and Nrf2-Independent Manner. *PLoS ONE*, v. 8, n. 6, p. e65704, 3 jun. 2013.

WILLIAMS, Ryan M *et al.* Mesoscale nanoparticles selectively target the renal proximal tubule epithelium. *Nano letters*, v. 15, n. 4, p. 2358–64, 8 abr. 2015.

WISCHKE, Christian; SCHWENDEMAN, Steven P. Principles of encapsulating hydrophobic drugs in PLA/PLGA microparticles. *International journal of pharmaceutics*, v. 364, n. 2, p. 298–327, 2008.

WOLFENDER, Jean-Luc. HPLC in Natural Product Analysis: The Detection Issue. *Planta Medica*, v. 75, n. 7, p. 719–734, 14 jun. 2009.

WU, Chunhung *et al.* Characterization of the PEO–PPO–PEO Triblock Copolymer and Its Application as a Separation Medium in Capillary Electrophoresis. *Macromolecules*, v. 30, p. 4574–4583, 1997.

WUNDER, A *et al.* Molecular imaging: novel tools in visualizing rheumatoid arthritis. *Rheumatology*, v. 44, n. 11, p. 1341–1349, 2005.

WUNDER, A; KLOHS, J. Non-invasive Optical Imaging in Small Animal Models of Stroke. *imaging*, v. 9, p. 10, 2010.

XIANG, Shengnan *et al.* Uptake mechanisms of non-viral gene delivery. *Journal of Controlled Release*, v. 158, n. 3, p. 371–378, 28 mar. 2012.

XIE, Jin; LEE, Seulki; CHEN, Xiaoyuan. Nanoparticle-based theranostic agents. *Advanced drug*

*delivery reviews*, v. 62, n. 11, p. 1064–79, 30 ago. 2010.

YOKOYAMA, Masayuki. Polymeric micelles as drug carriers: their lights and shadows. *Journal of Drug Targeting*, v. 22, n. 7, p. 576–583, 11 ago. 2014.

YUSUF, A K *et al.* Extraction and characterization of castor seed oil from wild ricinus communis linn,. *International Journal of Science, Environment and Technology*, v. 5, p. 1392–1404, 2015.

ZALOGA, Jan *et al.* Different Storage Conditions Influence Biocompatibility and Physicochemical Properties of Iron Oxide Nanoparticles. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 16, n. 5, p. 9368–9384, 24 abr. 2015.

ZECH, K *et al.* HPLC in pharmacokinetics and metabolism studies. *Chromatographia*, v. 12, n. 6, p. 354–358, 1979.

ZHANG, Xuanmiao *et al.* Lipid nanoemulsions loaded with doxorubicin-oleic acid ionic complex: characterization, in vitro and in vivo studies. *Die Pharmazie*, v. 66, n. 7, p. 496–505, jul. 2011.

ZHANG, Yi-Nan *et al.* Nanoparticle–liver interactions: Cellular uptake and hepatobiliary elimination. *Journal of Controlled Release*, v. 240, p. 332–348, 2016.


ZHAO, Hui *et al.* Nanoemulsion loaded with lycobetaine-oleic acid ionic complex: physicochemical characteristics, in vitro, in vivo evaluation, and antitumor activity. *International journal of nanomedicine*, v. 8, p. 1959–73, 2013.

ZHU, Yi-Xiang J *et al.* Enhanced cellular uptake of aminosilane-coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles in mammalian cell lines. *International Journal of Nanomedicine*, v. 7, p. 953, fev. 2012.

ZUCKER, R. M. *et al.* Detection of TiO<sub>2</sub> nanoparticles in cells by flow cytometry. *Cytometry Part A*, v. 77A, n. 7, p. 677–685, 17 jun. 2010.


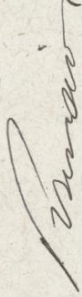
**Anexo 1. Certificado de autorização de Comissão de ética no uso animal da Universidade de Brasília.**


Brasília, 17 de novembro de 2014.

  
**Universidade de Brasília**  
Instituto de Ciências Biológicas  
Comissão de Ética no Uso Animal

**DECLARAÇÃO**

Declaramos que o projeto intitulado “**BIODISTRIBUIÇÃO IN VIVO E EX VIVO DE NANOSSISTEMAS UTILIZADOS NA TERAPIA FOTODINÂMICA**”, UnBDoC n.º 144446/2014, sob responsabilidade do Professor Ricardo Bentes de Azevedo foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília. Este projeto foi aprovado para utilização de Mus MUSCULUS: 178. A presente aprovação é válida pelo período de 20/11/2014 a 20/11/2016.

  
  
Prof. Dr. Rafael Plakoudi Souto Maior  
Coordenador da CEUA



\*Este documento se restringe à avaliação ética do projeto supracitado e não substitui outras licenças e permissões que porventura se façam necessárias.

## Produção bibliográfica relacionada ao trabalho:

(1) Artigo submetido e aceito com descrição de micelas de F127/AIClFt em terapia fotodinâmica

European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 103 (2016) 23–31



Contents lists available at ScienceDirect

European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/ejpb](http://www.elsevier.com/locate/ejpb)



Research paper

### Highly efficient photodynamic therapy colloidal system based on chloroaluminum phthalocyanine/pluronic micelles



Karen R. Py-Daniel<sup>a</sup>, Joy S. Namban<sup>b,1</sup>, Laise R. de Andrade<sup>a</sup>, Paulo E.N. de Souza<sup>b</sup>, Leonardo G. Paterno<sup>c</sup>, Ricardo B. Azevedo<sup>a</sup>, Maria A.G. Soler<sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup> Universidade de Brasília, Laboratório de Nanobiotecnologia, GEM-IB, Brasília, DF 70910-900, Brazil

<sup>b</sup> Universidade de Brasília, Instituto de Física, Brasília, DF 70910-900, Brazil

<sup>c</sup> Universidade de Brasília, Instituto de Química, Brasília, DF 70910-900, Brazil

#### ARTICLE INFO

##### Article history:

Received 12 October 2015

Revised 5 March 2016

Accepted in revised form 23 March 2016

Available online 24 March 2016

##### Keywords:

Photodynamic therapy  
Phthalocyanine  
Chloroaluminum phthalocyanine  
Drug delivery systems  
Pluronic F127  
Micelles  
Colloidal systems  
Photosensitizer

#### ABSTRACT

Phthalocyanine derivatives comprise the second generation of photosensitizer molecules employed in photodynamic therapy (PDT) and have attracted much attention due to their outstanding photosensitizing performance. Most phthalocyanines are hydrophobic compounds that require association to drug delivery systems for clinical use. In this study, formulations of Pluronic F127 micelles incorporated with chloroaluminum phthalocyanine, or else F127/AIClPc, were produced at optimized conditions aiming at efficient and biocompatible PDT colloidal systems. Absorption/emission spectroscopies, as well as dynamic light scattering were performed to evaluate the optimum conditions for the F127 micelle formation and AIClPc incorporation. The micelles formation was attained with F127 concentrations ranging from 50 to 150 mg mL<sup>-1</sup>. At these conditions, AIClPc photosensitizer molecules were encapsulated into the hydrophobic micelle core and, therefore, readily solubilized in physiological medium (PBS pH 7.2).

Encapsulation efficiency of about 90% resulted from different AIClPc concentrations. Identification of singlet oxygen production by irradiated F127/AIClPc formulations indicated good applicability for PDT. In vitro tests conducted with A549 human lung carcinoma cell line incubated with the F127/AIClPc formulations, at different AIClPc loadings, followed by only 18 min of light irradiation (660 nm LED, fluence of 25.3 J/cm<sup>2</sup>), showed a cellular damage as high as 90% for rather low dosages of AIClPc (0.1–5.0 µg mL<sup>-1</sup>). Further, no cytotoxicity occurred on non-irradiated cells. These findings suggest those F127/AIClPc formulations are highly promising for PDT applications, since they are easily prepared and the incubation and irradiation times are significantly shortened.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

#### 1. Introduction

Drug delivery systems (DDS) based on colloidal structures have become an emerging field of interest owing to their outstanding ability on transporting and delivering drugs, protection against degradation and/or excretion, and prevention of adverse side effects of toxic drugs [1,2]. Further, these colloid-based DDS can provide contrast agents for early diagnoses, delay the release of their content, and improve the therapeutic efficiency of drugs by enhancing their water solubility or by delivering them to specific targets. Examples of such carriers are micro/nanocapsules [3],

polymer–drug conjugates [4,5], liposomes [6], emulsions [7,8], magnetic nanoparticle [9,10] and polymeric micelles [11,12].

In the wide group of colloid-based DDS, a particular interest has been placed in polymeric micelles, which was first proposed by Dorn et al. [13]. A promising example is represented by Pluronic, a class of biocompatible, and non-toxic block copolymers [11]. Pluronic displays a triblock PEO–PPO–PEO structure (PEO: poly(ethylene oxide); PPO: poly(propylene oxide)), FDA approved, which is amphiphilic and known to form self-aggregate structures (micelles) with a hydrophobic PPO core and a hydrophilic PEO corona (Scheme 1). Pluronic micelles are obtained above a critical temperature or copolymer concentration as a consequence of the limited temperature solubility dependence of the PPO block [14]. In this form, the core represents a “cargo holder” for incorporation of therapeutic or diagnostic agents [11]. When are mixed with proper amounts of the Pluronic solution hydrophobic drug molecules accumulate into the hydrophobic PPO cores. Meanwhile,

\* Corresponding author.

E-mail address: [soler@unb.br](mailto:soler@unb.br) (M.A.G. Soler).

<sup>1</sup> Present address: Faculty at Nalanda Institute of Engineering and Technology, Guntur, Andhra Pradesh 522438, India.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2016.03.028>

0939-6411/© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

(2) Artigo submetido e aceito com descrição de uso de método cromatográfico citado no presente estudo para quantificação de AICfT em nanossistema.

Muehlmann et al. *Journal of Nanobiotechnology* (2015) 13:36  
DOI 10.1186/s12951-015-0095-3



RESEARCH

Open Access

## Aluminium-phthalocyanine chloride nanoemulsions for anticancer photodynamic therapy: Development and *in vitro* activity against monolayers and spheroids of human mammary adenocarcinoma MCF-7 cells

Luis Alexandre Muehlmann<sup>1†</sup>, Mosar Corrêa Rodrigues<sup>2†</sup>, João Paulo Figueiró Longo<sup>2</sup>, Mônica Pereira Garcia<sup>2</sup>, Karen Rapp Py-Daniel<sup>2</sup>, Aline Bessa Veloso<sup>3</sup>, Paulo Eduardo Narciso de Souza<sup>3</sup>, Sebastião William da Silva<sup>3</sup> and Ricardo Bentes Azevedo<sup>2\*</sup>

### Abstract

**Background:** Photodynamic therapy (PDT) combines light, molecular oxygen and a photosensitizer to induce oxidative stress in target cells. Certain hydrophobic photosensitizers, such as aluminium-phthalocyanine chloride (AlPc), have significant potential for antitumor PDT applications. However, hydrophobic molecules often require drug-delivery systems, such as nanostructures, to improve their pharmacokinetic properties and to prevent aggregation, which has a quenching effect on the photoemission properties in aqueous media. As a result, this work aims to develop and test the efficacy of an AlPc in the form of a nanoemulsion to enable its use in anticancer PDT.

**Results:** The nanoemulsion was developed using castor oil and Cremophor ELP®, and a monodisperse population of nanodroplets with a hydrodynamic diameter of approximately 25 nm was obtained. While free AlPc failed to show significant activity against human breast adenocarcinoma MCF-7 cells in an *in vitro* PDT assay, the AlPc in the nanoemulsion showed intense photodynamic activity. Photoactivated AlPc exhibited a 50 % cytotoxicity concentration (CC50) of 6.0 nM when applied to MCF-7 cell monolayers and exerted a powerful cytotoxic effect on MCF-7 cell spheroids.

**Conclusion:** Through the use of spontaneous emulsification, a stable AlPc nanoemulsion was developed that exhibits strong *in vitro* photodynamic activity on cancer cells.

**Keywords:** Spontaneous emulsification, Cancer, Drug delivery systems, Third-generation photosensitizers, Human breast adenocarcinoma MCF-7 cells, Spheroids

### Background

Photodynamic therapy (PDT), as a cancer-treatment method, has a series of advantages over approaches such as surgery, chemotherapy and radiotherapy, as discussed elsewhere [1–5]. PDT is based on the production of oxidative species by a photosensitizer (PS), which is a

molecule capable of converting specific light energy into chemical potential. In aerobic cells, the photoactivation of PS by a specific, targeted light source converts triplet oxygen (<sup>3</sup>O<sub>2</sub>) into the strongly oxidative species singlet oxygen (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>), thereby triggering oxidative stress [2]. The oxidative stress has the potential to induce cell death or a therapeutically significant stress response. Thus, PDT anticancer mechanisms can include direct induction of cancer-cell death [6–8], vascular blockage with subsequent tumour ischemia [9], and increased immune response to tumour antigens [1, 2, 10].

\* Correspondence: razevedo@unb.br

<sup>†</sup>Equal contributors

<sup>2</sup>Department of Genetics and Morphology, Institute of Biological Sciences, University of Brasília, Federal District, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article



© 2015 Muehlmann et al.; licensee BioMed Central. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly credited. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.