



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

TALITA CESARIM MENDONÇA

**TERAPIA FOTODINÂMICA COM FTALOCIANINA DE CLORO-ALUMÍNIO EM
CARREADORES LIPÍDICOS NANOESTRUTURADOS CONTENDO
DOXORRUBICINA PARA TRATAMENTO DO CÂNCER DE MAMA**

CAMPINAS

2024

TALITA CESARIM MENDONÇA

**TERAPIA FOTODINÂMICA COM FTALOCIANINA DE CLORO-ALUMÍNIO EM
CARREADORES LIPÍDICOS NANOESTRUTURADOS CONTENDO
DOXORRUBICINA PARA TRATAMENTO DO CÂNCER DE MAMA**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestra em Biologia Molecular e Morfofuncional, na Área de Bioquímica.

Orientadora: Dra. Eneida De Paula

Coorientadora: Dra. Ludmilla David De Moura

ARQUIVO DIGITAL CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO
DEFENDIDA PELA ALUNA TALITA
CESARIM MENDONÇA E ORIENTADA
PELA PROFA. DRA. ENEIDA DE PAULA.

CAMPINAS

2024

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

M523t Mendonça, Talita Cesarim, 1991-
Terapia fotodinâmica com ftalocianina de cloro-alumínio em carreadores
lipídicos nanoestruturados contendo doxorubicina para o tratamento do câncer
de mama / Talita Cesarim Mendonça. – Campinas, SP : [s.n.], 2024.

Orientador: Eneida de Paula.
Coorientador: Ludmilla David de Moura.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas
(UNICAMP), Instituto de Biologia.

1. Mamas - Câncer. 2. Carregadores lipídicos nanoestruturados. 3.
Fotoquimioterapia. 4. Doxorubicina. 5. Ftalocianina de cloro-alumínio. I. Paula,
Eneida de, 1963-. II. Moura, Ludmilla David de, 1991-. III. Universidade
Estadual de Campinas (UNICAMP). Instituto de Biologia. IV. Título.

Informações Complementares

Título em outro idioma: Photodynamic therapy with chlorine-aluminum phthalocyanine in
nanostructured lipid carriers containing doxorubicin for the treatment of breast cancer

Palavras-chave em inglês:

Breast - Cancer

Nanostructured lipidic carriers

Photochemotherapy

Doxorubicin

Chloroaluminum phthalocyanine

Área de concentração: Bioquímica

Titulação: Mestra em Biologia Molecular e Morfofuncional

Banca examinadora:

Eneida de Paula [Orientador]

Viviane Aparecida Guilherme Damasio

Wagner Jose Favaro

Data de defesa: 31-07-2024

Programa de Pós-Graduação: Biologia Molecular e Morfofuncional

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-3513-1022>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/8275145768354076>

Campinas, 31 de julho de 2024.

COMISSÃO EXAMINADORA

Dra. Eneida de Paula - Orientadora

Dr. Wagner José Fávaro - Universidade Estadual de Campinas

Dra Viviane Aparecida Guilherme Damásio – Centro Universitário Adventista de São Paulo

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica da aluna.

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa de Biologia Molecular e Morfofuncional do Instituto de Biologia da Unicamp.

Dedico este trabalho, a meu Pai, Carlos Almeida de Mendonça (in memoriam) que foi levado por Deus, que o amou mais do que nós. Ele foi vítima dessa doença.... Dedico ainda a todas as pessoas que passam por essa trajetória.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, Jesus Cristo pela força e coragem não só nesta como em todas as demais conquistas durante a minha caminhada. Muitas das vezes, me sentia como um leão, pois tu estavas comigo.

Aos meus Pais, Penha e Carlos (in memoriam), por me proverem de ensinamentos para a vida, e meus irmãos, que são meus melhores e maiores presentes. Em especial à minha mãe, pelo companheirismo em todos os aspectos da minha vida, pelo apoio fosse nos maus ou bons momentos. Mãe, só você é meu abrigo!

Agradeço ao meu Pai que, faleceu em março de 2023, vítima do câncer. Obrigada por ser meu Melhor Amigo, por sempre estar comigo. Obrigada por me deixar despedir de você naquele 07/03/2023, às 15:00 h. Você esperou até o momento da minha chegada. Te amarei para sempre. Continuarei a lutar pela ciência, como você dizia.

Sou muito agradecida aos meus irmãos, Tarsis e Tales, por serem os verdadeiros homens de coragem e braveza e por existirem em minha vida.

Aos amigos e familiares que, embora saudosos, souberam entender a importância deste momento de trabalho, que por vezes exigiu minha ausência.

À minha Orientadora Dra. Eneida de Paula, que me acolheu de braços abertos, me conduzindo pelos caminhos da pesquisa com paciência e sabedoria, tornando possível a realização do trabalho. Orgulho-me de ter desenvolvido este estudo sob sua orientação. Lhe agradeço, acima de tudo, por ter sido responsável pelo meu amadurecimento profissional e pessoal e pela confiança depositada ao longo destes anos, você é uma profissional única e excepcional!

Agradeço à minha coorientadora Dra. Ludmilla David de Moura, pela grande oportunidade a mim concedida, pelo acolhimento e apoio. Obrigada por contribuir com a minha evolução profissional, por compartilhar seus conhecimentos e experiências. Agradeço de todo meu coração pelos dias de reuniões, por todas as orientações e pelo carinho. Você é minha Irmã de Alma. Sem Palavras pela sua existência.

À minha querida Fabíola, muito grata pela sua vida e amizade, “você não existe”. Obrigada por realmente ser minha amiga, minha irmã. Obrigada porque, mesmo com todas as dificuldades ... você acreditou. Obrigada por cuidar do Meu Pai naquele janeiro e fevereiro de 2022. Nunca esquecerei.

Aos amigos do laboratório de Biomembranas, Gabriela Gerônimo, Gustavo Henrique, Hery Mitsutake, Fernando, Vivi, Juliana, Maria Fernanda e Mayumi pela disposição e prontidão,

transferindo seus saberes com muito empenho. Obrigada pela amizade e companheirismo, vocês tornam os meus dias mais alegres!

Agradeço ao meu amigo Helon por me passar ensinamentos sobre microscopia confocal, ensaio clonogênico e de migração celular.

Ao professor Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira, do Laboratório de Regeneração Nervosa, pelos ensaios de microscopia eletrônica transmissão, o meu muito obrigada.

À querida Elzira Elizabeth Saviani que, mesmo não sendo nossa técnica, com dedicação nos ajudou muito.

A você, meu Amor Lucas, que chegou no ano de 2023, a tempo de conhecer um dos maiores exemplos de homem com quem já convivi (meu Pai). Obrigada pela sua existência, pela sua alegria, pelo seu Amor. Deus me presenteou com a sua pessoa. Agradeço por me incluir em sua família, que tem essas joias maravilhosas: Fran, Elisa, João.

Ao CNPEM, incluindo a técnica de Criomicroscopia, Gisele, o meu agradecimento por todo empenho daquela tarde de análises.

Ao LACTAD, pelas análises de microscopia confocal.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão de bolsa de Mestrado (Processo nº 2021/02617-1) e pelo auxílio financeiro fornecido para a realização do presente estudo.

Muito obrigada nunca será suficiente para demonstrar a grandeza do que recebi de vocês! Por fim, deixo minha gratidão a todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para realização deste trabalho.

“Todo mundo é um gênio. Mas, se você julgar um peixe por sua capacidade de subir em uma árvore, ele vai passar toda a sua vida acreditando que é estúpido”.

Albert Einstein

RESUMO

Desde os anos 90, o câncer de mama é a neoplasia sólida mais frequente entre as mulheres no mundo todo, sendo a segunda causa de morte mais comum por câncer, neste grupo. A doxorrubicina (DOX) é um antibiótico antineoplásico do grupo das antraciclinas amplamente utilizada no tratamento do câncer de mama e com significativa atividade contra tumores refratários a outros fármacos. Outra terapêutica que tem sido explorada em oncologia é a terapia fotodinâmica (TFD), na qual uma reação fotoquímica causa destruição seletiva de um tecido, após irradiação de um agente fotossensibilizador. Os carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) são nanopartículas constituídas por uma mistura de lipídios (sólido e líquido) e estabilizadas por um tensoativo. CLN são eficientes para encapsular moléculas pouco solúveis em água, como a DOX e fotossensibilizadores como a ftalocianina de cloro-alumínio (FtClAl). A presente pesquisa teve como objetivo o desenvolvimento de formulação otimizada de carreadores lipídicos nanoestruturados contendo o quimioterápico DOX e o fotossensibilizador FtClAl, visando tratamento do câncer de mama. Formulações foram preparadas por planejamento experimental para escolha daquela otimizada (CLN_{DOX/FtClAl}) e seus controles: (CLN_{DOX}, CLN_{FtClAl}, CLN_{CTL}) que foram caracterizadas quanto ao tamanho, índices de polidispersão (PDI e Span), potencial Zeta (PZ) número de nanopartículas em suspensão, pH, por espectroscopia no infravermelho e criomicroscopia eletrônica. A formulação otimizada apresentou população monodispersa (PDI de $0,16 \pm 0,03$ e *Span* de 0,55) de partículas com diâmetro médio de $160,8 \pm 1,9$ nm, PZ de $-27,0 \pm 0,9$ mV, concentração de $5,30 \pm 0,01 \times 10^{13}$ /mL e pH médio de $5,30 \pm 0,01$, morfologia esférica e estabilidade de prateleira de 12 meses, quando armazenada sob refrigeração (2-8°C) ou temperatura ambiente (25°C). Posteriormente, foi realizado o estudo *in vitro* para avaliação da citotoxicidade das nanoformulações, em duas linhagens de adenocarcinoma mamário: murino (4T1) e humano (MCF-7), além de fibroblastos murinos normais (NIH/3T3), pelo método de MTT, análise morfológica das células pós-tratamento, ensaio clonogênico e internalização das CLN por microscopia de fluorescência. Nestes testes também foram testadas as potências (9 e 18 J/cm²) do LED de 660 nm usado para aplicação da TFD. CLN_{FtClAl} e CLN_{DOX/FtClAl} foram tóxicas para ambas as linhagens de câncer de mama testadas, com efeito exacerbado após irradiação, tanto nos ensaios de viabilidade celular quanto nos ensaios de aderência celular. Ensaios de microscopia confocal demonstraram a internalização das CLN_{FtClAl} e CLN_{DOX/FtClAl} no citoplasma células 4T1-luc. Assim, neste trabalho foi desenvolvida formulação de base nanotecnológica, contendo um quimioterápico e um fotossensibilizador, que se mostrou estável, eficiente e com grande potencial para futura aplicação *in vivo* no tratamento do câncer de mama.

Palavras-chaves: câncer de mama, carreadores lipídicos nanoestruturados, terapia fotodinâmica, doxorrubicina, ftalocianina de cloro-alumínio.

ABSTRACT

Since the 1990s, breast cancer has been the most common solid neoplasm among women worldwide and is the second most common cause of cancer-related death in this group. Doxorubicin (DOX) is an antineoplastic antibiotic from the anthracycline group widely used in the treatment of breast cancer and with significant activity against tumors refractory to other drugs. Another therapy that has been explored in oncology is photodynamic therapy (PDT), in which a photochemical reaction causes selective destruction of tissue after irradiation with a photosensitizing agent. Nanostructured lipid carriers (NLC) are nanoparticles consisting of a mixture of lipids (solid and liquid) and stabilized by a surfactant. NLC are efficient for encapsulating molecules that are poorly soluble in water, such as DOX, and photosensitizers such as chloroaluminum phthalocyanine (FtClAl). The present research aimed to develop an optimized formulation of nanostructured lipid carriers containing the chemotherapeutic agent DOX and the photosensitizer FtClAl, aiming at the treatment of breast cancer. Formulations were prepared by experimental planning to choose the optimized one (NLC_{DOX/FtClAl}) and its controls: (NLC_{DOX}, NLC_{FtClAl}, NLC_{CTL}) that were characterized by size, polydispersity indices (PDI and Span), Zeta potential (ZP), number of nanoparticles in suspension, pH, by infrared spectroscopy and electron cryomicroscopy. The optimized formulation presented a monodisperse population (PDI of 0.16 ± 0.03 and Span of 0.55) of particles with a mean diameter of 160.8 ± 1.9 nm, PZ of -27.0 ± 0.9 mV, concentration of $5.30 \pm 0.01 \times 10^6$ /mL and mean pH of 5.30 ± 0.01 , spherical morphology and shelf stability of 12 months, when stored under refrigeration (2-8°C) or room temperature (25°C). Subsequently, an *in vitro* study was carried out to evaluate the cytotoxicity of the nanoformulations, in two breast adenocarcinoma cell lines: murine (4T1) and human (MCF-7), in addition to normal murine fibroblasts (NIH/3T3), by the MTT method, clonogenic tests, morphological analysis of post-treatment cells and CLN internalization by fluorescence microscopy. In these tests, the power of the 660 nm LED (9 and 18 J/cm²) used for PDT application was also evaluated. NLC_{FtClAl} and NLC_{DOX/FtClAl} were found toxic to both breast cancer cell lines tested, with an effect exacerbated after irradiation, both in cell viability tests as in clonogenic essays. Cell internalization was demonstrated by confocal microscopy, the nanoparticles being found in the cytoplasm of 4T1-luc cells. In this work, a nanotechnology-based formulation was developed, containing a chemotherapeutic agent and a photosensitizer, which proved to be stable, efficient and with great potential for future *in vivo* application, addressing the treatment for breast cancer.

Keywords: breast cancer, nanostructured lipid carriers, photodynamic therapy, doxorubicin, chloroaluminum phthalocyanine.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática das principais características das células tumorais (adaptado de HANAHAN & WEINBERG, 2011).	19
Figura 2 - Estágios representativos das neoplasias de mama até a evolução de metástase (adaptado de BOIX-MONTESINOS et al., 2021).	21
Figura 3 - Esquema geral de mecanismos fotofísicos clássicos em terapia fotodinâmica (TFD). O fotossensibilizador absorve a energia da luz para saltar do estado fundamental para o estado excitado singlete, que então passa ao estado excitado tripleto – de maior tempo de vida- através de cruzamento intersistemas e, finalmente, gera espécies reativas de oxigênio através de reação do tipo I (por transferências de elétrons) ou reação tipo II (transferência de energia). Adaptado de HUA et al., 2021.	25
Figura 4 - (A) Estrutura geral de fotossensibilizantes da classe de ftalocianinas; (B) Estrutura química da ftalocianina de cloro-alumínio (adaptado de VELLOSO et al., 2009).	27
Figura 5 - Representação esquemática de um Carreador Lipídico nanoestruturado (CLN), constituído por LL, LS e surfactante.	30
Figura 6 - Estrutura molecular da doxorrubicina.	32
Figura 7 - Esquema geral do preparo dos CLN, pelo método de emulsificação-ultrassonicação.	39
Figura 8 - Equipamento de espectroscopia de correlação por fótons (DLS) ZetaSizer Nano ZS 90.	39
Figura 9 - Equipamento NanoSight NS300 Malvern, utilizado para as análises de NTA.	40
Figura 10 - Imagem mostrando irradiação em condições padronizadas (LED de 660 nm a 10 cm de distância) da placa de cultura de células de 96 poços.	45
Figura 11 - Superfície de resposta 3D para a resposta tamanho (size) das partículas de CLN. Efeito das variáveis TL e surfactante (A), surfactante e fotossensibilizador (B) e TL e fotossensibilizador (C).	49
Figura 12 - Gráfico de superfície de respostas 3D para o parâmetro PDI, mostrando o efeito das variáveis surfactante e fotossensibilizador.	50
Figura 13 - Superfície de resposta 3D para a resposta Potencial Zeta. Efeito das variáveis TL e lipídio líquido (A), surfactante e fotossensibilizador (B).	51
Figura 14 - Gráfico de desejabilidade para escolha da formulação otimizada de CLN _{DOX/FtCIAI}	52
Figura 15 - Otimização simultânea das respostas (azul) e valores ótimos das variáveis independentes (vermelho).	52
Figura 16 - Gráfico de Design Space. Regiões expansivas de domínio experimental indicando as respostas de tamanho, PDI e PZ da formulação de CLN otimizada.	53
Figura 17 - Fotos da formulação otimizada CLN _{DOX/FtCIAI} (D) e seus controles: CLN _{CTL} (A), CLN _{DOX} (B), CLN _{FtCIAI} (C).	54
Figura 18 - Estabilidade das formulações CLN _{CTL} , CLN _{DOX} , CLN _{FtCIAI} e CLN _{DOX/FtCIAI} , analisada considerando-se alterações no tamanho (A e B), PDI (C e D), PZ (E e F) e pH (G e H) durante 12 meses de armazenamento nas temperaturas de 25 °C (esquerda) e 2-8°C (direita).	56

Figura 19 - Concentração de partículas/mL (A e B) e variação de tamanho (C e D), medidas por NTA nas formulações CLN _{CTL} , CLN _{DOX} , CLN _{FtCIAI} e CLN _{DOX/FtCIAI} , durante 12 meses de armazenamento a 25 °C (A e C) ou 2-8°C (B e D).	59
Figura 20 - Imagem ilustrativa do carreador lipídico nanoestruturado CLN _{DOX/FtCIAI} com os fármacos (DOX e FtCIAI).	60
Figura 21 - Fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de transmissão (TEM), mostrando a morfologia das nanopartículas. (A e B) CLN _{CTL} , (C e D) CLN _{FtCIAI} , (E e F) CLN _{DOX} e (G e H) CLN _{DOX/FtCIAI} . Magnificação: 30.000 × (A, C, E e G) e 48.000 x (B, D, F e H).	61
Figura 22 - Histogramas das frequências de distribuição de tamanhos das nanopartículas: CLN _{DOX} (A), CLN _{DOX/FtCIAI} (B), CLN _{FtCIAI} (C) e CLN _{CTL} (D), pelas análises de MET (Fig. 21). Software GraphPadPrisma 10.2.3. Dados de média e erro-padrão (+/-).	62
Figura 23 - Criomicroscopia eletrônica de transmissão dos carreadores lipídicos nanoestruturados compostos por lipídios sintéticos, CLN _{CTL} (A), CLN _{FtCIAI} (B) e CLN _{DOX/FtCIAI} (C). Magnificação 100.000x (A-C).	63
Figura 24 - Frequência de distribuição em função dos tamanhos das nanopartículas: CLN _{CTL} (A), CLN _{FtCIAI} (B) e CLN _{DOX/FtCIAI} (C), das micrografias obtidas por Cryo-TEM (Fig. 23).	64
Figura 25 - Curvas de TGA das amostras DOX (azul); MM (vermelho); FtCIAI (preto); P188 (verde); mistura física-DOX/FtCIAI (rosa); mistura física-CTL (traçado vermelho); CLN _{DOX/FtCIAI} (traçado preto); CLN _{CTL} (traçado rosa).	65
Figura 26 - Medidas de FTIR acopladas à TGA, entre 237-239 °C, das amostras DOX (azul); MM (vermelho); FtCIAI (preto); surfactante P188 (verde); mistura física-DOX/FtCIAI (rosa); mistura física-CTL (traçado vermelho); CLN _{DOX/FtCIAI} (traçado preto); CLN _{CTL} (traçado rosa).	66
Figura 27 - Espectros Raman obtidos com a mistura física controle (linha verde), CLN _{CTL} (linha roxa), surfactante P188 (linha laranja), miristato de miristila (linha marrom) e Miglyol 812 (linha azul).	67
Figura 28 - Histogramas obtidos por espectroscopia Raman de imagens - da mistura física controle (A) e CLN _{CTL} (B) – e mapas volumétricos da mistura física controle (C) e CLN _{CTL} (D). Análises dos componentes: lipídios líquidos (Miglyol 812-MG), sólido (miristato de miristila - MM) e surfactante (P188).	69
Figura 29 - Produção de oxigênio singlete, medida pelo teste de DPBF nas formulações (CLN _{CTL} , CLN _{DOX} , CLN _{FtCIAI} , CLN _{DOX/FtCIAI} , DOX, FtCIAI, DOX/FtCIAI) após irradiação. Os dados foram ajustados por modelo estatístico de regressão não linear, com variação significativa ($p < 0,0001$) em relação a amostras sem FtCIAI.	70
Figura 30 - Variação na concentração de MDA entre as formulações de CLN: sem irradiação (A) e com irradiação de 18J/cm ² (B). Formação de cromóforo avermelhado, pela reação dos endoperoxídeos com TBA (C).	71
Figura 31 - Viabilidade celular após exposição das células de fibroblastos murinos (NIH/3T3) por 30 min. às formulações (CLN _{DOX} , CLN _{FtCIAI} , CLN _{DOX/FtCIAI} , CLN _{CTL}) e seus respectivos controles (ativos livres e etanol), em concentrações seriadas (0,05-50 µM de DOX e/ou FtCIAI), sem ou com irradiação (com LED de 660nm, por. 6 min a 9 ou 18 J/cm ²). Análise estatística por Two-way ANOVA mais post hoc de Tukey-Kramer. *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.	73

Figura 32 - Viabilidade celular após exposição das células de **adenocarcinoma mamário murino (4T1-luc)** por 30 min. às formulações (CLN_{DOX}, CLN_{FtClAl}, CLN_{DOX/FtClAl}, CLN_{CTL}) e seus respectivos controles (ativos livres e etanol), em concentrações seriadas (0,05-50 µM de DOX e/ou FtClAl), sem ou com irradiação (com LED de 660nm, por. 6 min a 9 ou 18 J/cm²). Análise estatística por Two-way ANOVA mais post hoc de Tukey-Kramer. ** p < 0,01; *** p < 0,001, **** p < 0,0001..... 76

Figura 33 - Viabilidade celular após exposição das células de **adenocarcinoma mamário humano (MCF-7)** por 30 min. às formulações (CLN_{DOX}, CLN_{FtClAl}, CLN_{DOX/FtClAl}, CLN_{CTL}) e seus respectivos controles (ativos livres e etanol), em concentrações seriadas (0,05-50 µM de DOX e/ou FtClAl), sem ou com irradiação (com LED de 660nm, por. 6 min a 9 ou 18 J/cm²). Análise estatística por Two-way ANOVA mais post hoc de Tukey-Kramer. *** p < 0,001, **** p < 0,0001..... 79

Figura 34 - Efeito do tratamento com as formulações (CLN_{DOX}, CLN_{FtClAl}, CLN_{DOX/FtClAl}, CLN_{CTL}) e seus respectivos controles (DOX, FtClAl, DOX/FtClAl e CTL) na capacidade das células 4T1-LUC (A) e MCF-7 (B) de formarem colônias. CTL refere-se a células sem tratamento. As células foram tratadas na concentração de IC₅₀ por 24 h; a aderência foi verificada após 14 dias, nas células que sobreviveram aos tratamentos. 83

Figura 35 - Imagens de microscopia confocal, mostrando acúmulo e localização subcelular, em células de adenocarcinoma mamário murino (4t1-luciferase) expostas às nanoformulações contendo FtClAl e/ou DOX. **A)** tratadas com CLN_{DOX/FtClAl} e coradas com DAPI (núcleos celulares em azul); Faloidina (marcação do citoesqueleto em verde); DOX (em vermelho) e FtClAl (em azul celeste); com análise de sobreposição (merge), para os tempos de 30 min, 1h, 2h e 4h. **B)** tratadas com CLN_{FtClAl} e coradas com DAPI faloidina e FtClAl; com análise de sobreposição para os tempos de 30 min, 1h, 2h e 4h. **C)** tratadas com CLN_{DOX} e coradas com DAPI, faloidina e DOX com análise de sobreposição para os tempos de 30 min e 1h. As imagens foram colhidas levando-se em consideração os comprimentos de onda de excitação e emissão de cada fármaco (DOX - Ex: λ = 480 nm e Em: λ = 560 nm; FtClAl - Em: λ = 610 nm e Ex: λ = 680 nm). As imagens foram obtidas em uma magnitude de 40x e tratadas com o software ImageJ® (NIH, Bethesda, EUA)..... 86

Figura 36 - Fotomicrografias de ensaio de migração celular de células 4T1-luc após 24 horas de tratamento com CLN_{DOX}, CLN_{FtClAl}, CLN_{DOX/FtClAl}, em comparação com CLN_{CTL}. CTL refere-se a células sem tratamento..... 88

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação dos subtipos moleculares do câncer de mama e resposta a diferentes terapias (adaptado de NASCIMENTO, OTONI, 2020).	28
Tabela 2 - Níveis das variáveis independentes ("inputs") de processo e critérios desejáveis das propriedades de interesse (respostas esperadas, variáveis dependentes) no planejamento experimental dos CLN.....	37
Tabela 3 - Planejamento composto central (CCD), mostrando as variáveis independentes: % Total de Lipídio (TL), % de lipídio líquido (LL), % de P188 (surfactante: em relação total de lípidios) e concentração de Ftalocianina Cloro-alumínio (FtClAl), além das respostas obtidas (tamanho, polidispersão (PDI) e potencial Zeta (PZ) das partículas	47
Tabela 4 - Composição final da formulação otimizada de CLN _{DOX/FtClAl} e respectivos controles, de acordo com o planejamento experimental. MM=Miristato de Miristila; MG= Miglyol 812.	53
Tabela 5 - Análise de tamanho, PDI, PZ e pH da formulação otimizada e seus controles.	55
Tabela 6 - Análise do tamanho, dispersão de tamanho em 10% (D10), 50% (D50) e 90% (D90) da população de partículas, índice Span (polidispersão), e concentração de partículas/mL, medidas por NTA nas formulações.	58
Tabela 7 - Estimativa do número de moléculas de excipientes por CLN, calculadas a partir de sua concentração molar na formulação e do número de partículas/mL, medido pela técnica de NTA.	60
Tabela 8 - Valores de IC ₅₀ determinados em fibroblastos NIH-3T3 após tratamento com as nanoformulações, DOX e FtClAl livres e com etanol, sem e com irradiação (9 ou 18 J/cm ²) para TFD. Análise feita com o software GraphPad Prisma 10.2.3.....	74
Tabela 9 - Valores de IC ₅₀ em µM determinados contra células 4T1-luc nas condições de – sem TFD, com TFD a 9 J/cm ² e 18 J/cm ² . Análise feita com o software GraphPad Prisma 10.2.3.	77
Tabela 10 - Valores de IC ₅₀ determinados para contra células MCF-7 nas condições: sem TFD, com TFD a 9 J/cm ² e 18 J/cm ² . Análise feita com o software GraphPad Prisma 10.2.3.	80

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CCD	<i>Planejamento de Composto Central (Central Component Design)</i>
CLN	<i>Carreadores lipídicos nanoestruturados</i>
CLN_{CTL}	<i>Carreadores lipídicos nanoestruturados (controle, sem fármacos)</i>
CLN_{DOX}	<i>Carreadores lipídicos nanoestruturados com Doxorubicina</i>
CLN_{DOX/FtCIAI}	<i>Carreadores lipídicos nanoestruturados com Doxorubicina e Ftalocianina de Cloro-Alumínio</i>
CLN_{FtCIAI}	<i>Carreadores lipídicos nanoestruturados com ftalocianina Cloro-alumínio</i>
CM	<i>Câncer de mama</i>
Cryo-TEM	<i>Criomicroscopia</i>
DAMPs	<i>Padrões moleculares associados ao dano</i>
DDS	<i>Sistemas de entrega de fármacos, (Drug delivery systems)</i>
DLS	<i>Espectroscópica de correlação por fótons (Dynamic light scattering)</i>
DoE	<i>Planejamento Experimental (Design of Experiments).</i>
DOX	<i>Doxorubicina</i>
DPBF	<i>1,3-difenil-isobenzofurano</i>
EGFR2	<i>Receptor do fator de crescimento epidérmico 2</i>
ER	<i>Receptor de Estrogênio</i>
FS	<i>Fotossensibilizador</i>
FtCIAI	<i>Ftalocianina de Cloro-Alumínio</i>
IC₅₀	<i>Concentração para inibição de 50% da sobrevivência celular</i>
LL	<i>Lipídio líquido</i>
LS	<i>Lipídio sólido</i>
MCF-7	<i>Linhagem de adenocarcinoma de mama humano</i>
MDA	<i>Malondialdeído</i>
MG	<i>Miglyol 812®</i>
MM	<i>Miristato de miristila</i>
MTT	<i>Brometo de 3-4,5-dimetil-tiazol-2-il-2,5- difeniltetrazólio</i>
NIH-3T3	<i>Linhagem de fibroblastos murinos</i>
NTA	<i>Análise por rastreamento de nanopartículas (Nanotracking analysis)</i>
PDI	<i>Índice de polidispersão</i>
PR	<i>Receptor de progesterona</i>
PZ	<i>Potencial Zeta</i>
ROS	<i>Espécies Reativas de Oxigênio</i>
SPAN	<i>Índice da largura da polidispersão de tamanho de partículas</i>
TBA	<i>2-tiobarbitúrico</i>
TEM	<i>Microscopia Eletrônica de Transmissão</i>
TEP	<i>Tetraetoxipropano</i>
TFD	<i>Terapia fotodinâmica</i>
TGA-FTIR	<i>Análise termogravimétrica- Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier</i>
TME	<i>Microambiente tumoral</i>
TNBC	<i>Câncer de mama triplo negativo (Triple negative Breast Cancer)</i>
TL	<i>Total de Lipídio</i>
4T1-LUC	<i>Linhagem de adenocarcinoma mamário murino transfectada com luciferase</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
1.1. Câncer.....	18
1.2. Câncer de mama	20
1.2.1. Diagnóstico e tratamento atual do CM.....	22
1.3. Terapia fotodinâmica	23
1.3.1. Ftalocianina de Cloro Alumínio	26
1.4. Nanotecnologia farmacêutica na terapia do câncer	27
1.4.1. Classificação e Caracterização do CM	28
1.5. Carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN)	29
1.6. Doxorrubicina	31
2. OBJETIVOS	34
2.1. Objetivo geral.....	34
2.2. Objetivos específicos.....	34
3. MATERIAIS E MÉTODOS	35
3.1. MATERIAIS	35
3.1.1. Reagentes	35
3.1.2. Equipamentos	36
3.2. MÉTODOS.....	37
3.2.1. Planejamento experimental (DoE)	37
3.2.2. Preparo dos CLN contendo doxorrubicina e ftalocianina de cloro alumínio ...	38
3.2.3. Determinação de tamanho, PDI e PZ das nanopartículas	39
3.2.4. Análise por rastreamento de nanopartículas	39
3.2.5. Medidas do Potencial hidrogeniônico	40
3.2.6. Estabilidade físico-química das formulações	40
3.2.7. Análise morfológica por microscopia eletrônica de transmissão	41
3.2.8. Análise morfológica por criomicroscopia eletrônica de transmissão	41
3.2.9. Análise termogravimétrica acoplada à Espectroscopia de transmitância na região do infravermelho (TGA-FTIR).....	41
3.2.10. Espectroscopia Raman intensificada por superfície	42
3.2.11. Análise da produção Espécies Reativas de Oxigênio (ROS).....	42
3.2.12. Análise de peroxidação lipídica	43
3.2.13. Ensaios <i>in vitro</i>	44
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
4.1. Planejamento experimental	47

4.1.1. Tamanho.....	47
4.1.2. Índice de polidispersão (PDI)	49
4.1.3. Potencial Zeta.....	50
4.2. Otimização.....	51
4.3. Propriedades físico-químicas dos carreadores lipídicos	54
4.3.1. Determinação do Tamanho, PDI, potencial Zeta e pH	54
4.3.2. Estudo da estabilidade das formulações.....	55
4.4. Caracterização por análise de rastreamento de nanopartículas (NTA).....	58
4.5. Microscopia Eletrônica de Transmissão das Nanopartículas.....	61
4.6. Análise morfológica por criomicroscopia eletrônica de transmissão	62
4.7. Análise termogravimétrica acoplada à espectroscopia na região do infravermelho	64
4.8. Medidas de espectroscopia Raman	66
4.9. Análise da produção de Espécies Reativas de Oxigênio.....	69
4.10. Testes de peroxidação lipídica	70
4.11. Ensaio de Citotoxicidade.....	71
4.11.1. Citotoxicidade em culturas de fibroblastos murinos (NIH-3T3)	71
4.11.2. Citotoxicidade em culturas de adenocarcinoma mamário murino.....	74
4.11.3. Citotoxicidade em culturas de adenocarcinoma mamário humano	77
4.11.4. Análise comparativa dos valores de IC ₅₀ determinados nas linhagens tumorais	80
4.12. Avaliação da viabilidade reprodutiva (ensaio clonogênico)	81
4.13. Internalização das formulações, medida por microscopia confocal, nas células da linhagem 4T1-luc	83
4.14. Análises de migração celular	87
5. CONCLUSÃO.....	89
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91
ANEXOS	103
DECLARAÇÃO DE BIOÉTICA E BIOSSEGURANÇA	103
DECLARAÇÃO DE DIREITOS AUTORAIS	104

1. INTRODUÇÃO

1.1. Câncer

O câncer abrange mais de cem doenças distintas, caracterizadas por desordens celulares resultantes de múltiplas alterações genéticas, levando a um desequilíbrio entre a proliferação e a morte celular. As células neoplásicas, nesse contexto, são capazes de sobreviver e se espalhar para outros tecidos e órgãos (ANTTILA et al., 2019; ANTTILA; BOFFETTA, 2020; GHANDI et al., 2019). O câncer também se caracteriza pela capacidade de promover angiogênese, ativação e invasão de metástases, resistência a mecanismos de morte celular (imortalidade replicativa), evasão aos genes supressores de tumores e ao sistema imunológico, instabilidade genômica, mutações e alterações no metabolismo energético (Figura 1) (ANTTILA et al., 2019; WAKS; WINER, 2019), em que as células tumorais apresentam alterações morfológicas, funcionais e moleculares (BAHUGUNA et al., 2017; HANAHAN; WEINBERG, 2011; VIDEIRA; REIS; BRITO, 2014).

As células cancerosas são capazes de violar as regras mais básicas pelas quais os organismos multicelulares são constituídos e mantidos, explorando todas as oportunidades de fazê-lo; portanto, de uma forma simplista pode-se dizer que o câncer surge da violação do comportamento celular social. Assim, se a ordem como os tecidos crescem e se renovam deve ser mantida, cada célula necessita ajustar seu comportamento de acordo com as necessidades do organismo como um todo, dividindo-se quando necessário e evitando a divisão quando não necessário; sobrevivendo por todo o período em que são requeridas e se suicidando quando deixam de executar suas funções; ainda: manter suas características de especialização típicas e não invadir locais inadequados. Contudo, um colapso pode ocorrer quando uma única célula sofre alterações genéticas que permitem sua sobrevivência, produzindo células-filhas que se comportam de forma “antissocial”, levando à expansão de um clone de células anormais e posteriormente à uma catástrofe ocasionada pela interrupção organizacional tecidual, característica do câncer (GHANDI et al., 2019). Reconhecido como um dos maiores problemas de saúde no mundo, o câncer é a segunda principal causa de mortes globalmente, superado apenas pelas doenças cardiovasculares (ANTTILA; BOFFETTA, 2020; BRAY et al., 2018).



Figura 1 - Representação esquemática das principais características das células tumorais (adaptado de HANAHAN & WEINBERG, 2011).

Cânceres em geral se desenvolvem de uma população de células anormais, que evolui malignamente em ciclos sucessivos de mutação causados por instabilidade genética e pressões seletivas, que lhes conferem vantagem competitiva em relação as células vizinhas (AALTONEN et al., 2020; SOMARELLI et al., 2020). As células cancerosas adquirem alterações genótípicas e fenotípicas ao longo do curso da doença, que melhoram sua aptidão para que o tumor evolua e supere as restrições ambientais e o tratamento. Portanto, a evolução do câncer é impulsionada por complexos processos regidos por regras distintas, como variantes genéticas discretas e irreversíveis e reprogramação plástica contínua e reversível (HAHN et al., 2021). A plasticidade celular é a capacidade de uma célula mudar sua identidade, alterando seu status de diferenciação e/ou compromisso de linhagem (SUVÀ; RIGGI; BERNSTEIN, 2013). A reprogramação plástica no câncer é categorizada em desdiferenciação, ou seja, a aquisição - por uma célula totalmente diferenciada - de características observadas em células progenitoras ou células-tronco, e a trans-diferenciação, ou seja, a aquisição de características de uma linhagem distinta (KOBOLDT et al., 2012).

Fatores intrínsecos e extrínsecos podem afetar a plasticidade das células cancerosas e sua resistência à terapia de tratamento. Fatores intrínsecos do tumor incluem oncogenes mutados, alterações epigenéticas, desregulação transcricional e de transdução de sinal, atividade metabólica alterada e modificações nas respostas a danos no DNA. Juntos, os efeitos dos oncogenes, bem como a mudança do estado da célula, resultam na sobrevivência e proliferação tumoral. Já os fatores extrínsecos incluem alterações no microambiente tumoral e no estado de diferenciação e composição das células estromais infiltrantes do tumor, como células imunes e fibroblastos (HAHN et al., 2021). O câncer é uma doença de alta complexidade, originada de falhas nos mecanismos que normalmente controlam o crescimento celular, sua proliferação e que regulam a apoptose (GHANDI et al., 2019). O acúmulo gradual

de alterações genéticas e epigenéticas, como a acetilação e a metilação (hipermetilação das ilhas CpG de genes supressores de tumor), fosforilação, ubiquitinação e regulação por microRNAs favorecem o surgimento de uma célula cancerosa (BENNETT; LICHT, 2018).

O câncer é, portanto, uma síndrome complexa e que requer estratégias inovadoras que possam melhorar seu tratamento. Inúmeros são os tipos de cânceres existentes, classificados de acordo com sua localização e histopatologia, como por exemplo o câncer de mama, que atinge principalmente mulheres, em todo mundo.

1.2. Câncer de mama

O câncer de mama (CM) é, desde os anos 90, o tipo mais comum de neoplasia diagnosticada e a segunda mais letal em mulheres, sendo considerado um relevante problema de saúde pública em todo o mundo (AKRAM et al., 2019; COOMBES et al., 2019; SUN et al., 2017; WAKS; WINER, 2019; SILVA et al., 2023). Estudos indicam que, quando detectado precocemente, o CM apresenta uma taxa de mortalidade significativamente baixa (TANG et al., 2016). Recentemente, foi destacada a crescente incidência de CM nos países em desenvolvimento, onde o aumento da expectativa de vida, a urbanização e a adoção de estilos de vida pouco saudáveis são fatores que contribuem para o aparecimento de novos casos (FRANCIES et al., 2020; MOMENIMOVAHED; SALEHINIYA, 2019). A seleção do tratamento para o CM é feita conforme a condição do paciente, podendo ser um tratamento único ou combinado. Tradicionalmente, são utilizadas radioterapia, quimioterapia e/ou cirurgia, com o propósito principal exclusão o tumor e, assim, proporcionar uma melhor qualidade de vida ao paciente (AKRAM et al., 2019; LIYANAGE et al., 2019). A sobrevida dos pacientes depende substancialmente do estágio do tumor no momento do diagnóstico (HARBECK et al., 2019). A taxa geral de sobrevida em 5 anos, para pacientes diagnosticados entre 2009-2015, foi de 98% para os diagnosticados no estágio I, de 92% para os de estágio II, 75% para os de estágio III e 27% para os de estágio IV (DESANTIS et al., 2019). Os principais obstáculos enfrentados no tratamento incluem o aumento progressivo do crescimento dos tumores, a disseminação para áreas previamente saudáveis (metástase) e a resistência aos medicamentos quimioterápicos convencionais. Os efeitos colaterais adversos também representam uma significativa barreira para a cura da doença, levando muitos pacientes a interromper o tratamento (AKRAM et al., 2019; LIYANAGE et al., 2019).

O CM ocorre quando um tumor maligno se desenvolve no tecido mamário, principalmente nos lóbulos e ductos, sendo o tipo histológico mais comum o carcinoma de células epiteliais, que se divide em lesões *in situ* e invasoras (AALTONEN et al., 2020; BRAY

et al., 2018; FERLAY et al., 2015). Ele é caracterizado pela proliferação de células epiteliais, inicialmente sobre uma camada de células mioepiteliais completas e membrana basal (carcinoma *in situ*), que progride após o rompimento da camada de células mioepiteliais, degradação da membrana basal e invasão para tecidos adjacentes, tornando-se metastático quando, após a passagem pelo sangue ou sistema linfático (Figura 2), atinge outros órgãos-alvo como ossos, fígado, pulmões e cérebro (BOIX-MONTESINOS et al., 2021).

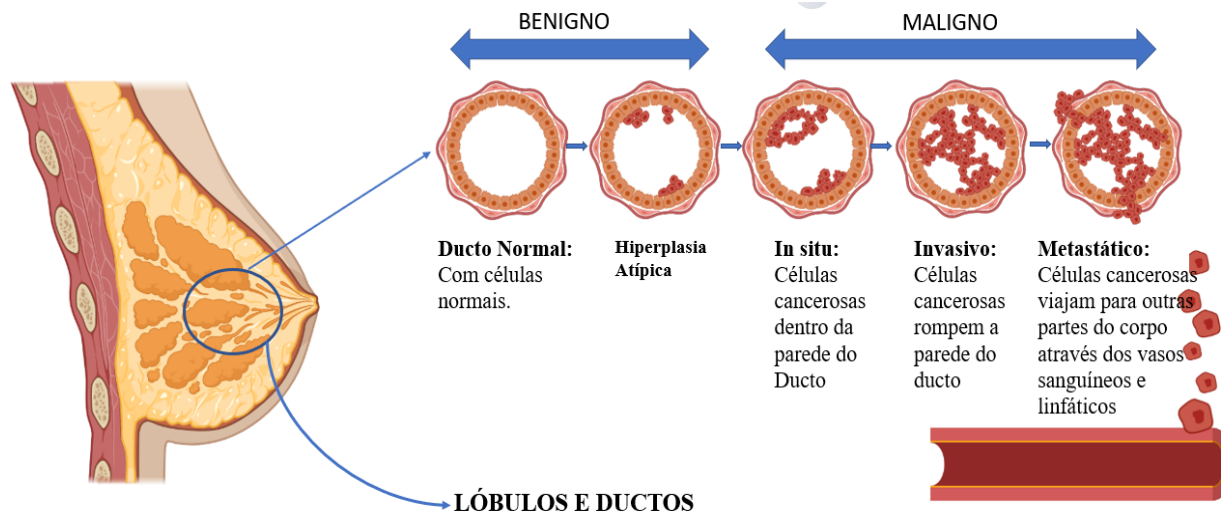


Figura 2 - Estágios representativos das neoplasias de mama até a evolução de metástase (adaptado de BOIX-MONTESINOS et al., 2021).

Os casos de CM se diferenciam por meio de histopatologia e características moleculares, que servem como ferramentas para auxiliar na escolha da estratégia terapêutica adequada e prever resultados clínicos (HARBECK et al., 2019; WAKS; WINER, 2019). De acordo com a histologia, o subtipo mais comum é o carcinoma ductal invasivo (50 -75% dos pacientes), seguido pelo carcinoma lobular invasivo (5-15%); carcinomas ductais/lobulares mistos, seguidos de outras histologias mais raras (WAKS; WINER, 2019).

Dois principais alvos moleculares na patogênese do câncer de mama já foram identificados. O primeiro é o receptor de estrogênio alfa (*Estrogen Receptor Alpha*, ER α), expresso em aproximadamente 70% dos cânceres de mama invasivos e que atua nas vias de crescimento oncogênicas (HARBECK et al., 2019). Tumores com expressão de ER α ou do receptor de progesterona (PR) em pelo menos 1% das células tumorais são classificados como positivos para receptores hormonais, HR+ (HU et al., 2016). O uso de agentes endócrinos para diminuir a sinalização de ER α é a terapia sistêmica indicada para cânceres de mama HR+ (HARBECK et al., 2019; WAKS; WINER, 2019). O segundo alvo molecular é o receptor do fator de crescimento epidérmico 2 (*Epidermal Growth Factor Receptor*, EGFR2), que é superexpresso em aproximadamente 20% dos cânceres de mama e está associado ao mau

prognóstico na ausência de terapia sistêmica (JOSHI; PRESS, 2018; HARBECK et al., 2019). O câncer de mama triplo-negativo, que constitui aproximadamente 15% de todos os tumores de mama é caracterizado pela falta de expressão dos alvos moleculares ER α /PR ou EGFR2 (KOBOLDT et al., 2012). Os tumores triplo-negativos apresentam alto risco de recidiva metastática após 5 anos do diagnóstico (HARBECK et al., 2019; SKOBE et al., 2001) e sua fisiopatologia molecular ainda é pouco compreendida (JOSHI; PRESS, 2018).

1.2.1. Diagnóstico e tratamento atual do CM

A detecção precoce do CM pode aumentar a taxa de sobrevida pois, no estágio inicial, o câncer pode responder efetivamente ao tratamento, evitando o desenvolvimento da doença. Nesse sentido, vários métodos podem ser usados para diagnosticar a doença, incluindo biópsia mamária, ultrassonografia, mamografia, tomografia e citologia aspirativa por agulha fina. Até agora, a mamografia é a técnica mais usada e considerada a mais confiável, porém os médicos podem precisar de uma biópsia adicional antes de tomada de decisão/tratamento. Além disso, a taxa de detecção por mamografia (60-70%) ainda é considerada baixa (HOSNI et al., 2019).

O sistema de estadiamento preconizado pela União Internacional para o Controle do Câncer (UICC), é denominado Sistema de Classificação TNM e é o mais utilizado. Nele, o estágio da doença é determinado pelo tamanho do tumor (T, de 0 a 4), a extensão do envolvimento do linfonodo regional (N, de 0 a 3) e presença ou ausência de metástases à distância (M, 0 ou 1). Quando as categorias T, N e M são agrupadas em combinações pré-estabelecidas, ficam distribuídas em estágios que variam de I a IV (INCA, 2019), do menos para o mais grave. O tamanho do tumor e o status do linfonodo permanecem os fatores de risco mais significativos para a recorrência do câncer de mama e sobrevida global dos pacientes (ROBISON; PERREARD; BERNARD, 2004).

Tratamentos convencionais do CM incluem principalmente cirurgia (CARVALHO, 2023; FATIMA et al., 2024) quando o tumor ainda está localizado – visando erradicar o tumor e possíveis gânglios linfáticos regionais acometidos - sendo a quimioterapia e a radioterapia tratamentos neoadjuvantes e adjuvantes (WINSLOW *et al.*, 2015). Já no CM metastático e nos triplo-negativos a quimioterapia a base antraciclina (DOX ou epirrubina) e taxanos ainda representa o pilar do tratamento clínico (GARRIDO-CASTRO *et al.*, 2019; MIGLIETTA *et al.*, 2022, CARVALHO, 2023). No entanto como a quimioterapia tradicional interfere na divisão celular, ela é frequentemente acompanhada de efeitos sistêmicos adversos como mielossupressão, mucosite, alopecia, ... (RUI et al., 2016; KLEVOS et al., 2017).

O tumor triplo-negativo é o mais agressivo entre os CM, é altamente metastático, tem uma taxa de recorrência de 3 anos e a mais alta taxa mortalidade em 5 anos após o tratamento. Por falta de receptores ER, PR e HER-2, o tratamento usado para outros CM não é eficaz no triplo-negativo. Sua heterogeneidade em nível molecular, patologia e características clínicas também ocasiona níveis diferentes de sensibilidade aos agentes quimioterápicos. Mesmo nestes casos os principais métodos de tratamento a ressecção tumoral e a quimioterapia (CHANG-QING et al., 2020).

No Brasil, a portaria nº 4 de 23/01/2018 do Ministério da Saúde definiu as Diretrizes Diagnósticas e Terapêuticas para o Carcinoma de Mama. De acordo com esse documento, o tratamento medicamentoso recomendado para casos avançados inclui o uso de quimioterápicos antracíclicos (como doxorrubicina e epirrubicina) e taxanos (como docetaxel e paclitaxel), além de outros agentes como capecitabina, metotrexato, 5-fluorouracila, gemcitabina, vimblastina, vinorelbina, mitomicina, etoposídeo, cisplatina, ciclofosfamida e irinotecano. Além desses, também são utilizados: doxorrubicina lipossomal, eribulina, ixabepilona e nabpaclitaxel (BRASIL, 2018). Porém, são inúmeros os efeitos tóxicos causados pelas terapias atualmente adotadas (COOMBES et al., 2019) para o tratamento do CM.

Embora seja importante refinar as modalidades convencionais de terapia do CM, muito esforço tem sido colocado na investigação de modalidades terapêuticas alternativas seguras, eficazes, economicamente acessíveis e aceitáveis para as pacientes. Nesse sentido, alguns tratamentos têm se destacado como alternativa promissora para diversos tipos de cânceres, como a aplicação da Terapia Fotodinâmica (TFD) devido a sua seletividade e potencial efeito antineoplásico (JEON; KO, 2019) ou ainda o desenvolvimento de sistemas de entrega de fármacos (DDS, do inglês *drug delivery systems*) para direcionamento específico dos quimioterápicos (LI et al., 2016).

1.3. Terapia fotodinâmica

A Terapia Fotodinâmica (TFD) apareceu no início do século XX, quando Oscar Raab demonstrou que o corante acridina, na presença de luz visível, era tóxico e destruía microrganismos como o *Paramecium*, denominando a esse evento ‘Terapia Fotodinâmica’ (DANIELL; HILL, 1991; KESSEL, 2004). Desde então a TFD tem sido explorada e aplicada para o tratamento de diversas patologias, inclusive o câncer (DOUGHERTY et al., 1978; DOUGHERTY, 1989). Em 1978, o primeiro estudo clínico a utilizar Terapia Fotodinâmica (TFD) em seres humanos foi publicado. O estudo envolveu pacientes com câncer de mama, cólon, próstata, melanoma, condrossarcoma, angiossarcoma, células endometriais, basais e

escamosas que eram resistentes aos tratamentos convencionais da época. Foi administrado um fotossensibilizador derivado da hematoporfirina por via endovenosa, seguido de irradiação no local do tumor, resultando em uma resposta satisfatória em 87% das lesões. Esse estudo pioneiro demonstrou pela primeira vez o uso eficaz da TFD em tumores que não respondiam a outras terapias (DOUGHERTY et al., 1978).

De modo geral, a TFD é uma técnica terapêutica que necessita de três principais elementos: um agente fotossensibilizador (FS), uma fonte de luz e moléculas de oxigênio (BENOV, 2015; CHILAKAMARTHI; GIRIBABU, 2017). Com a irradiação em comprimento de onda específico, o FS absorve a energia dos fótons e passa ao estado excitado; ao decair para o estado fundamental o FS transfere sua energia para moléculas de O_2 presentes no ambiente celular produzindo espécies reativas de oxigênio (ROS), como o oxigênio *triplete* (3O_2), oxigênio *singlete* (1O_2) ou o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) (CHEN et al., 2020; DE FREITAS; HAMBLIN, 2016; ZHAO et al., 2020). As ROS produzidas são, então, capazes de causar danos nas células-alvo por estresse oxidativo, levando à morte por apoptose, necrose ou autofagia (CHEN et al., 2020; OSTAŃSKA; AEBISHER; BARTUSIK-AEBISHER, 2021). Mais especificamente, como detalhado na Figura 3, os FS irradiados passam do estado fundamental ao singlete, podendo decair de volta ao estado fundamental e emitir fluorescência – passível de ser utilizada em imaginologia (AGOSTINIS et al., 2011; FELSHER, 2003) ou sofrer um cruzamento intersistemas, em que o spin dos elétrons excitados se inverte para formar um estado triplete, de vida longa (AGOSTINIS et al., 2011; WANG et al., 2015). O FS no estado triplete pode interagir diretamente com alvos celulares ou pode reagir com O_2 para produzir radicais aniônicos, superóxido, radicais hidroxila ou peróxido de hidrogênio (AGOSTINIS et al., 2011; FELSHER, 2003). Essas respostas podem acontecer ao mesmo tempo e a relação entre esses procedimentos varia conforme o tipo de fotossensibilizador, as quantidades de oxigênio molecular e o substrato específico (FELSHER, 2003; KWIATKOWSKI et al., 2018).

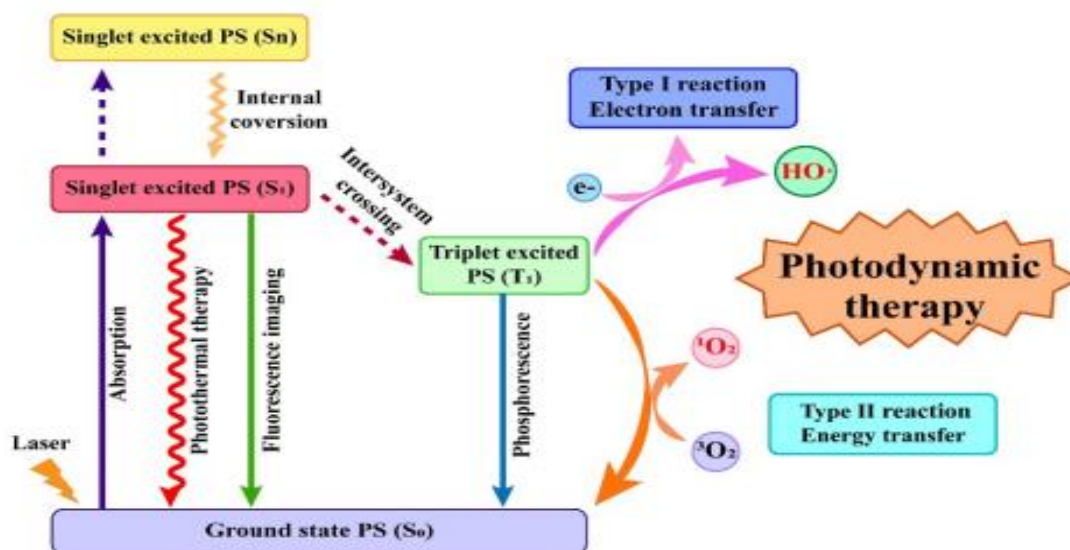


Figura 3 - Esquema geral de mecanismos fotofísicos clássicos em terapia fotodinâmica (TFD). O fotossensibilizador absorve a energia da luz para saltar do estado fundamental para o estado excitado singlete, que então passa ao estado excitado tripleto – de maior tempo de vida- através de cruzamento intersistemas e, finalmente, gera espécies reativas de oxigênio através de reação do tipo I (por transferências de elétrons) ou reação tipo II (transferência de energia). Adaptado de HUA et al., 2021.

Em um meio biológico, as espécies reativas geradas pelo processo fotodinâmico podem reagir com muitas biomoléculas e o dano a elas pode: (a) danificar irreversivelmente as células tumorais resultando em necrose, apoptose e/ou autofagia; (b) causar isquemia tumoral, após lesão vascular induzida por TFD e (c) ativar a resposta imune contra antígenos tumorais (LONGO et al., 2016). As espécies reativas de oxigênio, tais como oxigênio *singleto* ($1O^2$), radicais hidroxila e ânions superóxido, causam dano celular oxidativo e podem promover a apoptose ou a necrose, dependendo da intensidade da luz fornecida (BRODIN; GUHA; TOMÉ, 2015). A necrose é o modo mais frequente de morte celular quando utilizadas altas doses de TFD e é morfologicamente caracterizada por inchaço celular e perda rápida da integridade da membrana plasmática. Já a apoptose é desencadeada por doses leves ou baixas de luz e fotossensibilizador, sendo caracterizada pela redução do volume celular, condensação de cromatina, fragmentação nuclear e formação de corpos apoptóticos engolfados por fagócitos vizinhos. O papel da autofagia na morte celular por TFD é controverso, porém, considera-se que ela também pode ser promovida através da digestão de componentes celulares essenciais (AGOSTINIS et al., 2011; LÓPEZ-MARÍN; MULET, 2018).

O dano fotooxidativo ocorre em moléculas-chave associadas à função da membrana celular, incluindo resíduos de aminoácidos e colesterol, bem como estruturas intracelulares tais como ácidos nucleicos, que controlam a atividade celular normal e o ciclo celular (BANERJEE et al., 2017). O tipo de morte celular depende em grande parte da localização do fotossensibilizador, sendo a apoptose mediada no caso do FS localizado na mitocôndria,

enquanto sua localização no lisossomo resulta em necrose ou apoptose (KUBIAK et al., 2016). De acordo com Wachowska et al. (2015) os radicais livres e o estresse oxidativo que aparecem durante a TFD levam à transdução de sinal intracelular, responsável pela produção de proteínas induzidas pelo estresse, ativação de genes que regulam a apoptose e expressão de genes de citocinas. Já os danos fotooxidativos das membranas celulares levam à liberação de metabólitos de ácido araquidônico que são potentes mediadores inflamatórios.

A liberação extracelular de proteínas intracelulares, conhecidas como padrões moleculares associados ao dano (DAMP), normalmente ocorre 1-4 h após a TFD, e alguns já foram identificados, como as proteínas de choque térmico (HSPs) e a calreticulina. Estas potencializam a ativação do sistema imunológico, a migração para o local do dano celular e a fagocitose de células danificadas o que conduz uma resposta inflamatória aguda mediada por neutrófilos, macrófagos e outros componentes celulares, que migram para o local do tumor tratado (AGOSTINIS et al., 2011; BANERJEE et al., 2017). Além disso, a combinação de TFD com outros fármacos quimioterápicos pode ajudar a alcançar um controle do tumor em longo prazo, devido aos efeitos sinérgicos resultantes da combinação de respostas da TFD com o dos antineoplásicos (ZHANG et al., 2016).

1.3.1. Ftalocianina de Cloro Alumínio

Os FS usados em terapia fotodinâmica são classificados como de primeira geração - representados pelo grupo das porfirinas, de segunda geração, representados pelas ftalocianinas (LO et al., 2020; SANTOS et al., 2020) ou de terceira geração, que são FS modificados para ter maior afinidade com o tecido tumoral, reduzindo os danos aos tecidos saudáveis circundantes (KWIATKOWSKI et al., 2018; MFOUO-TYNGA et al., 2021). As principais modificações para aumentar a seletividade do FS com tecidos-alvo são: combinações de FS de 2ª geração com moléculas do receptor-alvo, combinações de FS com a lipoproteína LDL (já que as células tumorais precisam de mais colesterol para a síntese das membranas celulares); conjugação de FS com anticorpo monoclonal direcionado a antígeno específico da célula cancerosa, a marcadores de superfície tumoral como receptores de fator de crescimento, receptores de transferrina ou de hormônios, como a insulina (KWIATKOWSKI et al., 2018).

As ftalocianinas são reconhecidas pela forte absorção na região do infravermelho próximo (600-800 nm) e eficiência no tratamento de câncer, pois causam grande toxicidade ao tumor. Dentre estas, destacam-se a ftalocianina de cloro alumínio (FtClAl), com pico de absorção máxima em 670 nm (LO et al., 2020; ZHAO et al., 2020) (Figura 4). A FtClAl é uma molécula cujo anel macrocíclico tetrapirrólico coordena-se ao íon metálico Al^{3+} (SILVA,

2013). A incorporação do alumínio, um metal diamagnético, no anel tetrapirrólico confere à ftalocianina propriedades fotofísicas e fotoquímicas favoráveis para a aplicação em TFD, tais como: alto rendimento quântico e longo tempo de vida no estado *triplete* e alto rendimento de produção de oxigênio *singlete*, potencializando processos fotobiológicos de produção das ROS (AGOSTINIS et al., 2011; KESSEL, 2019; SILVA, 2013), responsáveis pela morte celular.

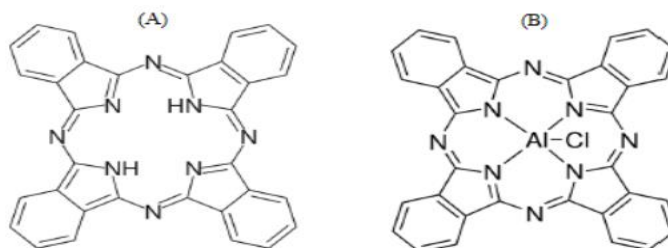


Figura 4 - (A) Estrutura geral de fotossensibilizantes da classe de ftalocianinas; (B) Estrutura química da ftalocianina de cloro-alumínio (adaptado de VELLOSO et al., 2009).

A aplicação da TFD no tratamento do câncer tem sido amplamente investigada devido à sua especificidade e capacidade seletiva de preservar a funcionalidade dos tecidos saudáveis adjacentes aos tumores malignos, incluindo o câncer de mama (CHEN et al., 2020; ZHAO et al., 2020). A concentração, as propriedades físico-química e a localização intracelular do fotossensibilizador, bem como a concentração de oxigênio molecular, o comprimento de onda e a intensidade de luz aplicada, o tipo celular e o microambiente dos tecidos podem influenciar o modo e a extensão da morte celular resultante (ETCHEVERRY et al., 2020). Uma das propriedades únicas da TFD é a capacidade dos FS de se acumularem seletivamente em células tumorais, limitando o dano tecidual apenas à área de tecido exposta à luz (DE MORAES et al., 2015). Este acúmulo de FS em células/tecidos tumorais já foi atribuído ao baixo pH, aumento da permeabilidade vascular, drenagem linfática pobre, arquitetura estromal distorcida e à alta expressão de receptores de LDL das células tumorais (EL-DALY; ABBA; GAMAL-ELDEEN, 2017). A modificação e veiculação dos FS podem contornar limitações possíveis obstáculos potenciais para a aplicação clínica da TFD (RUI et al., 2016).

1.4. Nanotecnologia farmacêutica na terapia do câncer

A nanotecnologia surgiu como uma ferramenta promissora para a entrega de vários fármacos para diagnóstico, imagem e tratamento do câncer, sendo que nanoformulações variando entre 10 nm – 300 nm são consideradas sistemas de entrega potenciais (ZAFAR et al., 2021). O alto potencial antitumoral da nanotecnologia farmacêutica foi evidenciado em 1995, quando o FDA aprovou o Doxil®, uma das primeiras abordagens clínicas bem-sucedidas de equilibrar alta eficácia e menor toxicidade medicamentosa, fornecendo aos pacientes doses

mais altas de doxorrubicina e, ao mesmo tempo, minimizando os efeitos cardiotóxicos dose-dependentes da mesma (KLOCHKOV et al., 2021). As principais vantagens das nanopreparações são a capacidade de direcionamento com precisão ao tumor e liberação prolongada, que aumentam a meia-vida diminuem a toxicidade sistêmica, melhoram a solubilidade de fármacos hidrofóbicos, aumentam sua estabilidade em ambientes biológicos, sua biocompatibilidade e farmacocinética (CHEN et al., 2021; KLOCHKOV et al., 2021). O efeito de permeabilidade e retenção (EPR) do tumor permite que nanopartículas com 100-200 nm, se acumulem nos tecidos tumorais, o que garante a entrega eficiente de medicamentos às células cancerosas em tumores sólidos (KLOCHKOV et al., 2021). Assim, devido ao seu comportamento único de acúmulo no local do tumor e elevada sítio-especificidade, nanopartículas desenhadas como sistemas de veiculação de fármacos constituídas com agentes anticarcinogênicos e antimicrobianos são interessantes no tratamento do câncer (BRANNON-PEPPAS; BLANCHETTE, 2012; HÖRMANN; ZIMMER, 2016; JIN; YE, 2013). Em alguns casos, combinações sinérgicas de nanoformulações antitumorais, através de mecanismos de ação e toxicidade distintos, podem contornar a questão da resistência ao tratamento, sendo essenciais para uma terapia eficaz contra o câncer (MIAO et al., 2017).

1.4.1. Classificação e Caracterização do CM

O câncer de mama é considerado como altamente heterogêneo abrangendo perfis fenotípicos e morfológicos distintos e, portanto, com comportamentos clínicos diferentes (TANG et al., 2016). De forma simplificada, a doença pode ser dividida em quatro subtipos principais de acordo com suas características moleculares. O primeiro subtipo é o Luminal A, o segundo o Luminal B, o terceiro HER-2 positivo e o quarto é o Triplo Negativo (TNBC) (BOIX-MONTESINOS et al., 2021; NASCIMENTO; OTONI, 2020). Algumas características destes subtipos são mostradas na Tabela 1.

Tabela 1 - Classificação dos subtipos moleculares do câncer de mama e resposta a diferentes terapias (adaptado de NASCIMENTO, OTONI, 2020).

SUBTIPOS MOLECULARES	LUMINAL A	LUMINAL B		HER2+	TN
Biomarcadores	ER+ PR+ HER2- Ki67 baixo	(HER2-) ER+ PR- HER2- Ki67 alto	(HER2+) ER+ PR-/+ HER2+ Ki67 baixo/alto	ER- PR- HER2+ Ki67 alto	ER- PR- HER2- Ki67 alto
Frequência de casos (%)	40-50	20-30		15-20	10-20
Grau Histológico	Bem diferenciado (Grau I)	Diferenciação moderada (Grau II)		Pouco diferenciado (Grau III)	Pouco diferenciado (Grau IV)

Prognóstico	Bom	Intermediário		Ruim	Ruim
Resposta a terapias	Endócrina	Endócrina; Quimioterapia	Endócrina; Terapia direcionada: Quimioterapia	Terapia direcionada; Quimioterapia	Quimioterapia Inibidores PARP

ER: receptor de estrogênio, **PR:** receptor de progesterona, **HER2:** receptor do fator de crescimento epidermal humano 2.

O subtipo Luminal A é o mais comum, definido por alta expressão de ER e PR e baixa expressão de HER2 (receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano) e Ki67 (uma proteína do núcleo da célula do CM, que reflete a velocidade de proliferação celular/malignidade). São considerados de baixo grau devido ao seu crescimento lento e prognóstico favorável de resposta à terapia. O subtipo Luminal B é definido pela expressão de ER e PR e pela expressão elevada de Ki67, podendo ser HER2+ ou HER2- e apresenta prognóstico menos favorável do que o primeiro subtipo, devido ao crescimento mais acelerado do tumor. O subtipo HER2+ é caracterizado, principalmente, por alta expressão deste receptor e ausência de expressão de ER e PR; eles exibem um crescimento tumoral mais rápido, desenvolvimento mais agressivo e têm um pior prognóstico em comparação com os subtipos A e B Luminal. O subtipo TNBC representa cerca de 10–15% de todos os casos de câncer de mama e está frequentemente presente em mulheres jovens (< 40 anos) com mutações no gene BRCA1. Eles são caracterizados pela ausência de expressão de ER, PR e HER2 e por altos índices de Ki67, possuem comportamento proliferativo mais agressivo e têm o pior prognóstico de todos os subtipos; também exibem infiltração inflamatória linfoplasmocitária com metástases viscerais e, notavelmente, a falta de expressão do receptor hormonal limita a eficácia dos regimes quimioterápicos convencionais, dificultando o desenvolvimento de terapêuticas anticâncer eficazes para esse tipo de CM (BOIX-MONTESINOS et al., 2021).

1.5. Carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN)

A nanobiotecnologia revolucionou a indústria farmacêutica e atrai cada vez mais atenção como uma estratégia para otimizar a administração de agentes quimioterápicos, através de sistemas de entrega de fármacos (*Drug Delivery Systems*, DDS) que permitem modular a biodistribuição e acúmulo do ativo no tecido-alvo, melhorando o equilíbrio entre sua eficácia e a toxicidade (CHO et al., 2008). DDS também fornecem proteção enzimática e mecânica aos fármacos nele incorporados, de modo a contribuir para a sua biodisponibilidade (WOLFRAM; FERRARI, 2019) e podem ser preparados com excipientes funcionais, que lhes confirmam atividade farmacêutica adicional, como a imunoevasão. Estratégias comuns para evitar o

reconhecimento imunológico e a eliminação de nanopartículas incluem modificações de superfície, por exemplo, com o uso de polímeros (SUN et al., 2020), peptídeos (JENA; MCERLEAN; MCCARTHY, 2020) e surfatantes (PINTON et al., 2020). Atualmente, há diversas categorias de sistemas de liberação de fármacos (DDS) que variam em composição, estrutura físico-química e métodos de fabricação, incluindo-se nanopartículas metálicas, dendrímeros, micelas, nanoemulsões, nanopartículas poliméricas, magnéticas e lipídicas, entre outras (GANTA et al., 2016; TIWARI et al., 2012).

No início dos anos 90 foram descritas as nanopartículas lipídicas sólidas, a primeira geração de nanopartículas lipídicas, derivadas da substituição da fase oleosa (lipídio líquido, LL) de nanoemulsões por um lipídio sólido (LS). Apesar de várias características vantajosas, as nanopartículas lipídicas sólidas mostraram limitações como a expulsão do fármaco durante armazenamento e relativa baixa eficiência de encapsulação, devido à limitada solubilidade de fármacos no LS (MASJEDI et al., 2020; PUGLIA et al., 2016; PUGLIA; BONINA, 2012). Para superar essas limitações, no final da mesma década foi desenvolvida uma segunda geração de nanopartículas lipídicas: os carreadores lipídicos nanoestruturados, CLN (Figura 5) (PUGLIA; BONINA, 2012). A inovação dos CLN consistiu na adição de um lipídio líquido, para formar a mistura de LS + LL que compõe o interior da nanopartícula. A incorporação de óleo (LL à temperatura ambiente/corporal) nestes carreadores melhorou a eficácia de encapsulação e o perfil de liberação das moléculas ativas encapsuladas. Isso previne a expulsão do fármaco durante o armazenamento ao reduzir a cristalinidade da matriz lipídica, comparativamente as nanopartículas lipídicas sólidas (BELOQUI et al., 2016; FANGUEIRO et al., 2014).

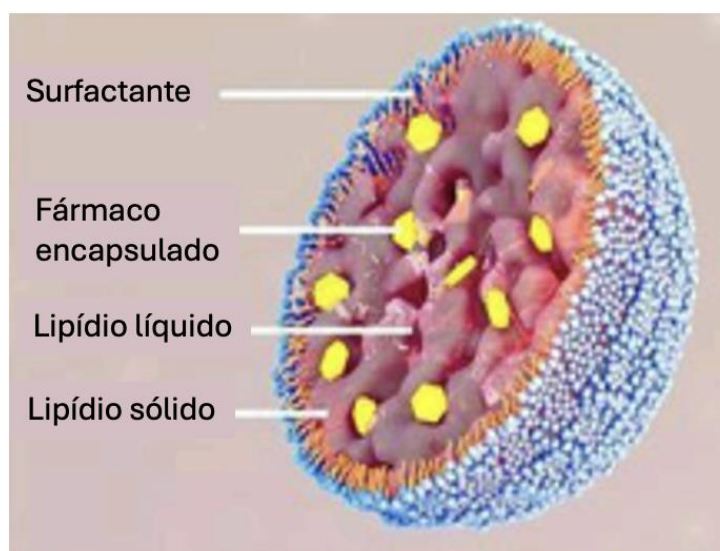


Figura 5 - Representação esquemática de um Carreador Lipídico nanoestruturado (CLN), constituído por LL, LS e surfactante.

Afora as vantagens já citadas, testes demonstraram a rápida internalização de CLN por células cancerígenas (HAIDER et al., 2020). Além disso, a eficácia dos CLN na quimioterapia pode ser melhorada com o uso de ligantes na superfície, capazes de direcionar a partícula/fármaco para receptores presentes na membrana plasmática das células do tecido-alvo neoplásico (HAIDER et al., 2020; NASIRIZADEH; MALAEKEH-NIKOUEI, 2020). O tamanho e a carga superficial da partícula afetam significativamente a estabilidade dos CLN (ÖZDEMİR; ÇELİK; ÜNER, 2019; RIBEIRO et al., 2016). Partículas menores e monodispersas são mais estáveis e têm menor tendência de agregação e instabilidade física durante armazenamento, além de serem mais lentamente eliminadas pelo sistema mononuclear fagocitário (BELOQUI et al., 2016; MENDES et al., 2018). É desejável que CLN sugeridos como transportadores de agentes antineoplásicos, tenham diâmetro entre 50-300 nm para maior captação celular (HAIDER et al., 2020), pois, devido ao efeito de permeabilidade e retenção (EPR) observado no tecido tumoral, nanopartículas com tamanhos menores que 300 nm apresentam melhor permeabilidade através da vasculatura tumoral (HAIDER et al., 2020).

Os parâmetros de desenvolvimento da formulação, como a quantidade e tipos de lipídios, surfactantes e fármacos adicionados, podem afetar significativamente o tamanho da partícula e a distribuição dos CLN (BELOQUI et al., 2016; HAIDER et al., 2020). Nesse sentido, uma forma de otimizar o planejamento experimental é utilizar uma abordagem quimiométrica ou de DoE (do inglês *Design of Experiments*, uma abordagem de *Quality-by-Design*), com a qual é possível estabelecer o papel de cada excipiente estudado e suas interações, possibilitando ajustes entre as razões de componentes, concentrações e processos de preparo (MENDES et al., 2018), otimizando a incorporação do fármaco nos DDS.

A quimioterapia combinada à TFD com uso dos CLN como carreadores pode trazer diversas vantagens, como a redução da dose efetiva de DOX, terapia multi-alvo e ação sinérgica dos tratamentos. Nos últimos anos, tais sistemas de *codelivery* têm sido explorados para o tratamento de cânceres. Como já mencionado, CLN são sistemas promissores para encapsulação de moléculas hidrofóbicas e, portanto, podem ser transportadores adequados também para carrear mais de um agente antitumoral (RODRIGUES DA SILVA et al., 2021).

1.6. Doxorrubicina

A doxorrubicina (DOX) é um antibiótico antineoplásico do grupo das antraciclinas descoberto nos anos 50 e isolado de culturas fúngicas de *Streptomyces peucetius* (CAGEL et al., 2017; KANWAL et al., 2018). Ela possui a fórmula química $C_{27}H_{29}NO_{11}$ e massa molar de $543.46 \text{ g mol}^{-1}$. A estrutura da DOX consiste em um anel tetracíclico com dois grupamentos

adjacentes, o grupo quinona/hidroquinona e um açúcar aminado, denominado daunosamina (Figura 6). A administração de DOX induz a formação de radicais livres, formados através de um processo ferro-dependente que primeiramente envolve a redução do anel antraciclina quinona da antraciclina em hidroquinona que, posicionada em anéis adjacentes, possibilita o ganho ou perda de elétrons (CAGEL et al., 2017). Além da DOX, outros fármacos dessa classe são amplamente utilizados na prática clínica como a daunorrubicina, a epirrubicina e a idarrubicina (BORGES et al., 2019).

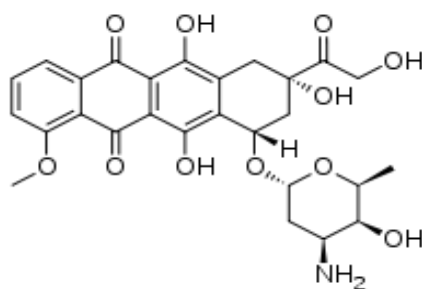


Figura 6 - Estrutura molecular da doxorubicina.

O uso de DOX em oncologia iniciou-se nos anos 60, para tratamento de diversos tipos de neoplasias, destacando-se os tumores sólidos e neoplasias hematológicas (YU et al., 2019; ZHANG et al., 2017; ZHENG et al., 2019). A doxorubicina tem atividade significativa contra considerável número de tumores, como CM, tumores sólidos da infância, sarcomas e linfomas (CAGEL et al., 2017), incluindo alguns refratários a outros fármacos (BORGES et al., 2019; ZHANG et al., 2017). Embora os mecanismos exatos de ação antineoplásica não estejam completamente elucidados, dois são mais aceitos: a inibição da síntese da DNA-topoisomerase II e o bloqueio da ação da DNA-polimerase, inserindo-se entre os pares de base do DNA e impedindo a síntese dessas macromoléculas, o que induz apoptose e gera radicais livres durante sua metabolização (BORGES et al., 2019; MOHAMMADIAN et al., 2020; SABZICHI et al., 2017). Contudo, a DOX apresenta meia vida curta, baixa estabilidade e é um composto inespecífico levando a efeitos colaterais como dores, náuseas, vômitos, diarreia, além de apresentar cardiotoxicidade (CAGEL et al., 2017; LOVITT; SHELPER; AVERY, 2018; SHAFEI et al., 2017).

Limitações ao uso da DOX estão relacionadas a sua toxicidade e a relatos de resistência farmacológica (CHEUNG-ONG; GIAEVER; NISLOW, 2013). Para contornar essas limitações, uma estratégia possível é a encapsulação em DDS, capazes de promover liberação sustentada e que podem ser direcionados para as células tumorais, sem danificar células saudáveis (CAGEL et al., 2017; KANWAL et al., 2018; LAGES et al., 2020). Um exemplo consagrado de DDS contendo doxorubicina é a formulação DOXIL[®], composta por

lipossomos oligolamelares de fosfatidilcolina e fosfatidilglicerol de ovo, que foi a primeira formulação lipossomal comercialmente disponibilizada para o tratamento de câncer. Esta formulação baseada em lipídios aumentou o tempo de meia-vida plasmática de DOX e diminuiu sua toxicidade em testes pré-clínicos contra câncer de mama, de ovário e sarcoma de Kaposi (CAVALCANTE et al., 2021; LAGES et al., 2020; DE PAULA et al., 2020).

Em vista dos desafios apresentados para o tratamento eficaz do câncer de mama, o presente estudo visa encontrar uma alternativa inovadora para seu tratamento, a saber, o desenvolvimento de um DDS inteligente, a base de CLN, contendo um quimioterápico clássico (DOX) e um fotossensibilizador (FtClAl) para terapia fotodinâmica. Os CLN são bastante adequados para a entrega de fármacos hidrofóbicos como DOX e as ftalocianinas, de modo sistêmico (MENDES et al., 2018, 2020; ZHAO et al., 2018). Tais carreadores podem melhorar o direcionamento do quimioterápico e do fotossensibilizador ao tecido-alvo tumoral (GENTA et al., 2018; JIN et al., 2017). Ressalta-se que, a combinação de quimioterapia com TFD tem se mostrado promissora nos tratamentos de diferentes cânceres, de modo a induzir mecanismos de morte tumoral, contribuindo para a erradicação total de células neoplásicas (CHEN et al., 2019; GAIO et al., 2019; LI et al., 2016).

Ademais, a TFD associada à quimioterapia mostrou ser uma poderosa estratégia combinada de destruição de células tumorais (BRODIN; GUHA; TOMÉ, 2015; MORET & VARCHI, 2023). De Las Heras et al. avaliaram nanopartículas de sílica mesoporosa contendo cetuximab-IRDye700DX e DOX demonstraram fotodestruição eficiente e seletiva de células de câncer gástrico que expressavam EGFR e liberação de DOX induzida por oxigênio singlete (DE LAS HERAS et al., 2022). No câncer de mama, Wang e colaboradores testaram a associação dessas terapias em um estudo onde o quimioterápico doxorubicina e ácido 5-aminolevulínico (FS) conjugados em nanocomplexos de ácido hialurônico tiveram efeito potencializado frente a células MCF-7, de câncer de mama (WANG et al., 2019). Nanopartículas carregadas com DOX e o fotossensibilizador clorina-e6 foram utilizadas para testar a sinergia entre quimioterapia e TFD no tratamento de câncer de mama positivo para o receptor de integrinas $\alpha\beta3^+$ e HER2 negativo. Outro estudo mostrou que a TFD mediada por nanoemulsão de ftalocianina de cloro-alumínio a 5 μM foi capaz de erradicar tumores mamários induzidos por células 4T1 e suas metástases pulmonares, em camundongos BALB/c (RODRIGUES et al., 2020).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Desenvolver um sistema *codelivery* por meio da otimização de carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN), encapsulando o antineoplásico doxorrubicina (DOX) e o fotossensibilizador ftalocianina de cloro-alumínio (FtClAl) a ser irradiada, de modo a combinar quimioterapia e a terapia fotodinâmica, para o tratamento do câncer de mama.

2.2. Objetivos específicos

- Desenvolver formulações CLN_{DOX/FtClAl} de forma otimizada, por planejamento fatorial (DoE), pela combinação de diferentes proporções de lipídios sólido e líquido, tensoativo, fotossensibilizador e DOX.
- Caracterizar as formulações obtidas pelas técnicas de DLS (medidas de tamanho e índice de polidispersão, PDI); espalhamento de luz eletroforético (potencial Zeta, PZ), análise de rastreamento de nanopartículas (concentração de nanopartículas em suspensão); espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (análise estrutural/química); microscopia eletrônica de transmissão e Cryo-TEM (análise morfológica das partículas).
- Avaliar a estabilidade físico-química (tamanho, PDI, PZ, pH) das formulações selecionadas no DoE por um período mínimo de 12 meses, nas temperaturas de 2-8°C e 25°C.
- Avaliar a estabilidade química, através de ensaios de peroxidação lipídica, das formulações otimizadas, submetidas à irradiação (com LED a 660 nm e diferentes potências), para TFD.
- Determinar a geração de ROS nas formulações, antes e após irradiação.
- Avaliar a citotoxicidade das nanoformulações sobre linhagens de adenocarcinoma mamário murino (4T1-luc) e humano (MCF-7), em comparação com células não tumorais de fibroblastos (NIH/3T3), pelo ensaio de MTT.
- Avaliar o efeito das formulações na aderência das células de CM, por ensaio clonogênico.
- Avaliar a internalização celular das nanoformulações pelas células de CM, usando microscopia confocal.
- Analisar a influência das formulações no processo de migração de células tumorais fluorescentes (linhagem 4T1-luc).
- Demonstrar o efeito combinado da quimioterapia e TFD, utilizando a formulação otimizada: CLN_{DOX/FtClAl}, no tratamento *in vitro* de células de câncer de mama.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. MATERIAIS

3.1.1. Reagentes

Reagentes	Especificações
Acetato de uranila	Sigma-Aldrich, EUA
Ácido fosfórico	Ecibra, Cetus, Brasil
Ácido Tiobarbitúrico	Sigma Aldrich, China
Azul de Trypan	Sigma Aldrich, EUA
BHT 2,6-Di-tert-butyl-4-methylphenol	BHT 2,6-Di-tert-butyl-4-methylphenol
Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio (MTT)	Sigma, EUA
Cloridrato de Doxorubicina	AK Scientific, Inc. EUA
Clorofórmio	ACS, Científica. Brasil
Cristal de Violeta	Dinâmica Química Contemporânea Ltda, Brasil
Dimetilsulfóxido (DMSO)	Laborclin, Brasil
Etanol	Dinâmica, Brasil
Estreptomicina	Sigma Aldrich, EUA)
Ftalocianina de Cloro-Alumínio	Sigma-Aldrich, EUA
Grades 300 Mesh Cu, com filme de Formvar	Koch Electron Microscopy Ltda, Brasil
1,3 difenil isobenzofurano	Sigma-Aldrich, EUA
Meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM)	Sigma Aldrich, EUA)
Metanol	Synth,
Miristato de Miristila	Dhaymers Química Fina, Brasil (Croda do Brasil Ltda, Brasil)
Miglyol 812®	Dhaymers Química Fina, Brasil
Penicilina	Sigma Aldrich, EUA)
Poloxamer 188 (P188)	Sigma Chem. Co., EUA
Soro Fetal Bovino	Sigma Aldrich, EUA
Suportes metálico (stubs) e telas de cobre (grids)	Electron Microscopy Sciences, EUA
Tetraetoxipropano	Sigma-Aldrich, EUA
Tripsina EDTA	Sigma Aldrich, EUA

3.1.2. Equipamentos

Equipamentos	Especificações
Agitador de tubos AP 56	Phoenix Luterco, Brasil
Autoclave	Stermax, Brasil
Balança Analítica digital	AND HM-202, EUA
Bomba a vácuo	Tecnal, Brasil
Ultrassom de banho	Thornton T14, Brasil
Centrífuga de tubos Falcon	Quimis, Brasil
Contador automático de células	(Invitrogen, Termo Fisher Scientific, EUA)
Estufa	Shel Lab – incubadora de CO ₂ , EUA
Espectrofotômetro	Varian® ProStar, EUA
Fluxo Laminar	Trox ® Technik, Brasil
Microscópio óptico TS100	(Nikon Eclipse, Japão)
Medidor de pH 300 M	Analyser Instrumentação Analítica, Brasil
Microscópio Eletrônico de Transmissão	Tecnai G2 Spirit BioTWIN (FEI Co., EUA)
Rastreador de nanopartículas	Malvern Panalytical, Malvern, Reino Unido
Nanosight NS 300	
Ultraturrax 518N-19G	T-25, IKA® Merk, Darmstadt, Alemanha
Ultra-Sonicador de ponta	Vibracell, Sonics & Mat. Inc., Danbury, EUA
Analizador de partículas por espalhamento dinâmico de luz	Malvern Panalytical, Malvern, Reino Unido
Zetasizer ZS 90	

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Planejamento experimental (DoE)

As ferramentas multivariadas de otimização para melhorar o desempenho e verificar interações entre variáveis estatisticamente significativas têm sido muito utilizadas nas últimas décadas para o desenvolvimento de sistemas de processos industriais, métodos analíticos e formulações farmacêuticas, entre outros (FUKUDA et al., 2018; LEARDI, 2009; NOVAES et al., 2017). Dessa forma, a análise de um conjunto de dados com utilização da abordagem de *Design of Experiments* (DoE) possibilita alcançar resultados desejáveis (voltados ao objetivo esperado), pela possibilidade de previsão de um modelo adequado à problemática imposta (HIBBERT, 2012; NOVAES et al., 2017; POLITIS et al., 2017; TRIEFENBACH, 2008).

Primeiramente, as proporções de excipientes da formulação foram determinadas pelo método quimiométrico (QbD) utilizando um planejamento fatorial (2^4) com triplicata no ponto central (PC) por meio do software *Design Expert*® (*Stat-Ease versão 13*). A formulação de CLN_{DOX/FtClAl} foi inicialmente desenhada pelo teste de 4 variáveis independentes (fatores): concentração total de lipídios (% TL), concentração de lipídio líquido (% LL), concentração de surfactante (% P188) e concentração de Ftalocianina de Cloro-Alumínio (FtClAl) (Tabela 2), mantendo-se a concentração de doxorrubicina (DOX) em 100 µM. Contudo, este modelo não se apresentou adequado e, por isso, foi realizada uma expansão do planejamento fatorial, adotando-se o planejamento de composto central (CCD) com 5 réplicas no ponto central e $\alpha = 1$ (Composto Central de Face Centrada).

Tabela 2 - Níveis das variáveis independentes ("inputs") de processo e critérios desejáveis das propriedades de interesse (respostas esperadas, variáveis dependentes) no planejamento experimental dos CLN.

Variáveis experimentais	Símbolos no programa	Nível baixo	Nível alto
Total de lipídios (%)	A	10	20
Lipídio líquido (% m/m)	B	20	35
Poloxamer 188 (% m/m)	C	5	15
Ftalocianina de Cloro-Alumínio (µM)	D	50	200
Propriedades de interesse		Critérios	
Tamanho (nm)		Mínimo	
Índice de polidispersão - PDI		Mínimo	
Potencial Zeta (mV) - PZ		Máximo	

Com a determinação destes modelos quimiométricos, 29 combinações experimentais diferentes foram formuladas e analisadas quanto às respostas de interesse (tamanho, PDI, PZ) e possíveis interações entre as variáveis experimentais (TL, LL, P188 e FtClAl). As

formulações foram preparadas seguindo-se a ordem de aleatoriedade proposta (*Run*) pelo software e as respostas tamanho de partículas, PDI e PZ das nanopartículas foram medidas no equipamento de espalhamento de luz dinâmico Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments, Reino Unido) (RODRIGUES DA SILVA et al., 2017). A seleção da formulação final atendeu aos requisitos de desejabilidade, como será discutido em resultados (item 4.1 e Tabela 3).

3.2.2. Preparo dos CLN contendo doxorrubicina e ftalocianina de cloro alumínio

Os CLN foram preparados através do método de emulsificação-ultrasonicação (Figura 7) (MENDES et al., 2013; RODRIGUES DA SILVA et al., 2021). Na matriz lipídica foi utilizado miristato de miristila (MM) como lipídio sólido e uma mistura de triacilgliceróis (Migliol 812N[®]) (MG) como lipídio líquido. O tensoativo não-iônico Poloxamer 188 (P188), foi usado para estabilizar os CLN. Foram desenvolvidas 4 formulações: CLN_{CTL} (controle), CLN_{DOX} (somente doxorrubicina), CLN_{FtClAl} (somente fotossensibilizador) e CLN_{DOX/FtClAl} (contendo doxorrubicina e o fotossensibilizador).

Ambos os lipídios (LS e LL) foram aquecidos em banho-maria, 10 °C acima da temperatura de fusão do Miristato de Miristila, 37-39°C (RIDOLFI et al., 2012). O fármaco DOX_{HCl} e/ou o fotossensibilizante FtClAl foram inseridos e misturados, sob agitação magnética, até total solubilização na fase oleosa. A concentração do fármaco DOX foi fixada em 100 µM (ABDOLAHPOUR et al., 2017, 2018) e a quantidade de FtClAl (100 µM) foi a suficiente para fotossensibilização e produção de ROS (ZHU et al., 2021). Em seguida, a fase aquosa contendo surfactante P188 foi adicionada na fase oleosa (ambas na mesma temperatura de aquecimento) e a amostra foi homogeneizada sob agitação de 10000 rpm por 3 min, utilizando Ultra-Turrax[®] de 18 mm de diâmetro (IKA[®] Ultra-turrax[®] T-25, Merk, Germany). Em seguida, a pré-emulsão (O/A) formada foi levada à sonicação com micro-tip de titânio (Vibracell, Sonics & Materials Inc., Danbury, USA) em potência de 60W e 20 kHz de frequência nominal para formação das nanopartículas, em ciclos de 30s (ligado/desligado) durante 15 min, sob aquecimento. Finalmente, a nanoemulsão formada foi arrefecida em banho de gelo até 25 °C para formação dos CLN, armazenados para caracterizações posteriores.

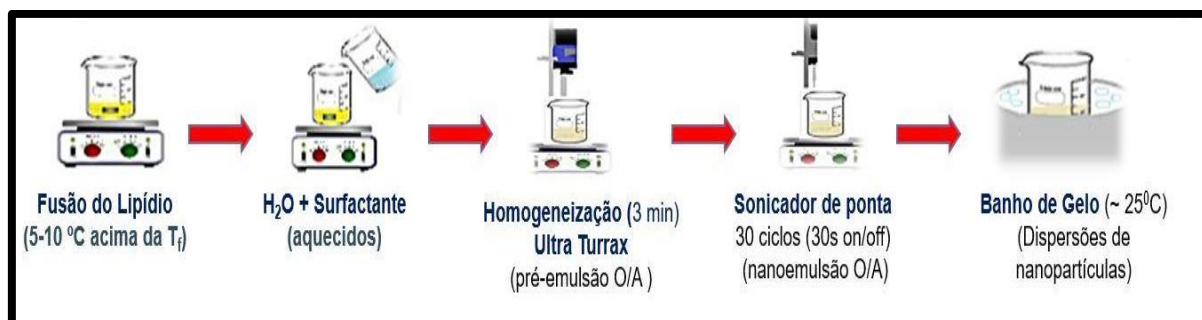


Figura 7 - Esquema geral do preparo dos CLN, pelo método de emulsificação-ultrassonicação.

3.2.3. Determinação de tamanho, PDI e PZ das nanopartículas

A técnica de espalhamento dinâmico de luz foi utilizada para determinar a média do diâmetro hidrodinâmico e o índice de polidispersão, nos diferentes sistemas nanoestruturados preparados, no equipamento ZetaSizer Nano ZS 90 (Malvern, Worcestershire, UK) (Figura 8) no módulo de intensidade de espalhamento, a 25 °C. Os valores do potencial Zeta (em mV) foram determinados por espalhamento de luz eletroforético, no mesmo equipamento. Para tanto, os diferentes sistemas foram diluídos 1:1000 (v/v) em água Mili-Q e os resultados foram expressos pela média de 3 medidas, a partir do dia zero do preparo, e em triplicatas independentes.



Figura 8 - Equipamento de espectroscopia de correlação por fótons (DLS) ZetaSizer Nano ZS 90.

3.2.4. Análise por rastreamento de nanopartículas

As medidas de rastreamento de partículas (NTA) foram realizadas com um feixe de laser verde (532 nm), no equipamento NanoSight NS300 (Malvern, UK) (Figura 9) que utiliza um vídeo-microscópio para rastrear o movimento individual das partículas em suspensão, permitindo mensurar o tamanho, a polidispersão de tamanhos (índice Span) e a concentração de partículas em suspensão (RIBEIRO et al., 2018). As medidas foram feitas após diluição das

amostras em água desionizada (1:50000 v/v) a 25°C e os resultados expressos pela média de 3 medidas, em triplicatas independentes. Assim como o PDI, os valores de Span denotam o grau de polidispersão de tamanhos de partículas, sendo que valores menores que uma unidade são indicativos de sistemas homogêneos, desejáveis para DDS (RIBEIRO et al., 2018). O índice Span foi calculado de acordo com a Equação 1:

$$Span = \frac{D90\% - D10\%}{D50\%} \quad \text{Equação 1}$$

Onde: D10, D50 e D90 são os diâmetros médios das partículas correspondentes a 10, 50 ou 90% da população das partículas (LI et al., 2007).



Figura 9 - Equipamento NanoSight NS300 Malvern, utilizado para as análises de NTA.

3.2.5. Medidas do Potencial hidrogeniônico

O pH das nanoformulações de CLN foi avaliado utilizando-se o pHmetro Digimed® DM-22, a 25 °C, previamente calibrado com os padrões de pH 7,0 e 4,0. As medidas foram realizadas em triplicatas e os dados expressos como a média ± desvio padrão.

3.2.6. Estabilidade físico-química das formulações

As formulações de CLN foram avaliadas pelos seguintes parâmetros de estabilidade: tamanho de partícula, PDI, PZ, pH e concentração de partículas, nas temperaturas de 2-8 °C e 25 °C, por um período de 12 meses. Medidas de estabilidade química (peroxidação lipídica) foram também acompanhadas, após padronização dos testes (ver item 4.9).

3.2.7. Análise morfológica por microscopia eletrônica de transmissão

As amostras de CLN foram visualizadas por microscopia eletrônica de transmissão (MET) no equipamento Tecnai G2 Spirit BioTWIN. Para o preparo das amostras uma gota das formulações (CLN_{CTL}, CLN_{DOX}, CLN_{FtCIAI}, CLN_{DOX/FtCIAI}) foram adicionadas a um filme de formvar coberto com uma grade de cobre. Após 60 s, o excedente da amostra foi removido e uma gota de solução aquosa de uranila a 2% (p/p) acrescentada, para melhorar o contraste das imagens. Após 60 s, o excesso foi removido com papel de filtro e, na sequência, uma gota de água Milli-Q foi adicionada à grade e o excesso retirado, após 60 s. Por fim, as grades permaneceram em repouso por 24 h, até a secagem das amostras e leitura.

3.2.8. Análise morfológica por criomicroscopia eletrônica de transmissão

A análise morfológica dos CLN por cryoTEM foi feita no Laboratório Nacional de Nanotecnologia (LNNano, CNPEM) em Campinas-SP. Foi utilizada uma grade de malha Holey Lacey de 300 mesh de Ted Pella®, submetida a um procedimento de descarga luminosa (sistema de descarga Pelco easiGlow-Ted Pella, EUA) de 15 mA por 10 s, para torná-la mais hidrofílica. Posteriormente, as grades foram inseridas em um Vitrobot® (Mark IV, Thermo Fischer Scientific, EUA), onde 3 µL de cada amostra (CLN_{CTL}, CLN_{DOX}, CLN_{FtCIAI} e CLN_{DOX/FtCIAI}) foi adicionado. Uma transferência automática (2-3s) foi feita em seguida, com uma força de transferência negativa (força de blot = -5) para secar o excesso de amostra. Em seguida a grade foi mergulhada rapidamente em etanol líquido envolvido em ambiente de nitrogênio líquido. As medidas foram feitas no microscópio JEOL-1400 PLUS (Thermo Fischer Scientific, EUA) a 120 Kv, utilizando o software TEM Center for JEM 1400 Plus para aquisição das micrografias. O software Gatan Digital Micrograph™ (GATAN, EUA) foi usado para tratamento das imagens.

3.2.9. Análise termogravimétrica acoplada à Espectroscopia de transmitância na região do infravermelho (TGA-FTIR)

Para o estudo das interações moleculares entre excipientes das formulações de CLN e melhor compreensão estrutural das mesmas foram realizadas as medições em TGA-FTIR, no equipamento TGA PERSEUS TG 209 F1 Libra (Netzsch, Alemanha) e espectrômetro de massa QMS 403 Aeolos (Netzsch, Alemanha) colocado sob N₂ a 40 e 60 mL/min como purga e gás de proteção. Os dados foram coletados de 28 a 180°C, usando taxa de aquecimento de 10 K/min. Cerca de 3 a 5 mg de amostras liofilizadas foram colocadas em cadinho feito de Al₂O₃ e tampas

perfuradas foram usadas. Os espectros FTIR dos gases envolvidos foram coletados a cada 3°C na faixa espectral de 650 a 4400 cm^{-1} . Espectros de massa foram coletados a cada 0,4 s em m/z de 1 a 50. Isotermas de 10, 30 e 60 minutos foram testadas para encontrar a melhor condição.

3.2.10. Espectroscopia Raman intensificada por superfície

A técnica de imageamento Raman é muito eficaz para avaliar aspectos de miscibilidade das nanopartículas (MITSUTAKE; POPPI; BREITKREITZ, 2019). Ela fornece informações espectrais e espaciais dos excipientes que compõem os CLN, possibilitando a análise do grau de homogeneidade da nanopartícula, sem necessidade de preparo prévio, com uso de solventes ou destruição da amostra (BREITKREITZ et al., 2013; MITSUTAKE; POPPI; BREITKREITZ, 2019; RODRIGUES DA SILVA et al., 2017). As imagens Raman foram coletadas usando o microscópio inVia Raman e o software Wire v. 5.4 (Renishaw, Gloucestershire, Reino Unido). As amostras foram depositadas em lâminas revestidas com alumínio (Deposition Research lab, Inc. St. Charles, MO, USA) e expostas a uma excitação laser de 785 nm, na potência laser de 10 mW por 2 s, dispersa por uma Grade de 1200 linhas/mm e detector de dispositivo de carga acoplada. Uma objetiva de 50 x longa distância (N.A, 0,50) foi usada dando uma resolução espacial de 958 nm e 0,6 μm de profundidade de foco. A faixa espectral foi de 715 a 1806 cm^{-1} . Os dados foram adquiridos usando o modo de varredura de linha. Cubo de dados ($X \times Y \times \lambda$), onde X e Y são os números de pixel nos eixos x e y, enquanto λ é o número de deslocamentos Raman com dimensões de 91x91x1015, obtidos.

3.2.11. Análise da produção Espécies Reativas de Oxigênio (ROS)

Para a determinação da geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) pelos CLN, foi utilizado o método de degradação do benzofurano, descrito por SPILLER e col. (1998). O princípio do método reside na degradação de 1,3-difenil-isobenzofurano (DPBF) – com pico de absorção característico em $\lambda = 414 \text{ nm}$ – pelo oxigênio singlete gerado em reação radicalar. A absorbância do DPBF decai proporcionalmente à geração desta espécie reativa.

Para esse experimento, foi preparada uma solução de DPBF (0,22 mg/mL) em etanol anidro. Posteriormente, 200 μL das formulações - CLN_{CTL} (controle negativo), CLN_{DOX}, CLN_{FtClAl}, CLN_{DOX/FtClAl}, DOX, FtClAl e DOX/FtClAl- foram preparadas em diluições seriadas e dispostas em microplacas de 96 poços. Em seguida, foram adicionados 10 μL da solução de DPBF às nanoformulações em cada poço, e feita leitura em espectrofotômetro. Numa segunda microplaca de 96 poços as amostras foram irradiadas a uma fluência de 18 J/cm^2 por 10 s, e a

cada minuto, por um período de 10 min. Durante esse tempo foi realizada a leitura em espectrofotômetro a 414 nm, para posterior quantificação da presença de ROS. Os resultados foram expressos em % formação de ROS, relativamente à máxima formação, pela amostra de FtClAl em solução (controle 100%).

3.2.12. Análise de peroxidação lipídica

A análise de peroxidação lipídica é muito importante para avaliar a estabilidade química de DDS como nanoemulsões, lipossomas e CLN, em que a formação de peróxido pode ser um indicativo de degradação lipídica e instabilidade das partículas em suspensão. Os produtos da peroxidação lipídica são notoriamente instáveis. A quantificação dos níveis de peroxidação é realizada através da determinação dos metabólitos dos lipoperóxidos, sendo crucial considerar vários fatores durante o processo de oxidação. Estes incluem a conjugação de duplas ligações, a formação de peróxidos e a geração de aldeídos altamente reativos, especialmente o malondialdeído (MDA) (NEW, 1990). Dentre os métodos analíticos para determinar o dano oxidativo em lipídios (quantificação de hidroperóxidos, dienos conjugados e endoperóxidos ou peróxidos cíclicos o mais comumente usado baseia-se na reação, do MDA, em altas temperaturas, com o ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) e é específico para a determinação de endoperóxidos. A reação produz um cromóforo vermelho que pode ser detectado fotometricamente a 532 nm ou por fluorescência (OHKAWA; OHISHI; YAGI, 1979).

Para a realização deste teste, foi determinada uma curva de calibração com o padrão tetraetoxipropano (TEP) à 0,2 mM, em concentrações que variaram de 0 a 120 μ M. Em alíquotas das formulações a serem analisadas, foram adicionados os seguintes reagentes: solução etanólica de butilidroxitolueno 0,2% e ácido tiobarbitúrico a 0,5% em solução de dodecilsulfato de sódio a 0,3% (reagente de cor). As amostras foram colocadas em chapa térmica a 100°C por 1 hora e, posteriormente, foram resfriadas em banho de gelo. Em seguida, adicionou-se 2 mL de clorofórmio/tubo e, após agitação, as amostras foram centrifugadas a 500 x g por 20 min. a 4 °C. A absorbância do sobrenadante foi medida a 532 nm e a concentração de endoperóxidos determinada pela curva padrão de TEP.

A formação de endoperóxidos foi medida nos CLN otimizados e seus controles, com e sem irradiação com LED de 660 nm a 18 J/cm² (28 minutos), para determinar o possível efeito deletério da irradiação a ser empregada em TFP na estabilidade física dos CLN (12 meses).

3.2.13. Ensaios *in vitro*

Neste trabalho foram examinadas as seguintes linhagens celulares perpetuadas: de adenocarcinoma de mama humano (MCF-7, ATCC HTB-22TM), de adenocarcinoma mamário murino transfectada com luciferase (4T1-luc, ATCC CRL-2539TM), e de fibroblastos murinos (NIH-3T3, ATCCR CRL-1658TM). As células foram cultivadas em meio DMEM e suplementadas com 10% de soro fetal bovino (SFB), 1% de antibiótico (penicilina e estreptomicina) e incubadas em estufa de CO₂ (Shel Lab – EUA), na temperatura de 37 °C com umidade atmosférica, e atmosfera de 95% de ar e 5% de CO₂.

3.2.13.1. *Análise de viabilidade celular por ensaio de MTT*

Para a realização dos testes de viabilidade, as células MCF-7, 4T1-luc e NIH-3T3 foram tripsinizadas e plaqueadas na densidade de 4×10^4 células/mL em placas de 96 poços, e incubadas a 37 °C, 5% de CO₂ por 24 h, até atingirem a semiconfluência. Foram realizados dois ensaios de citotoxicidade: sem a aplicação da TFD (escuro) e com a aplicação da TFD (claro). Para os testes, o meio foi substituído por DMEM contendo diferentes formulações em concentrações seriadas, sendo: CLN_{CTL}, CLN_{DOX}, CLN_{FtClAl}, CLN_{DOX/FtClAl}, DOX e FtClAl livres. Para o ensaio no escuro, as formulações foram incubadas nas células por 30 min. e depois o sobrenadante foi removido, os poços foram lavados com PBS e adicionado meio de cultivo por mais 24 h. Posteriormente, foi adicionada solução de brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT a 5 mg/mL, Invitrogen, EUA) em meio de cultura e na proporção de 1:10 (v:v), e as amostras incubadas à 37°C por 2 h. A solução contendo MTT foi removida e foram adicionados 100 µL de DMSO (Sigma-Aldrich, EUA) para solubilização dos cristais de formazan formados. A análise de viabilidade em cada poço foi feita por leitura de absorbância no leitor de placas de Elisa em 595 nm. Os dados foram analisados em gráfico de coluna, pelo teste estatístico Two way-ANOVA com pós-teste Bonferroni no *software* GraphPad Prism 10.2.3.

Para o ensaio no claro, as células foram plaqueadas na mesma concentração e tempo de incubação utilizada para os testes no escuro. Posteriormente, o sobrenadante foi removido e os poços lavados com PBS. A placa foi, então, irradiada em PBS com uma fonte LED no comprimento de onda específico de 660 nm a uma distância de 10 cm. Para cada formulação e linhagem foram testados diferentes tratamentos, utilizando duas condições diferentes de densidades de energia: 9 J/cm² (14 minutos) e 18 J/cm² (28 minutos), a fim de comparar a influência destes parâmetros na terapia em análise (Figura 10). Após a exposição, as células

foram mantidas sob condições de cultivo por mais 24 h, protegidas da luz e, então, sua viabilidade foi quantificada pelo ensaio de MTT, como descrito anteriormente. Os dados foram analisados pelo teste estatístico Two-way ANOVA, com pós-hoc Bonferroni no *software* GraphPad Prism 10.2.3, e o valor de IC_{50} foi calculado.

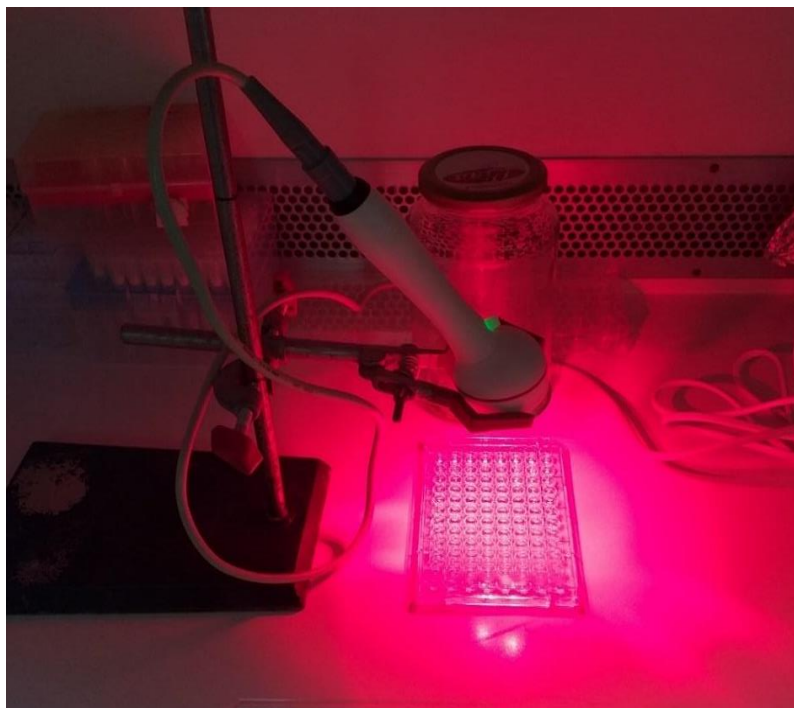


Figura 10 - Imagem mostrando irradiação em condições padronizadas (LED de 660 nm a 10 cm de distância) da placa de cultura de células de 96 poços.

3.2.13.2. Ensaio Clonogênico

O ensaio clonogênico de sobrevivência celular é baseado na habilidade de uma única célula de crescer e formar uma colônia. Para a realização do experimento as células foram plaqueadas a 5×10^5 células (MCF-7 e 4T1) em placas de 6 poços. Após 24h, as células foram tratadas com as formulações (CLN_{CTL} , CLN_{DOX} , CLN_{FtCIAI} , $CLN_{DOX/FtCIAI}$, DOX e FtCIAI livres), nas concentrações inibitórias de IC_{50} . Foram feitos tratamentos sem irradiação, com irradiação a $9 J/cm^2$ e $18 J/cm^2$ e as amostras incubadas em estufa, nas condições de crescimento de cultura celular. Após 24 horas, o meio de cultura foi substituído por meio DMEM a cada três dias até completar 14 dias de incubação. Depois disso, as células foram fixadas com solução de metanol e acetona 1:1, lavadas com PBS 1x duas vezes e coradas com cristal violeta 0,5 % por 30 min. Finalmente, foi feita a contagem manual de colônias.

3.2.13.3. Análise de incorporação de $CLN_{DOX/FtCIAI}$ por microscopia confocal

A determinação semi-quantitativa da internalização celular das formulações (CLN_{CTL} , CLN_{DOX} , CLN_{FtCIAI} e $CLN_{DOX-FtCIAI}$) foi realizada através de medidas de microscopia de

fluorescência confocal, em equipamento Zeiss LSM 510-Meta pertencente ao LacTad/Unicamp. Para tanto as células 4T1-luciferase foram plaqueadas (10^5 células) em placas de 12 poços com lamínulas de 13 mm de diâmetro. Após 24h, as células foram incubadas em meio DMEM com respectivas formulações, na concentração de IC_{50} (concentração inibitória de 50%). Foram testados diferentes tempos de incubação: 30 min, 1h, 2 h e 4h. Na sequência, as células foram lavadas por 5 vezes com PBS para eliminação dos CLN não capturados ou aderidos às células, e posteriormente fixadas utilizando 3,7% de paraformaldeído e 5% de sacarose por 10 min. Finalmente, as células foram marcadas com uma gota de corante DAPI (que possibilita imediata delimitar) os núcleos celulares e com Faloidina (marcação do citoesqueleto). A determinação semiquantitativa da captura celular de CLN foi visualizada em microscópio de fluorescência confocal levando em consideração as características de excitação e emissão de cada fármaco (DOX - Ex: $\lambda = 480$ nm e Em: $\lambda = 560$ nm, FtClAl - Ex: $\lambda = 610$ nm e Em: $\lambda = 680$ nm). As imagens foram obtidas em uma magnitude de 40x e tratadas com o software ImageJ[®] (NIH, Bethesda, EUA).

3.2.13.4. Migração celular

O ensaio de fechamento de ranhura (ou ferida), amplamente utilizado para estudar a migração celular, foi empregado neste experimento para investigar o efeito das formulações na migração das células da linhagem 4T1-luc. As células foram tripsinizadas, contadas e semeadas em placas de 24 poços com lamínulas, com 1×10^5 células por poço. Após alcançarem confluência, uma ranhura foi criada utilizando uma ponteira de 200 μ L. Os poços foram lavados com PBS 1x e o meio de cultura DMEM foi adicionado. As formulações foram então aplicadas na concentração de IC_{50} . O poço controle recebeu apenas meio de cultura. As imagens foram salvas como arquivos TIF, para observação do mesmo campo durante a aquisição da imagem. A marca de referência foi colocada fora do campo de imagem de captura, mas dentro do campo de visão microscópio. Duas áreas da fenda, acima e abaixo da linha guia, foram medidas em cada poço, em 0 e 24 horas de tratamento, com o ImageJ[®] (ALMEIDA et al, 2020; HULKOWER; HERBER, 2011; KRAMER, et al., 2013).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Planejamento experimental

Para o planejamento experimental (DoE), como descrito na metodologia (item 3.2.1), foi utilizado o *software Design Expert*[®] que, por meio da análise estatística de variância identificou os componentes significativos nas respostas de interesse (tamanho, PDI, PZ). Com base nestes parâmetros foram geradas 29 combinações experimentais diferentes, apresentadas na Tabela 3. As análises destes dados serão discutidas a seguir.

Tabela 3 - Planejamento composto central (CCD), mostrando as variáveis independentes: % Total de Lipídio (TL), % de lipídio líquido (LL), % de P188 (surfactante: em relação total de lipídios) e concentração de Ftalocianina Cloro-alumínio (FtClAl), além das respostas obtidas (tamanho, polidispersão (PDI) e potencial Zeta (PZ) das partículas

	A: TL %	B: LL %	C: P188 %	D: FtClAl (μ M)	Tamanho (nm)	PDI	PZ (mV)
1	10	20	5	50	181,1	0,157	-20,9
2	20	20	5	50	223,7	0,163	-20,9
3	10	35	5	50	179,5	0,150	-15,7
4	20	35	5	50	221,0	0,154	-24,4
5	10	20	15	50	132,3	0,163	-15,5
6	20	20	15	50	149,9	0,202	-15,3
7	10	35	15	50	129,5	0,162	-17,7
8	20	35	15	50	140,4	0,191	-28,3
9	10	20	5	200	189,5	0,171	-30,8
10	20	20	5	200	228,1	0,141	-29,8
11	10	35	5	200	177,8	0,142	-26,1
12	20	35	5	200	234,7	0,145	-29,6
13	10	20	15	200	128,0	0,179	-12,4
14	20	20	15	200	156,2	0,223	-14,3
15	10	35	15	200	118,3	0,177	-10,3
16	20	35	15	200	158,1	0,158	-13,2
17	10	27,5	10	125	147,3	0,157	-16,8
18	20	27,5	10	125	171,7	0,123	-15,2
19	15	20	10	125	161,4	0,167	-21,0
20	15	35	10	125	162,1	0,140	-14,9
21	15	27,5	5	125	195,5	0,115	-22,7
22	15	27,5	15	125	135,8	0,223	-23,1
23	15	27,5	10	50	152,6	0,120	-25,8
24	15	27,5	10	200	174,0	0,128	-22,8
25	15	27,5	10	125	158,3	0,140	-23,7
26	15	27,5	10	125	155,0	0,165	-28,1
27	15	27,5	10	125	159,7	0,144	-25,8
28	15	27,5	10	125	166,1	0,161	-23,2
29	15	27,5	10	125	160,2	0,187	-19,4

4.1.1. Tamanho

4.1.1.1. Análise estatística

Para a interpretação dos dados experimentais, na otimização do planejamento experimental é fundamental a adequada análise dos modelos estatísticos gerados pelo *software*. Desta forma, para a resposta *tamanho (size)*, o modelo sugerido foi o Quadrático, indicando que há uma relação entre os fatores experimentais e a variável de resposta. Foram gerados os gráficos de diagnósticos que tiveram por objetivo demonstrar o comportamento dos resíduos presentes nos dados experimentais. Se o modelo empregado é válido, os resíduos devem seguir uma distribuição Normal (padrão de aleatoriedade devido ao erro experimental). Com base na análise dos coeficientes do modelo foi possível avaliar a maneira como cada composto influenciou a resposta estudada: **positivamente** se o composto aumentou a resposta, ou **negativamente** se o composto diminuiu a resposta, ou ainda se houve interação entre eles e como esta interação afetou a resposta esperada. Os resultados são mostrados a seguir.

4.1.1.2. Análise de Interações e de Superfícies de Resposta: Tamanho das partículas

Conforme a Tabela 3, as formulações de CLN_{DOX/FtCIAI} apresentaram tamanhos de partículas entre 118,3 nm (Formulação 15) e 234,7 nm (Formulação 12). Para esta resposta os fatores significativos ($p < 0,05$) foram: TL (A), Surfactante (C), FtCIAI (D) e suas respectivas interações: AC (TL e surfactante) e AD (TL e FtCIAI). A Figura 11 mostra a superfície de resposta para a resposta *Tamanho (size)*. Observa-se o efeito *negativo* do surfactante no “tamanho” das partículas, ou seja, quanto maior a concentração de surfactante, menor é o tamanho dos CLN, mesmo com o aumento da concentração de TL e FtCIAI (Figura 11 A e B). Este efeito do surfactante na formulação já era esperado, uma vez que surfactantes diminuem a tensão superficial entre a fase aquosa e a fase lipídica, favorecendo a formação de nanopartículas de tamanhos menores e impedindo a coalescência de gotículas maiores (BHATTACHARJEE, 2016; HAN et al., 2008; VELMURUGAN; SELVAMUTHUKUMAR, 2016). Além disso, também é bem descrito na literatura que os *Poloxamers (Pluronic)*, copolímeros tribloco de polióxido etileno (POE = 2) e polióxido propileno (POP = 1), se adsorvem fortemente à superfície de nanopartículas hidrofóbicas (MEI et al., 2009; STORM et al., 1995). As cadeias de POE fornecem estabilidade à interface das nanopartículas por repulsão estérica, evitando a agregação com partículas adjacentes (MEI et al., 2009).

Em contrapartida, uma maior porcentagem total de Lipídios (TL) aumenta o tamanho das partículas, exercendo um efeito positivo (Figura 11 C). Alguns autores relatam que o aumento da quantidade de lipídio sólido no sistema pode resultar no aumento da viscosidade da

fase lipídica, fazendo com que a homogeneização e a sonicação sejam menos eficientes, aumentando o tamanho das partículas (FANGUEIRO et al., 2014; LASOÑ et al., 2017; PRADHAN et al., 2020).

Vale ressaltar que a concentração de FtClAl (de 50 μM a 200 μM) não alterou o tamanho das partículas. Isso é importante porque mostra a versatilidade das partículas e possibilita o uso de larga faixa de concentração do FS, sem alterar o tamanho dos CLN, parâmetro importante para a biodistribuição, na aplicação clínica.

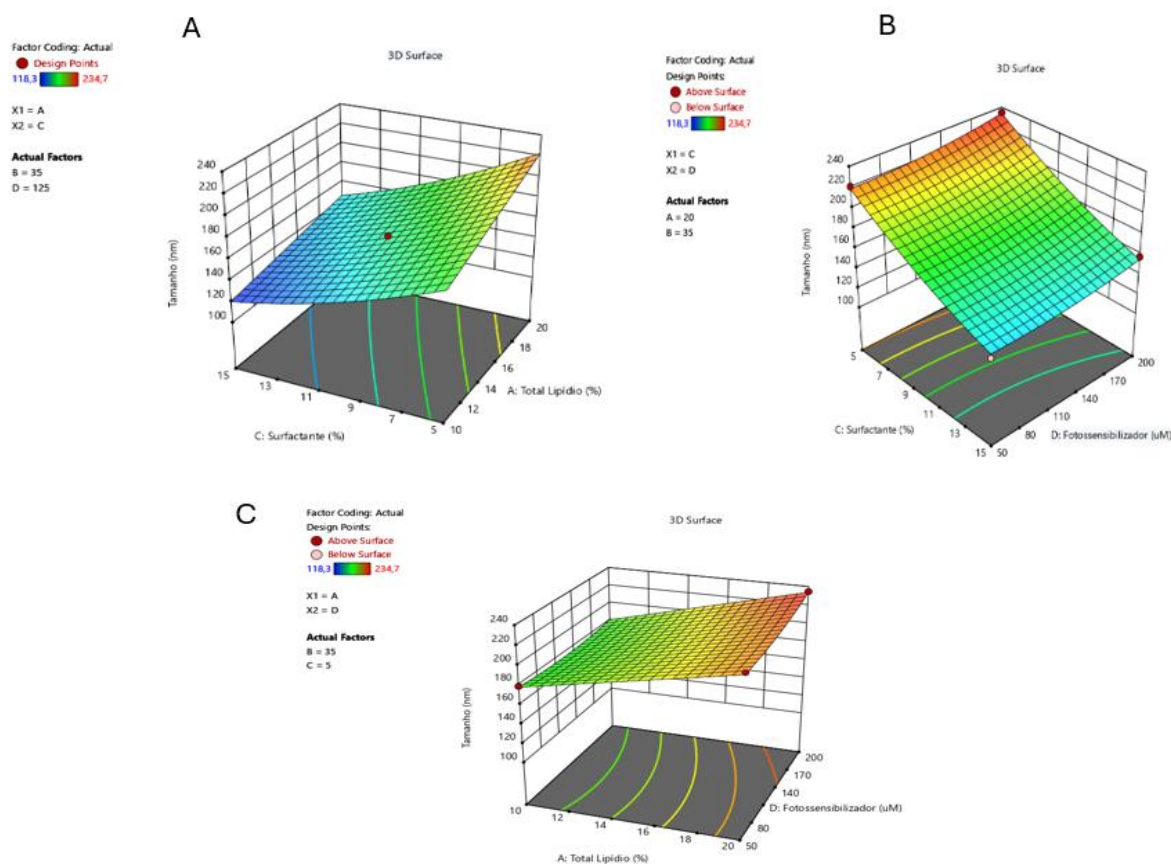


Figura 11 - Superfície de resposta 3D para a resposta tamanho (size) das partículas de CLN. Efeito das variáveis TL e surfactante (A), surfactante e fotossensibilizador (B) e TL e fotossensibilizador (C).

4.1.2. Índice de polidispersão (PDI)

4.1.2.1. Análise de modelo estatístico

Na resposta PDI, dois modelos foram sugeridos pela análise estatística dos dados: o modelo Linear e o Quadrático. Para fins de análise, foi escolhido o modelo Quadrático.

4.1.2.2. Análise de Interações e Superfície de Resposta

As formulações de CLN_{DOX/FtClAl} apresentaram uma variação de PDI mínima de 0,115 nm (Formulação 21) e máxima de 0,223 (Formulação 14) (Tabela 3), com influência de combinação de vários fatores. Os fatores significativos ($p < 0,05$) para PDI foram as variáveis FtClAl (D) e a interação entre surfactante e FtClAl (CD). O gráfico da Figura 12 mostra a superfície de resposta para PDI em função dos fatores D e CD. Primeiramente, é possível observar o efeito positivo do surfactante na resposta PDI: quando a concentração de P188 é aumentada, ocorre um ligeiro aumento da polidispersão, independentemente da concentração do fotossensibilizador. Ressalta-se que o PDI de todas as formulações testadas (Tabela 3) foi menor que 0,25, o que caracteriza baixa polidispersão da população de partículas (MULLER; RADTKE; WISSING, 2002).

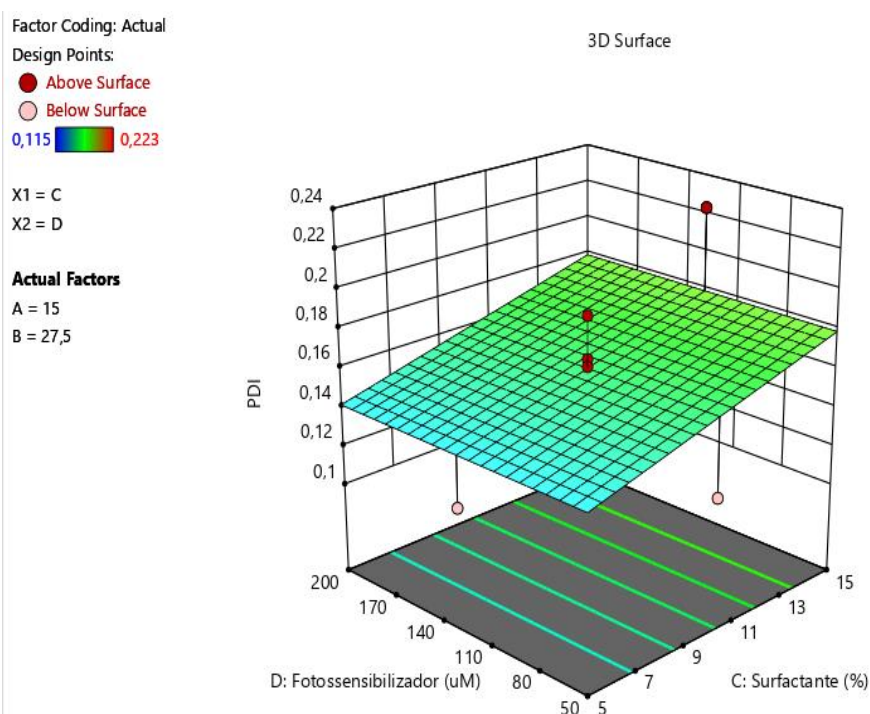


Figura 12 - Gráfico de superfície de respostas 3D para o parâmetro PDI, mostrando o efeito das variáveis surfactante e fotossensibilizador.

4.1.3. Potencial Zeta

4.1.3.1. Análise de modelo estatístico

Na resposta *Potencial Zeta* o modelo sugerido pela análise estatística dos dados foi o 2FI. Para isso, foi feito previamente um Planejamento Fatorial Completo (fatorial 2^4) que revelou a necessidade de ajustar a análise para o modelo cúbico, devido a presença de curvatura.

4.1.3.2. Análise de Interações e Superfícies de Resposta

As formulações de CLN_{DOX/FtClAl} apresentaram variação do potencial Zeta entre -10,3 mV (formulação 15) e -30,8 mV (formulação 9) (Tabela 3). No gráfico de superfície originado

do planejamento fatorial observa-se o efeito positivo da interação entre os fatores TL (A) e LL (B) sobre esta resposta, ou seja, quanto maior a concentração destes, maior (em módulo) o valor do PZ (Figura 13 A). Já os fatores Surfactante (C) e FtClAl (D) apresentaram efeitos opostos (positivo e negativo) sobre o PZ (Figura 13 B): em alta concentração de FtClAl e baixa de surfactante, o PZ tende a ser maior (em módulo). Sugere-se que a presença de FtClAl pode ser responsável por aumentar o PZ nas formulações, como também observado por Goto et al (2017), para a encapsulação de FtClAl em nanopartículas lipídicas sólidas (GOTO; SIQUEIRA-MOURA; TEDESCO, 2017). No entanto, em altas concentrações de FtClAl e de surfactante, o PZ tende a ser menor (em módulo). Para evitar essa diminuição nos valores de PZ não seria interessante utilizar concentrações maiores que 8% de P188, conforme observado nos dados de otimização. Além disso, surfactantes podem aumentar a toxicidade das partículas, motivo pelo qual a sua concentração não deve ser elevada. Ainda: artigos mostram que valores de PZ negativo (como as registradas para as CLN preparadas) favorecem a interação e internalização celular das partículas e, por isso, seria interessante ter uma nanopartícula com PZ mais negativo.

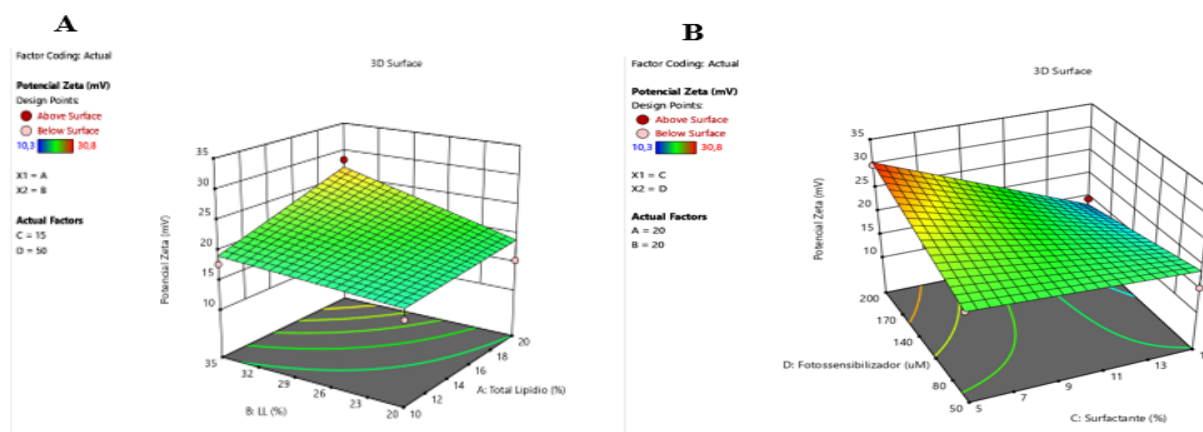


Figura 13 - Superfície de resposta 3D para a resposta Potencial Zeta. Efeito das variáveis TL e lipídio líquido (A), surfactante e fotossensibilizador (B).

4.2. Otimização

Diante da análise de dados apresentada foi definida uma formulação otimizada, que se adequasse aos parâmetros de interesse (definidos na Tabela 2). Os critérios de desejabilidade foram – tamanhos e PDI mínimos e PZ máximo, em módulo. Na Figura 14, o parâmetro desejabilidade mostra a formulação que melhor atende aos critérios desejados (indicados por valores mais próximos de 1). O parâmetro de desejabilidade encontrado foi de 0,581 (Figura 14), sendo os valores das variáveis independentes (variáveis de processo) para a formulação otimizada: **10% para TL (A), 27% de LL (B), 7,5% de surfactante (C) e 80 - 200 µM do**

FS (D), como mostra a Figura 15. Os valores previstos das respostas para esta seleção de fatores foram tamanho = 162,35 nm, PDI = 0,149 e PZ = -24,82 mV.

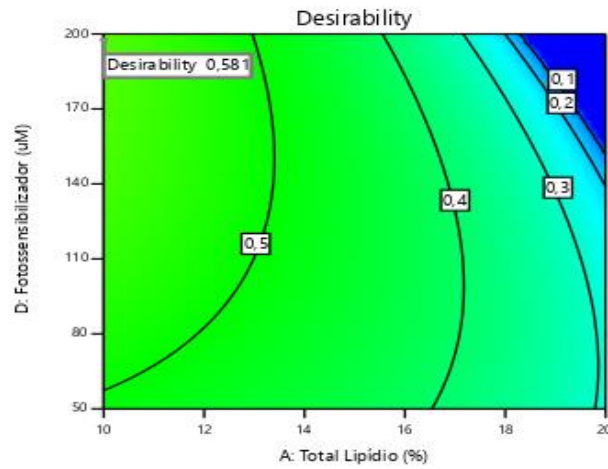


Figura 14 - Gráfico de desejabilidade para escolha da formulação otimizada de CLN_{DOX}/FtClAl.

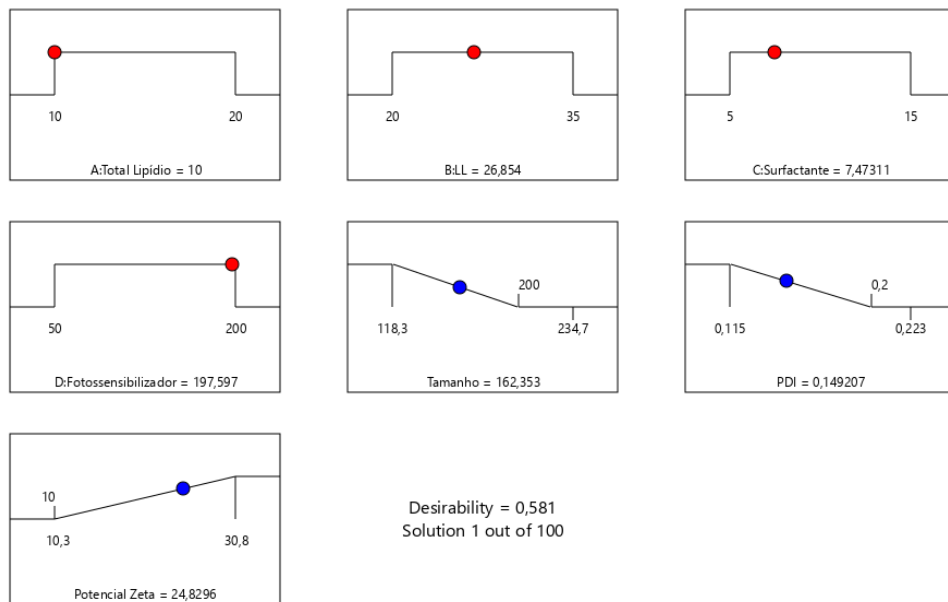


Figura 15 - Otimização simultânea das respostas (azul) e valores ótimos das variáveis independentes (vermelho).

O gráfico de *Design Space* (Figura 16) evidenciou as possíveis regiões do domínio experimental para obtenção da formulação otimizada. Com isso, foi possível observar uma região expansiva de trabalho para as respostas Tamanho, PDI e PZ, indicando uma previsão do modelo robusta em relação aos dados experimentais. Esta análise, sendo uma ferramenta de combinação e interação multidimensional das variáveis independentes (FUKUDA et al., 2018), possibilita a visualização da confiabilidade da região de trabalho para o preparo da formulação otimizada.

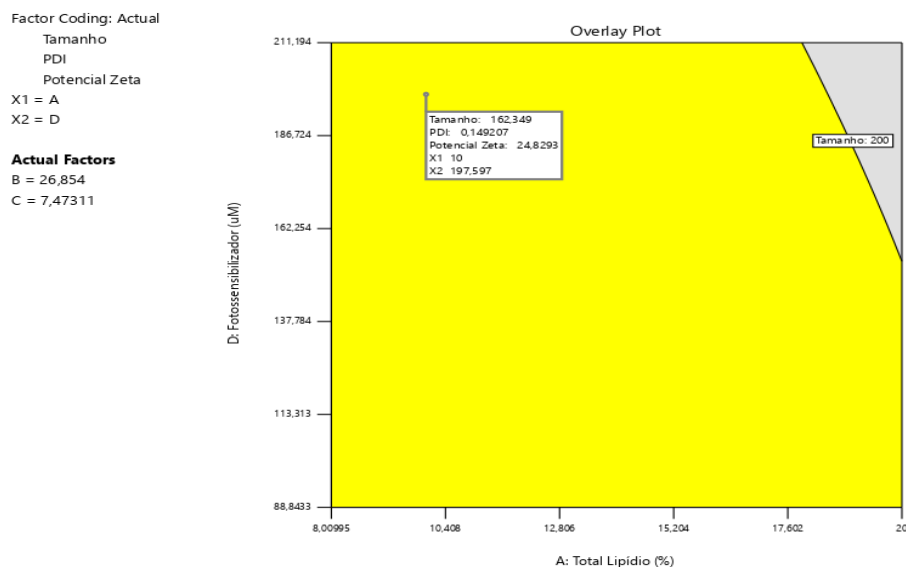


Figura 16 - Gráfico de *Design Space*. Regiões expansivas de domínio experimental indicando as respostas de tamanho, PDI e PZ da formulação de CLN otimizada.

Portanto, a partir da análise do planejamento experimental foi possível desenvolver uma formulação otimizada de CLN_{DOX/FtCIAI}. Para fins comparativos, os respectivos controles desta formulação também foram sintetizados: CLN controle, sem fármacos (CLN_{CTL}), CLN contendo apenas doxorrubicina (CLN_{DOX}) e CLN apenas com o fotossensibilizador FtCIAI (CLN_{FtCIAI}), cujas composições e aspecto estão explicitadas na Tabela 4 e Figura 17, respectivamente.

Tabela 4 - Composição final da formulação otimizada de CLN_{DOX/FtCIAI} e respectivos controles, de acordo com o planejamento experimental. MM=Miristato de Miristila; MG= Miglyol 812.

	MM (LS) (g/mL)	MG (LL) (g/mL)	P188 (g/mL)	DOX (µM)	FtCIAI (µM)
CLN _{CTL}	0,073	0,027	0,075	-	-
CLN _{DOX}	0,073	0,027	0,075	100	-
CLN _{FtCIAI}	0,073	0,027	0,075	-	100
CLN _{DOX/FtCIAI}	0,073	0,027	0,075	100	100

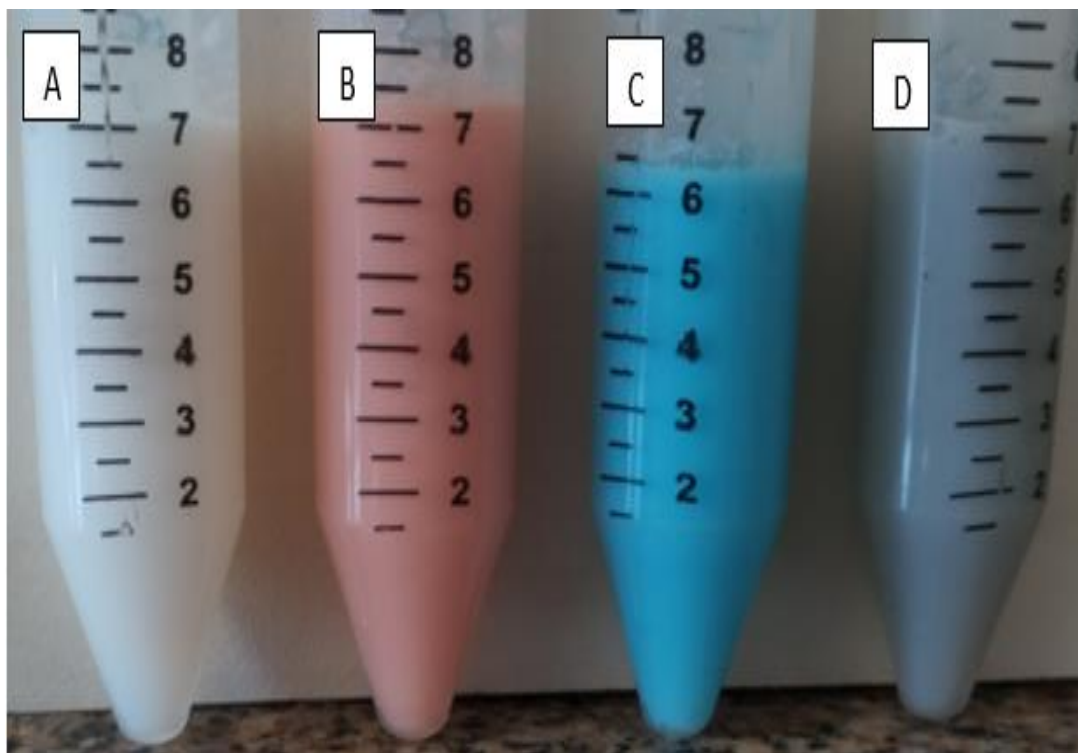


Figura 17 - Fotos da formulação otimizada CLN_{DOX/FtCIAI} (D) e seus controles: CLN_{CTL} (A), CLN_{DOX} (B), CLN_{FtCIAI} (C).

4.3. Propriedades físico-químicas dos carreadores lipídicos

4.3.1. Determinação do Tamanho, PDI, potencial Zeta e pH

O tamanho, PDI e ZP das nanopartículas produzidas (formulação otimizada e seus controles) foram determinados no equipamento ZetaSizer Nano ZS 90, a 25 °C, como citado na metodologia (item 3.2.3). O tamanho médio das partículas dos CLN obtidas foi de: $166,8 \pm 1,5$ nm (CLN_{CTL}), $180,3 \pm 2,4$ nm (CLN_{DOX}), $177,5 \pm 1,6$ nm (CLN_{FtCIAI}), $160,8 \pm 1,9$ nm (CLN_{DOX/FtCIAI}). Os valores de PDI foram de: $0,16 \pm 0,02$ (CLN_{CTL}), $0,15 \pm 0,00$ (CLN_{DOX}), $0,15 \pm 0,01$ (CLN_{FtCIAI}), $0,16 \pm 0,03$ (CLN_{DOX/FtCIAI}) (Tabela 5). Ressalta-se que valores de PDI inferiores a 0,2 caracterizam populações de tamanho homogêneo / pouco polidispersas, com menor probabilidade de agregação durante armazenamento (MULLER; RADTKE; WISSING, 2002). Já o PZ apresentou valores diferentes de zero: $-32,2 \pm 1,6$ mV (CLN_{CTL}), $-31,3 \pm 0,2$ mV (CLN_{DOX}), $-34,4 \pm 0,3$ mV (CLN_{FtCIAI}), $-27,0 \pm 0,9$ mV (CLN_{DOX/FtCIAI}), característicos de formulações de boa estabilidade de prateleira. Finalmente, o valor de pH variou de $6,48 \pm 0,02$ (CLN_{CTL}), $4,74 \pm 0,02$ (CLN_{DOX}), $5,41 \pm 0,01$ (CLN_{FtCIAI}), $5,30 \pm 0,01$ (CLN_{DOX/FtCIAI}).

Tabela 5 - Análise de tamanho, PDI, PZ e pH da formulação otimizada e seus controles.

Formulações	Tamanho (nm)	PDI	PZ (mV)	pH
CLN _{CTL}	166,8 ± 1,5	0,16 ± 0,02	-32,2±1,6	6,48 ± 0,02
CLN _{DOX}	180,3 ± 2,4	0,15± 0,00	-31,3±0,2	4,74 ± 0,02
CLN _{FtClAl}	177,5 ± 1,6	0,15± 0,01	-34,4±0,3	5,41± 0,01
CLN _{DOX/FtClAl}	160,8 ± 1,9	0,16± 0,03	-27,0±0,9	5,30 ± 0,01

Ao aplicar o método estatístico ($p < 0,05$) para comparar as formulações (CLN_{CTL}, CLN_{DOX}, CLN_{FtClAl} e CLN_{DOX/FtClAl}), as análises revelaram variação significativa ($p < 0,001$) principalmente no tamanho (CLN_{CTL} vs. CLN_{DOX} e CLN_{FtClAl}) e PZ das nanopartículas (CLN_{DOX/FtClAl} vs. CLN_{DOX} e CLN_{FtClAl}) além de no pH das formulações (CLN_{CTL} vs CLN_{DOX}, CLN_{FtClAl} e CLN_{DOX/FtClAl}). Estes dados resultam da adição dos ativos (DOX e/ou FtClAl), que podem alterar (ligeiramente) as propriedades físico-químicas.

Ressalta-se que para a formulação otimizada CLN_{DOX/FtClAl} (com a composição de 10% de TL, 27% LL e 7,5% do surfactante) foi previsto pela análise de DoE (Figura 15) tamanhos de 162,3 nm, PDI de 0,149 e ZP de -24,82 mV, isto é, com ótima correlação com os valores registrados experimentalmente, na Tabela 5.

4.3.2. Estudo da estabilidade das formulações

Parâmetros como o diâmetro médio das partículas e o PDI são características importantes da estabilidade das suspensões coloidais, pois estão diretamente ligadas à sua estabilidade coloidal (LAKSHMI; KUMAR, 2010; TAMJIDI et al., 2013), assim como o potencial zeta e pH. As formulações otimizadas foram acompanhadas por 12 meses, em duas temperaturas de armazenamento: ambiente (25°C) e de geladeira (2-8°C). A Figura 18 mostra os resultados obtidos para os parâmetros: tamanho, PDI, PZ e pH, em ambas as temperaturas.

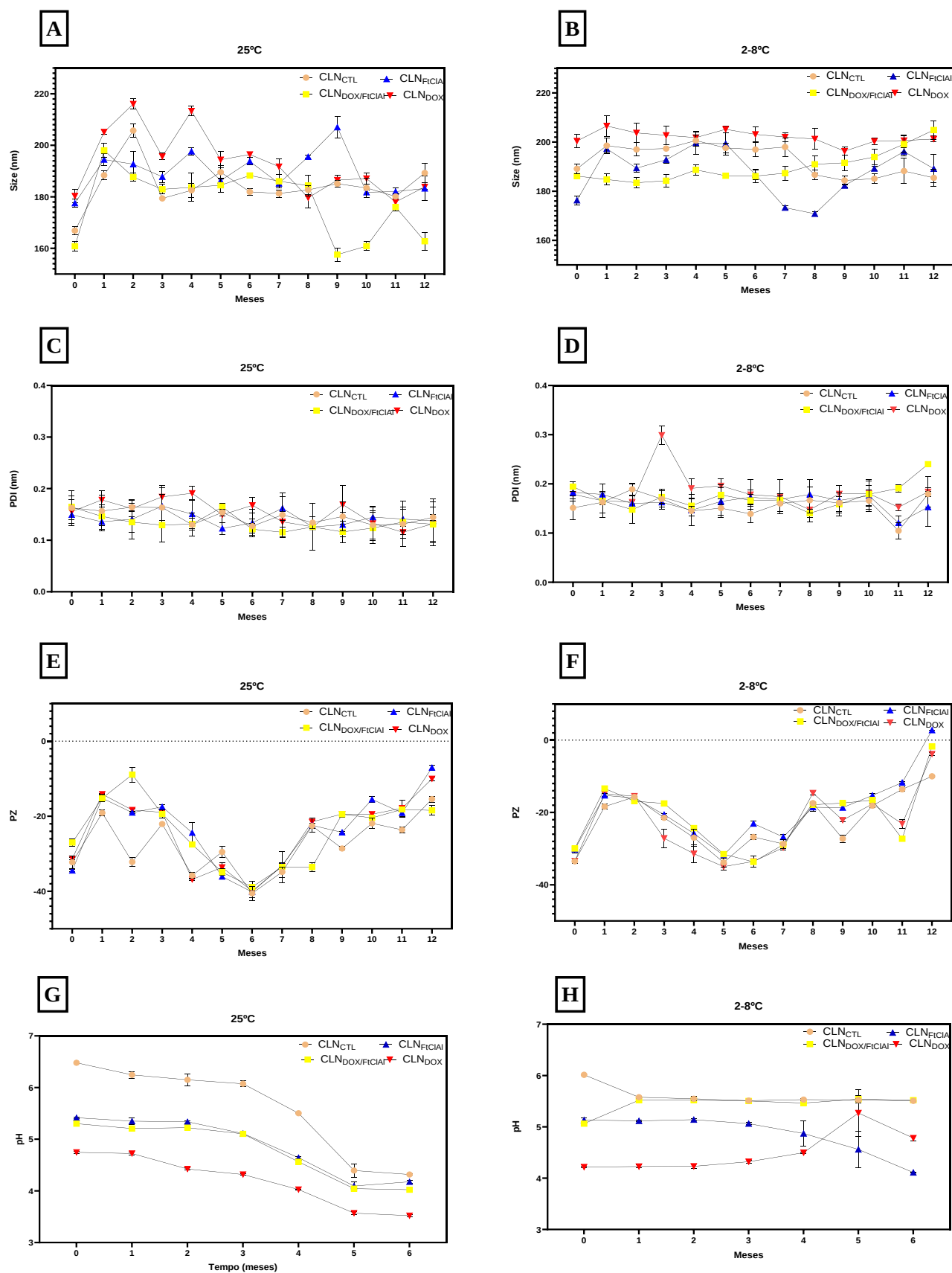


Figura 18 - Estabilidade das formulações CLN_{CTL}, CLN_{DOX}, CLN_{FICIAI} e CLN_{DOX/FICIAI}, analisada considerando-se alterações no tamanho (A e B), PDI (C e D), PZ (E e F) e pH (G e H) durante 12 meses de armazenamento nas temperaturas de 25 °C (esquerda) e 2-8°C (direita).

As medidas de tamanho dos CLN na temperatura de 25° C (Figura 18 A), apresentaram ligeira variação, mas sem caracterizar alteração significativa da estabilidade das formulações. Já as amostras armazenadas à temperatura de 2-8° C (Figura 18 B) não apresentaram variação de tamanho ao longo dos 12 meses de estabilidade ($p < 0,05$), sugerindo que essa temperatura poderia ser utilizada para estocagem. Uma justificativa para a boa estabilidade das formulações é a presença do surfactante não-iônico (P188) que confere estabilização estérica adicional aos CLN, devido as suas cadeias de polioxietileno (POE), como mencionado anteriormente (item 4.1.3.2). É bem descrito na literatura que os surfactantes da série Poloxamer são copolímeros que se adsorvem fortemente à superfície de nanopartículas hidrofóbicas, devido a sua estrutura em triblocos POE – POP – POE: em que o bloco central hidrofóbico (POP) se insere na partícula, enquanto os hidrofílicos (POE) se estendem com mobilidade na interface aquosa (MEI et al., 2009; STORM et al., 1995). Esses blocos POE dão estabilidade à interface das nanopartículas, por repulsão estérica que confere estabilização coloidal, evitando sua agregação, durante armazenamento (MEI et al., 2009).

Para o parâmetro PDI (Figura 18 C, D) em ambas as temperaturas (25°C e 2°-8°C) as formulações não apresentaram alterações significativas ($p < 0,05$) e se mantiveram abaixo de 0,20, com exceção da amostra CLN_{DOX} na temperatura de 2-8°C, que apresentou pontualmente uma medida de 0,30 de PDI após 3 meses de preparo, retornando a valores na faixa de 0,20 posteriormente até os 12 meses de observação.

Os valores de potencial Zeta das formulações (Figura 18 E e F) permaneceram negativos durante o tempo analisado, variando entre -7,2 e - 41,2 mV para a temperatura de 25° C e variando de 2,7 a -34,3 mV para a temperatura de 2-8°C. Mais estudos são necessários para melhor compreensão do impacto do PZ em tais formulações.

Os valores de pH foram acompanhados por 6 meses de estabilidade. Pôde-se observar que houve pouca variação nos valores de pH das formulações armazenadas a 2-8 °C (Figura 18 H), especialmente das formulações CLN_{DOX} e CLN_{FCIAL}. Já nas formulações armazenadas à temperatura ambiente (Figura 18 G), o pH decaiu, chegando a valores de 3,5 para CLN_{DOX}. Essa diminuição não compromete a encapsulação da doxorrubicina, que é estável em soluções em pH entre 3 e 6,5 (STILES E ALLEN, 1991) só se decompondo com aumento do pH. Os dados de estabilidade mostraram que a temperatura de armazenamento de 2-8°C foi a mais estável indicada para armazenamento, no período de 12 meses analisado.

4.4. Caracterização por análise de rastreamento de nanopartículas (NTA)

A técnica de NTA possibilita a medida simultânea (por análise multiparamétrica) das nanopartículas em suspensão, fornecendo dados de tamanho, distribuição de tamanhos (Span), concentração de partículas, além de sua análise direta e em tempo real (GROSS et al., 2016). Os valores de tamanho, polidispersão (Span) e número de partículas em suspensão, medidos por NTA nas formulações de CLN são mostrados na Tabela 6.

Os tamanhos determinados foram compatíveis com aqueles obtidos por DLS (Tabela 5) para as formulações CLN_{CTL} ($157,4 \pm 3,0$ nm) e CLN_{DOX/FtCIAI} ($166,1 \pm 4,3$ nm). No entanto, para as formulações CLN_{DOX} ($166,1 \pm 4,3$ nm) e CLN_{FtCIAI} ($151,4 \pm 4,4$ nm), os valores de tamanho foram ligeiramente menores que os medidos por DLS, o que reflete as diferenças nas metodologias (RIBEIRO et al., 2018). Já a polidispersão, cujos valores de Span foram < 1 , indicaram homogeneidade de tamanhos das partículas (RIBEIRO et al., 2018), confirmando as medidas de DLS, da Tabela 5. De fato, DLS e NTA são técnicas complementares e consagradas nos estudos de DDS para determinação do diâmetro de partículas coloidais na faixa de 1-1000 nm (RIBEIRO et al., 2018).

As medidas de NTA revelaram concentração de partículas da ordem de 4×10^{13} /mL (Tabela 6) para as 4 formulações analisadas, em boa concordância com outras formulações de CLN previamente estudadas (RIBEIRO et al., 2017; RODRIGUES DA SILVA et al., 2017).

Tabela 6 - Análise do tamanho, dispersão de tamanho em 10% (D10), 50% (D50) e 90% (D90) da população de partículas, índice Span (polidispersão), e concentração de partículas/mL, medidas por NTA nas formulações.

Formulações	Tamanho (nm)	Nº partículas $\times 10^{13}$ /mL	D10 (nm)	D50 (nm)	D90 (nm)	Span
CLN _{CTL}	$157,4 \pm 3,0$	$4,58 \pm 0,3$	$121,7 \pm 3,0$	$147,2 \pm 3,0$	$208,1 \pm 8,7$	0,586
CLN _{DOX}	$166,1 \pm 4,3$	$3,89 \pm 0,2$	$127,2 \pm 2,0$	$157,1 \pm 7,0$	$220,9 \pm 7,4$	0,596
CLN _{FtCIAI}	$151,4 \pm 4,4$	$4,94 \pm 0,2$	$114,6 \pm 2,1$	$136,0 \pm 3,1$	$204,5 \pm 7,7$	0,661
CLN _{DOX/FtCIAI}	$154,5 \pm 3,8$	$5,68 \pm 0,4$	$119,3 \pm 2,1$	$144,6 \pm 3,1$	$199,5 \pm 2,8$	0,554

A variação do número de partículas em suspensão, medido por NTA, ao longo do estudo de estabilidade é mostrada nas Figura 19 A e B. Após 12 meses o número médio de partículas/mL nas formulações armazenadas a 25°C foi de $4,87 \pm 0,10 \times 10^{13}$ (CLN_{CTL}), $2,85 \pm 0,20 \times 10^{13}$ (CLN_{DOX}), $3,39 \pm 0,24 \times 10^{13}$ (CLN_{FtCIAI}) e $3,92 \pm 0,15 \times 10^{13}$ partículas/mL (CLN_{DOX/FtCIAI}) e naquelas armazenadas a 2-8 °C foi de $3,50 \pm 0,24 \times 10^{13}$ (CLN_{CTL}), $2,89 \pm 0,90 \times 10^{13}$ (CLN_{DOX}), $2,81 \pm 0,21 \times 10^{13}$ (CLN_{FtCIAI}) e $3,09 \pm 0,15 \times 10^{13}$ partículas/mL (CLN_{DOX/FtCIAI}). Houve uma ligeira diminuição no número de partículas em função do tempo,

principalmente para CLN_{DOX} e $CLN_{DOX/FICIAI}$, porém o número permaneceu na faixa esperada, de 10^{13} partículas/mL, indicando estabilidade das formulações. As Figura 19 C e D mostram que os tamanhos de partícula, medidos por NTA, não variaram significativamente ao longo de 12 meses. Se houvesse aumento do tamanho concomitante à diminuição no número de partículas, teríamos um indício de instabilidade / formação de agregados (RIBEIRO et al., 2018), o que não foi observado.

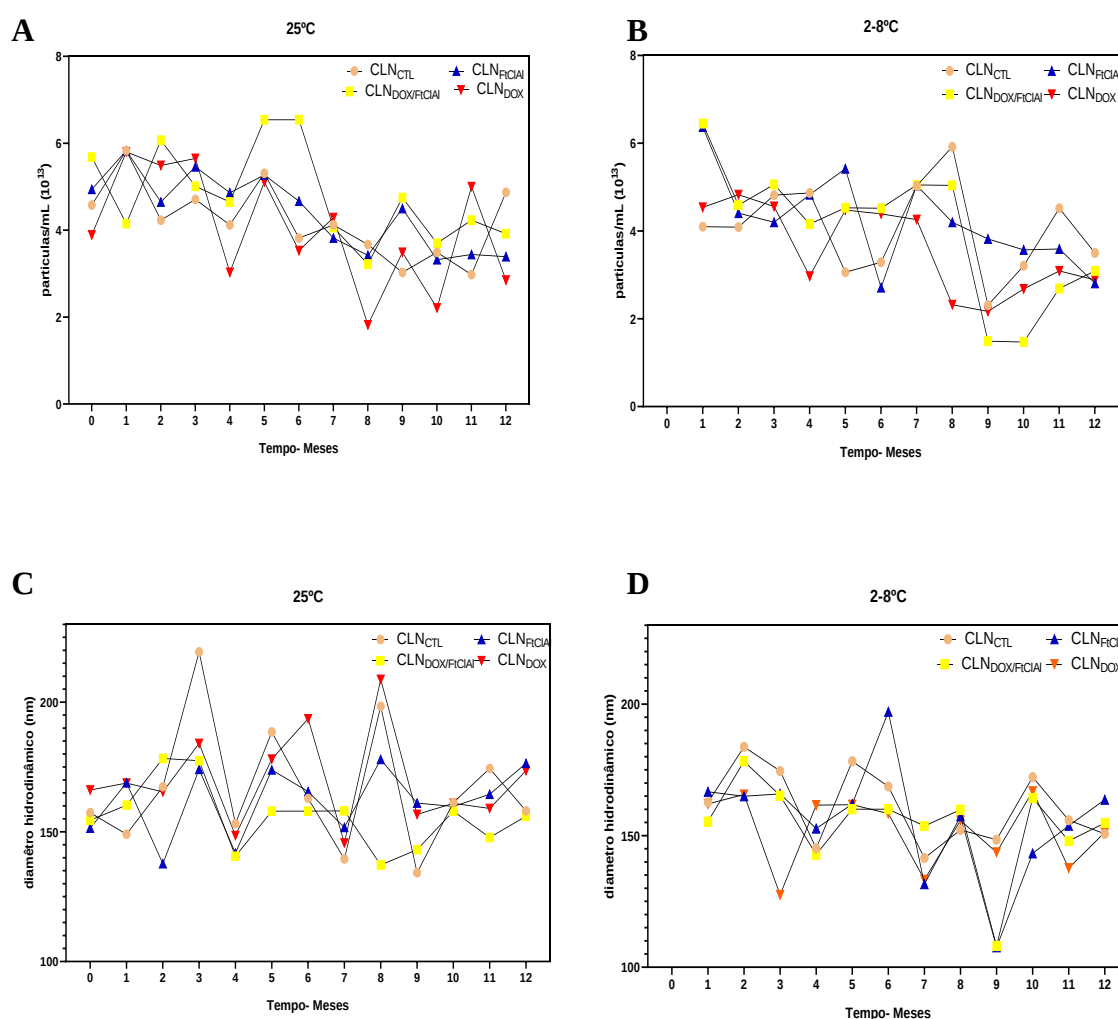


Figura 19 - Concentração de partículas/mL (A e B) e variação de tamanho (C e D), medidas por NTA nas formulações CLN_{CTL} , CLN_{DOX} , CLN_{FICIAI} e $CLN_{DOX/FICIAI}$, durante 12 meses de armazenamento a 25 °C (A e C) ou 2-8°C (B e D).

A partir da concentração de partículas e considerando-se a concentração molar de cada excipiente, foi possível estimar a quantidade de moléculas que compõem cada partícula individual de CLN_{CTL} e $CLN_{DOX/FICIAI}$ (RIBEIRO et al., 2016). Para o cálculo da quantidade de cada excipiente/partícula foi considerada sua concentração molar na formulação, sua massa

molar (MM), a constante de Avogadro ($6,022 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$), o número médio de partículas medido por NTA (Tabela 6), o volume total de amostra (V).

Tabela 7 - Estimativa do número de moléculas de excipientes por CLN, calculadas a partir de sua concentração molar na formulação e do número de partículas/mL, medido pela técnica de NTA.

COMPOSTOS (EXCIPIENTES E FÁRMACOS)					
	LS (Mir. miristila)	LL (Miglyol)	Surfactante (P188)	Fármaco (DOX)	FS (FtClAl)
MM (g/mol)	424,7	498,0	8400,0	543,5	575,0
[mM]	171,9	200,8	8,9	0,091	0,096
COMPOSIÇÃO (moléculas/CLN)					
CLN _{CTL}	225×10^4	263×10^4	12×10^4	-	-
CLN _{DOX/FtClAl}	181×10^4	212×10^4	9×10^4	$9,7 \times 10^2$	$10,0 \times 10^2$
Razão molar (%)	45	53	2	0,024	0,024

Os dados da Tabela 7 mostram que os lipídios líquido e sólido são os excipientes majoritários da partícula (53 e 45%, respectivamente, em razão molar), seguidos pelo surfactante P188 (2 mol %). Os fármacos encapsulados encontram-se em concentração molar duas ordens de grandeza menor (0,02 mol %), bem abaixo da capacidade de carregamento (*upload capacity*) dos CLN. Com base nos cálculos de proporções apresentadas na Tabela 7, criamos uma ilustração para mostrar como poderiam estar dispersos os excipientes e fármacos, na formulação otimizada desenvolvida (CLN_{DOX/FtClAl}), conforme a Figura 20.

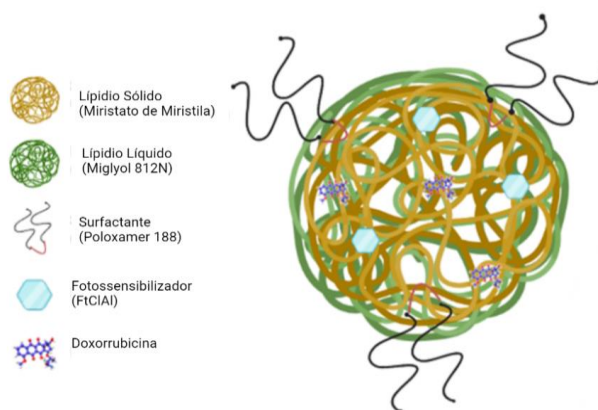


Figura 20 - Imagem ilustrativa do carreador lipídico nanoestruturado CLN_{DOX/FtClAl} com os fármacos (DOX e FtClAl).

A Figura 20 não guarda as proporções de tamanhos ou razão molar dos excipientes, mas serve para representar a possível topografia das CLN, com os lipídios (sólido e líquido) – distribuídos principalmente na cavidade central, o surfactante – em menor quantidade - na superfície e os ativos encapsulados (DOX e FtClAl) particionados no interior lipídico.

4.5. Microscopia Eletrônica de Transmissão das Nanopartículas

As medidas de TEM tiveram como objetivo analisar a morfologia dos CLN preparados. As micrografias (Figura 21) revelaram nanopartículas de morfologia esférica e com superfícies suaves, características de carreadores lipídicos nanoestruturados desenvolvidos pela técnica de homogeneização-ultrassonicação (MULLER; RADTKE; WISSING, 2002). Não houve alterações morfológicas entre as partículas controle, na ausência dos fármacos (Figura 21 A e B) ou presença dos fármacos (Figura 21 C, D, E, F, G e H). Tais resultados indicam que a encapsulação de ambos compostos não perturbou a integridade dos CLN produzidos, o que era esperado, dada a baixa razão molar dos mesmos na composição dos carreadores (Tabela 7). As medidas de TEM também corroboram os resultados de DLS e NTA, evidenciando partículas com tamanho entre 100-200 nm.

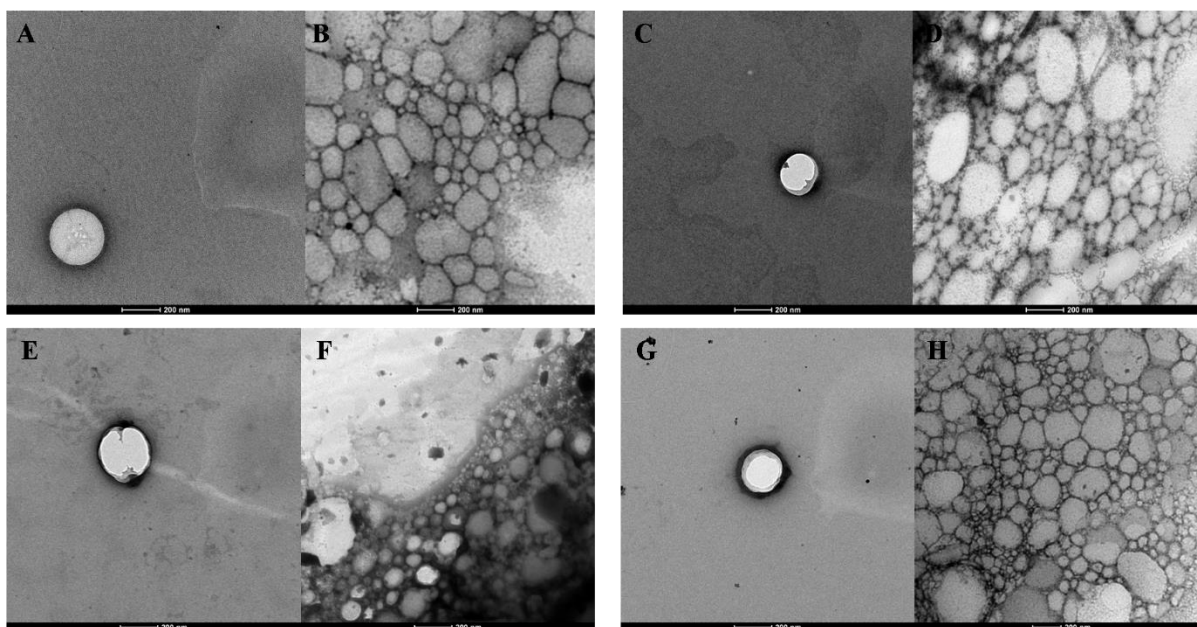


Figura 21 - Fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de transmissão (TEM), mostrando a morfologia das nanopartículas. (A e B) CLN_{CTL}, (C e D) CLN_{FtCIAI}, (E e F) CLN_{DOX} e (G e H) CLN_{DOX/FtCIAI}. Magnificação: 30.000 × (A, C, E e G) e 48.000 × (B, D, F e H).

Utilizando o software de análise de imagem ImageJ[®], foi possível obter dados de distribuição de tamanhos dos nanocarreadores a partir das micrografias eletrônicas. Para isso foram utilizadas microscopia eletrônica de transmissão e Cryo-TEM, possibilitando a corroboração entre os dados. As análises de distribuição de frequência das nanopartículas presentes nas micrografias mostraram que os tamanhos médios das amostras para os CLN_{CTL} foi de $157,40 \pm 6,96$, CLN_{DOX} de $97,14 \pm 4,27$, CLN_{FtCIAI} de $138,71 \pm 5,89$, e CLN_{DOX/FtCIAI} de $157,33 \pm 5,43$ nm (Figura 22).

Cabe ressaltar, que o método de preparo das amostras para TEM é invasivo, pois requer evaporação do solvente, o que pode causar encolhimento das partículas, e, conseqüentemente,

menores tamanhos médios, em comparação com os determinados por outras técnicas (DRAGOVIC et al., 2011). Portanto, considerando a metodologia utilizada para a técnica de microscopia eletrônica e a análise complementar da distribuição de frequência, as faixas de variação de tamanhos de tais análises encontram-se dentro da faixa.

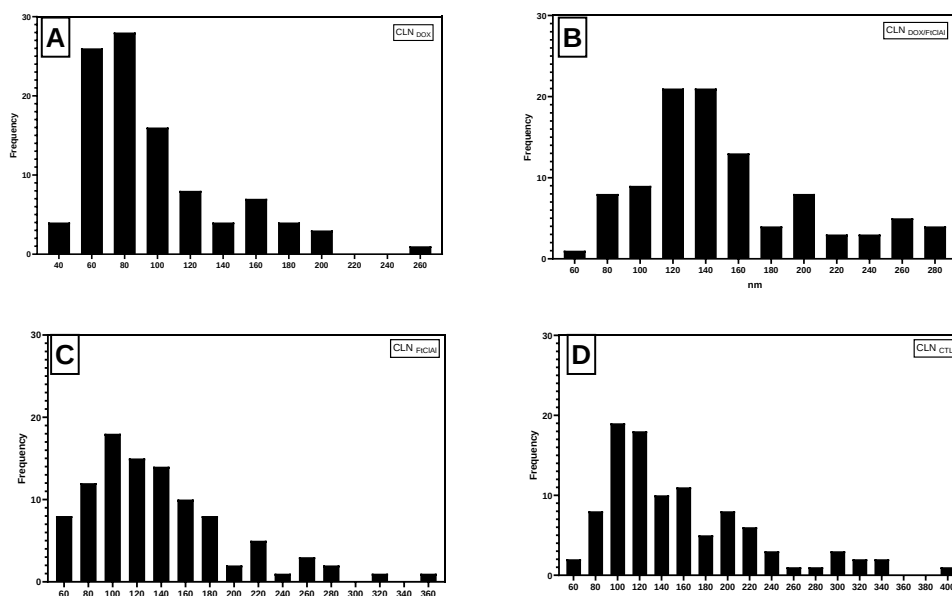


Figura 22 - Histogramas das frequências de distribuição de tamanhos das nanopartículas: CLN_{DOX} (A), CLN_{DOX/FtClAl} (B), CLN_{FtClAl} (C) e CLN_{CTL} (D), pelas análises de MET (Fig. 21). Software GraphPadPrisma 10.2.3. Dados de média e erro-padrão (+/-).

4.6. Análise morfológica por criomicroscopia eletrônica de transmissão

As análises de Cryo-TEM objetivaram complementar as informações sobre o formato e o tamanho dos carreadores lipídicos nanoestruturados. Na Figura 23, o resultado corrobora os resultados obtidos por TEM visto que foram encontradas partículas predominantemente esféricas e com superfícies suaves e de tamanho compatível com os medidos anteriormente. Não houve mudança morfológica após adição de DOX e/ou FtClAl (Figuras 23 B e C).

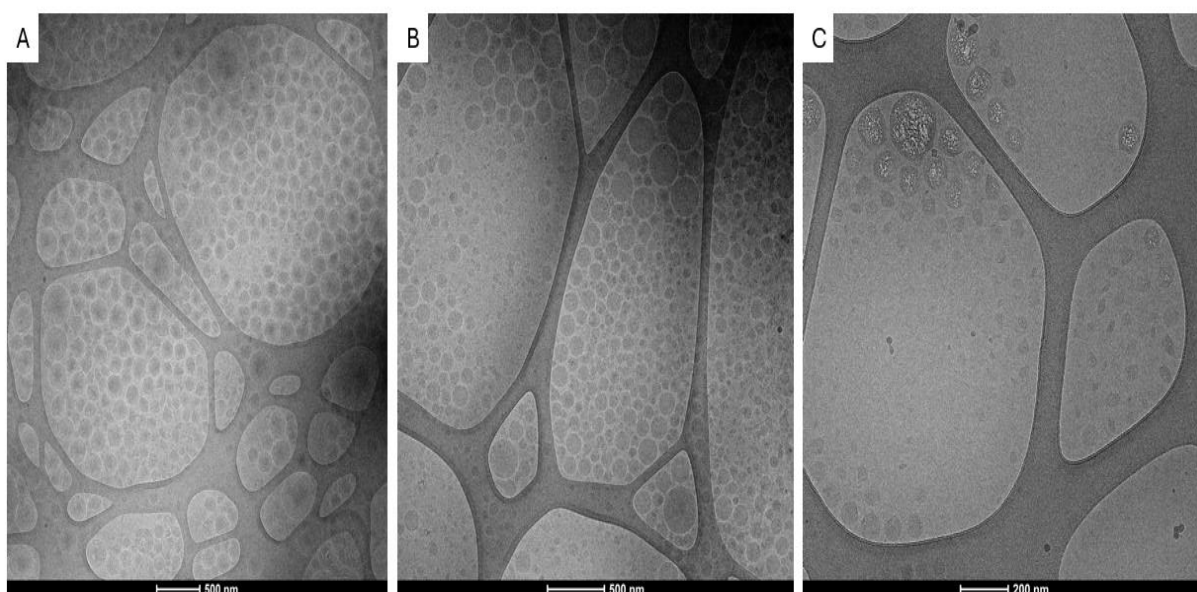


Figura 23 - Criomicroscopia eletrônica de transmissão dos carreadores lipídicos nanoestruturados compostos por lipídios sintéticos, CLN_{CTL} (A), CLN_{FtCIAI} (B) e CLN_{DOX/FtCIAI} (C). Magnificação 100.000x (A-C).

Nota-se que os valores da distribuição de frequência dos tamanhos por criomicroscopia, observou-se que não houve alteração significativa dos mensurados por DLS, NTA e TEM, confirmando que a técnica é capaz de fornecer informações mais robustas e confiáveis relacionadas aos tamanhos das partículas. As análises de distribuição de frequência (Figura 24) das nanopartículas nas criomicrografias mostraram que o tamanho médio das CLN foi de: CLN_{CTL} = $168,15 \pm 5,51$, CLN_{FtCIAI} = $174,09 \pm 6,11$, e CLN_{DOX/FtCIAI} = $186,12 \pm 4,50$ nm. A técnica por Cryo-TEM permitiu que os CLN fossem preservados, em estado solvatado / quase nativo, diferentemente das medidas de TEM (Figura 21). Portanto, as técnicas para morfologia das nanopartículas (TEM e Cryo-TEM) forneceram resultados concordantes entre si e auxiliaram a determinar a morfologia e o tamanho das partículas presentes nas formulações.

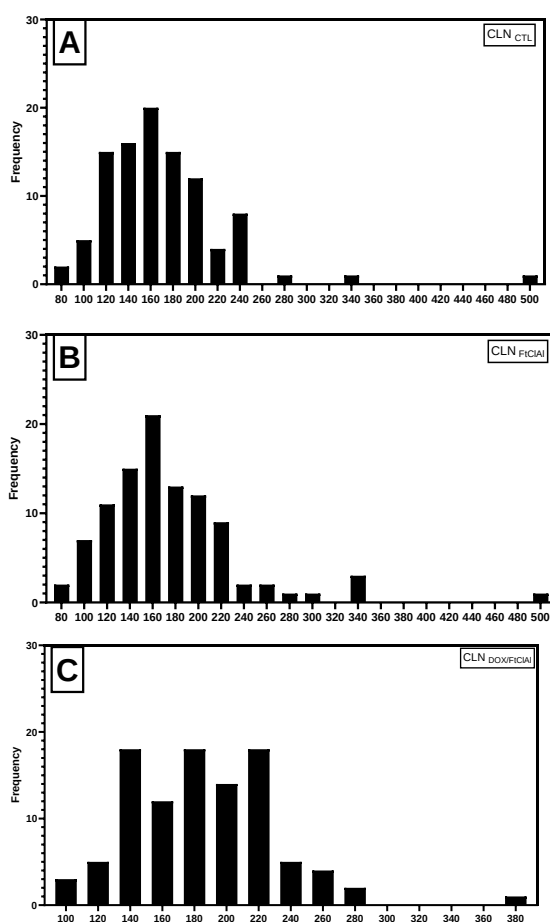


Figura 24 - Frequência de distribuição em função dos tamanhos das nanopartículas: CLN_{CTL} (A), CLN_{FtClAl} (B) e CLN_{DOX/FtClAl} (C), das micrografias obtidas por Cryo-TEM (Fig. 23).

4.7. Análise termogravimétrica acoplada à espectroscopia na região do infravermelho

Nessa análise acoplada (TGA-FTIR), as medidas de termogravimetria (TGA) indicam quanto da massa da amostra é perdida e/ou decomposta em função da temperatura enquanto os gases que são liberados passam pelo detector FTIR, permitindo identificar o que está sendo decomposto. A Figura 25 mostra as curvas de TGA dos excipientes (MM, P188), dos ativos (DOX, FtClAl), de suas misturas físicas e dos CLN contendo DOX e FtClAl. Nota-se que o P188 não apresenta decomposição térmica na faixa de temperatura estudada. A ftalocianina se decompõe (cerca de 6%) entre 60 e 150°C, ficando estável logo em seguida. A doxorubicina (DOX) começa se decompor em 185°C e o MM em torno de 140°C. Nas amostras controle (CLN_{CTL} e mistura física_{CTL}) a decomposição dos excipientes começa na mesma temperatura (120°C), sendo mais acentuada nos CLN que na mistura física (decomposição em torno de 137°C). Nas amostras de CLN_{DOX/FtClAl} alterações podem ser divididas em duas etapas: uma que começa em 40°C chegando até 95°C e outra começando em 148°C; a primeira

decomposição se refere provavelmente à perda do solvente (água), indicando que, mesmo após liofilização, ainda havia cerca de 4% de água nos CLN.

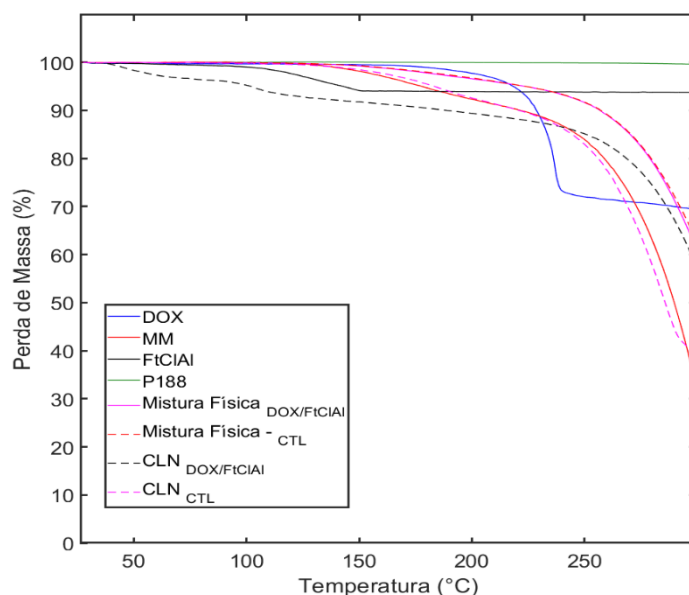


Figura 25 - Curvas de TGA das amostras DOX (azul); MM (vermelho); FtClAl (preto); P188 (verde); mistura física-DOX/FtClAl (rosa); mistura física-CTL (traçado vermelho); CLN_{DOX/FtClAl} (traçado preto); CLN_{CTL} (traçado rosa).

A confirmação da identidade química dessas amostras foi verificada por FTIR. Na Figura 26, é visível a decomposição de MM, na temperatura de 237-239°C, sendo que a FtClAl tem sinal negativo de água. Esse sinal está relacionado à H₂O presente na atmosfera e na amostra. Quanto ao P188, não era esperado haver detecção no IR, uma vez que não houve perda de massas detectada pelo TGA; no entanto, ele apresentou sinal negativo de MM, advindo da contaminação do detector FTIR. DOX teve picos bem característicos de HCl, em torno de 3000 cm⁻¹.

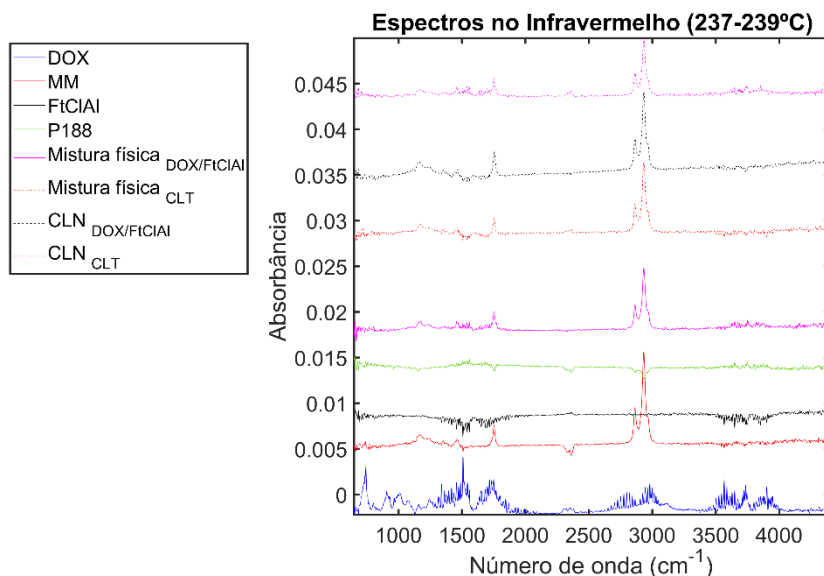


Figura 26 - Medidas de FTIR acopladas à TGA, entre 237-239 °C, das amostras DOX (azul); MM (vermelho); FtClAl (preto); surfactante P188 (verde); mistura física-DOX/FtClAl (rosa); mistura física-CTL (traçado vermelho); CLN_{DOX/FtClAl} (traçado preto); CLN_{CTL} (traçado rosa).

4.8. Medidas de espectroscopia Raman

A técnica de espectroscopia Raman tem grande potencial para avaliar a miscibilidade de excipientes, nas nanopartículas (MITSUTAKE; POPPI; BREITKREITZ, 2019). Esta técnica fornece informações espectrais e espaciais dos excipientes que compõem os CLN, possibilitando a análises do grau de homogeneidade dos mesmos na nanopartícula, sem necessidade de prévio preparo com solventes ou destruição da amostra (MITSUTAKE; POPPI; BREITKREITZ, 2019; RODRIGUES DA SILVA et al., 2017). Os espectros Raman obtidos com a mistura física controle, CLN_{CTL} e excipientes (P188, miristato de miristila, Miglyol 812) encontram-se na Figura 27. Após o tratamento quimiométrico dos espectros, como descrito em métodos, uma imagem 3D é gerada, mostrando a distribuição dos excipientes, tanto na mistura física quanto nos CLN. As imagens foram obtidas apenas de amostras sem fármacos (DOX, FtClAl), uma vez que a ftalocianina apresenta sinais intensos de fluorescência, que encobrem todo o sinal Raman.

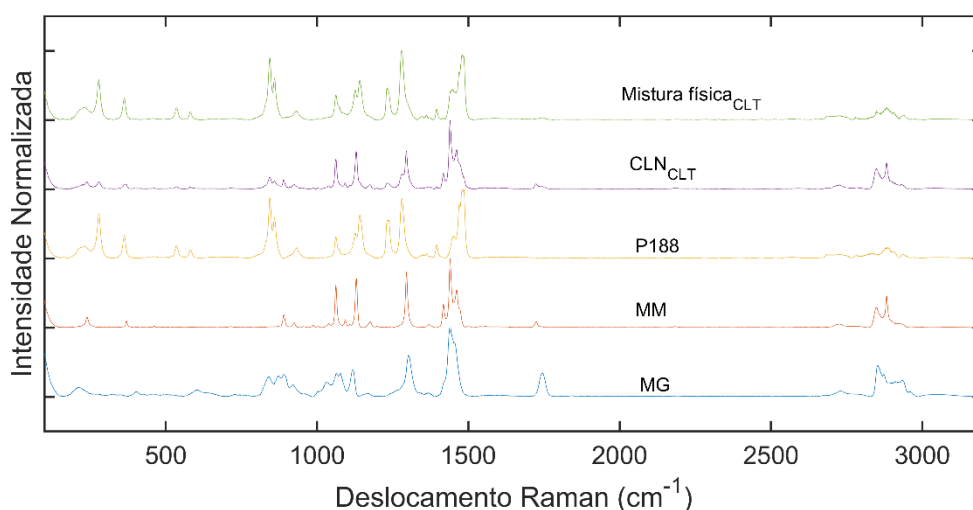
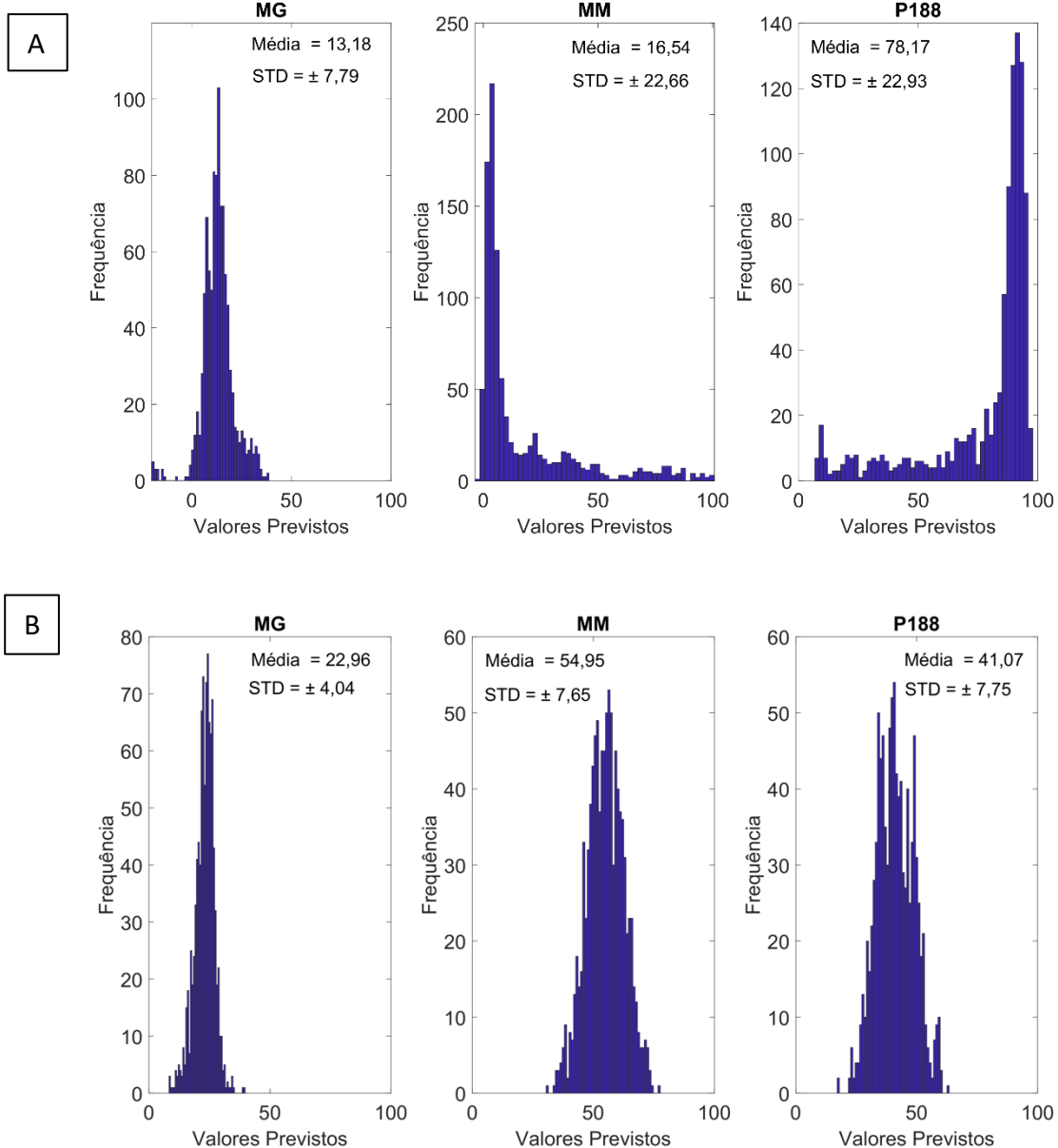


Figura 27 - Espectros Raman obtidos com a mistura física controle (linha verde), CLN_{CTL} (linha roxa), surfactante P188 (linha laranja), miristato de miristila (linha marrom) e Miglyol 812 (linha azul).

O processo de homogeneização em Ultra-turrax auxiliou na análise das amostras por imagem Raman, como fica evidenciado na Figura 28 A-B. O histograma da mistura física, para os excipientes P188 e MM, apresenta uma longa cauda, mostrando que existe uma heterogeneidade na amostra em relação a esses excipientes (Figura 28 A). No entanto, esse problema não acontece nos CLN (Figura 28 B). Essa diferença é melhor visualizada nos mapas químicos 3D (Fig. 28 C e D).

Após tratamento dos dados foram construídas imagens 3D para cada composto. O sistema de cor descrito indica: quanto mais próximo do vermelho, mais concentrado e quanto mais próximo do azul, menos concentrado. Nesse sentido, na mistura física (Figura 28 C), existe um aglomerado de MM no lado direito da imagem. Isso é verificado no histograma de frequência, pela longa cauda de valores maiores. Nessa região também há uma menor concentração de P188, como mostrado no mapa desse composto, na região em azul escuro intenso. O Miglyol parece se concentrar nas mesmas regiões onde há maior concentração de MM, uma vez que no mapa de Miglyol, as cores mais quentes estão nas mesmas regiões do MM. Assim, esses dois excipientes parecem se misturar bem nos CLN. Não parece haver problemas de separação de fases nessa amostra, pois as camadas externas e internas apresentam a mesma distribuição/perfil.

Por outro lado, os histogramas dos CLN não apresentam a cauda longa (Figura 28 D), indicando ausência de aglomerados. Semelhantemente à mistura física, não existe uma diferença significativa entre as camadas indicando, portanto, não haver problemas de separação de fases. A CLN_{CTL} apresentou comportamento homogêneo (Figura 28 D), principalmente se comparado à mistura física.



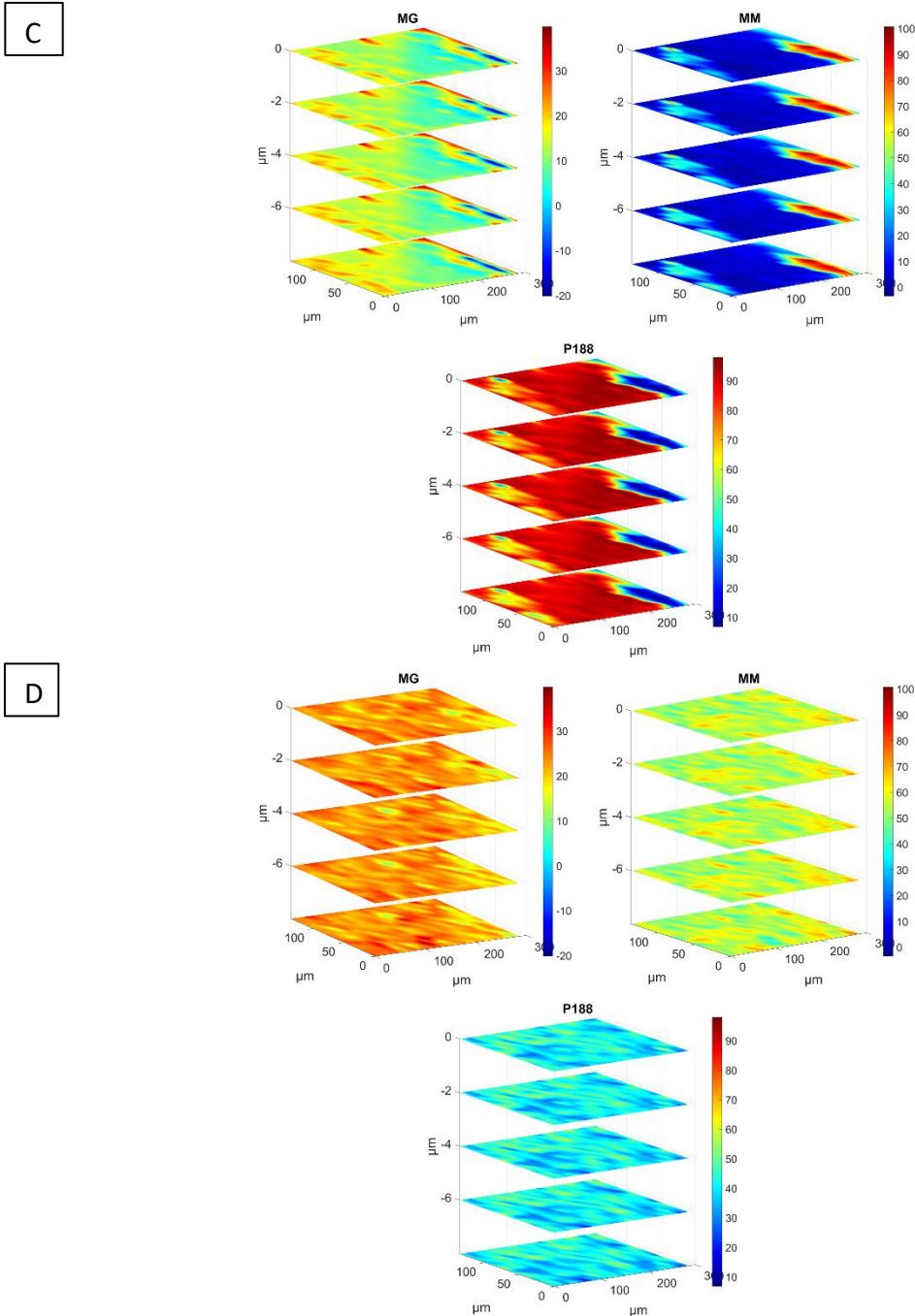


Figura 28 - Histogramas obtidos por espectroscopia Raman de imagens - da mistura física controle (A) e CLN_{CTL} (B) – e mapas volumétricos da mistura física controle (C) e CLN_{CTL} (D). Análises dos componentes: lipídios líquidos (Miglyol 812-MG), sólido (miristato de miristila -MM) e surfactante (P188).

4.9. Análise da produção de Espécies Reativas de Oxigênio

A produção de oxigênio *singlete* é uma etapa crítica para a terapia fotodinâmica e, por isso, foi monitorada indiretamente com uso da sonda 1,3-difenilisobenzofurano (DPBF), como descrito em métodos. Pode-se constatar que durante a irradiação a 18 J/cm^2 (com LED de 660 nm por 6 min) *in vitro*, houve produção significativa ($p < 0,0001$) de ROS a partir dos controles FtClAl e DOX/FtClAl (não encapsulados) e da formulação CLN_{FtClAl} , que atingiram 100% de produção em aproximadamente 1,5 min após início da irradiação (Figura 29). A mesma

tendência foi observada para a formulação otimizada CLN_{DOX/FtClAl}, cuja máxima produção de ROS foi alcançada após 3 min. Em contrapartida, e como esperado, as formulações sem o fotossensibilizador - DOX livre, CLN sem fármacos (CLN_{CTL}) e CLN_{DOX} - mostraram baixa produção de ROS (< 20%) nos tempos analisados. Esses resultados confirmam a produção eficaz de ROS pelo fotossensibilizador FtClAl, mesmo quando encapsulado nos CLN ou associado ao quimioterápico DOX. Essa alta prevalência / produção de ROS demonstra que as nanoformulações desenvolvidas são adequadas para uso em TFD.

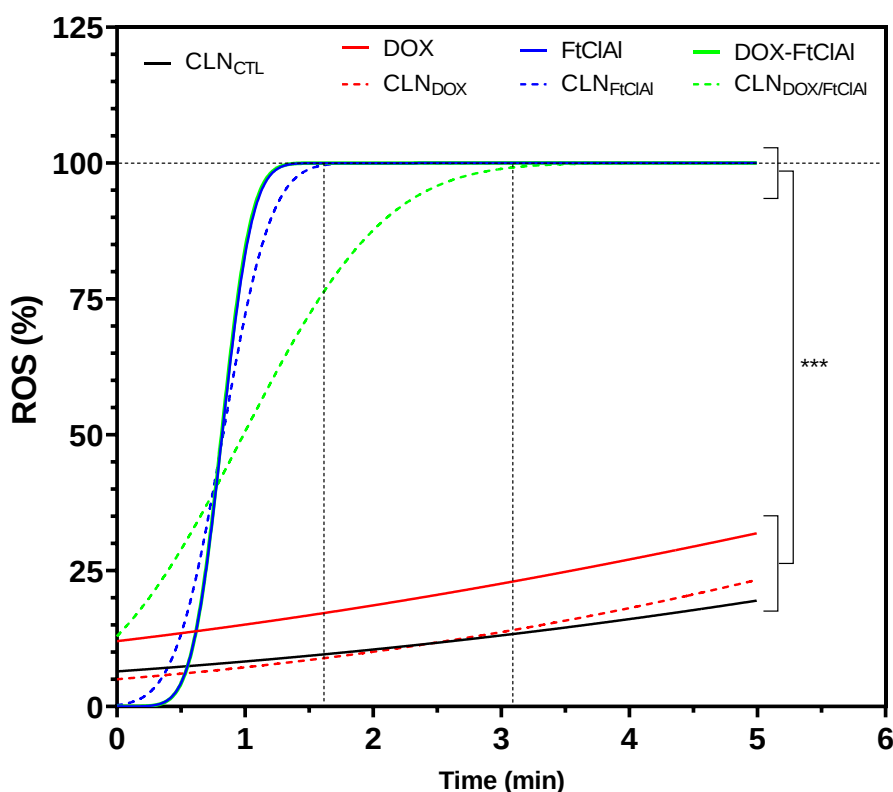


Figura 29 - Produção de oxigênio singlete, medida pelo teste de DPBF nas formulações CLN_{CTL}, CLN_{DOX}, CLN_{FtClAl}, CLN_{DOX/FtClAl}, DOX, FtClAl e DOX/FtClAl após irradiação. Os dados foram ajustados por modelo estatístico de regressão não linear, com variação significativa ($p < 0,0001$) em relação a amostras sem FtClAl.

4.10. Testes de peroxidação lipídica

A estabilidade química dos componentes lipídicos dos CLN foi avaliada pela detecção de endoperóxidos produzidos pela reação do malondialdeído (MDA) com o ácido tiobarbitúrico (TBA), como descrito em métodos. Essa reação gera um cromóforo vermelho com absorvância em 532 nm (OHKAWA; OHISHI; YAGI, 1979; GROTTTO et al.2008), como mostra a Figura 30 C, para a formulação de CLN otimizada e seus controles.

Os resultados obtidos para as amostras, irradiadas ou não (a 18 J/cm^2 com LED de 660 nm, por 6 min), ao longo do tempo de armazenamento das formulações, encontram-se na Figura 30 A e B. Como esperado, os níveis de MDA foram ligeiramente menores nas amostras não

irradiadas, principalmente nas formulações CLN_{CTL} e CLN_{DOX/FtCIAI}. Estes resultados poderiam indicar desestabilização química das formulações em função das reações de oxidação-redução produzidas pela irradiação, que produzem ROS (Figura 29).

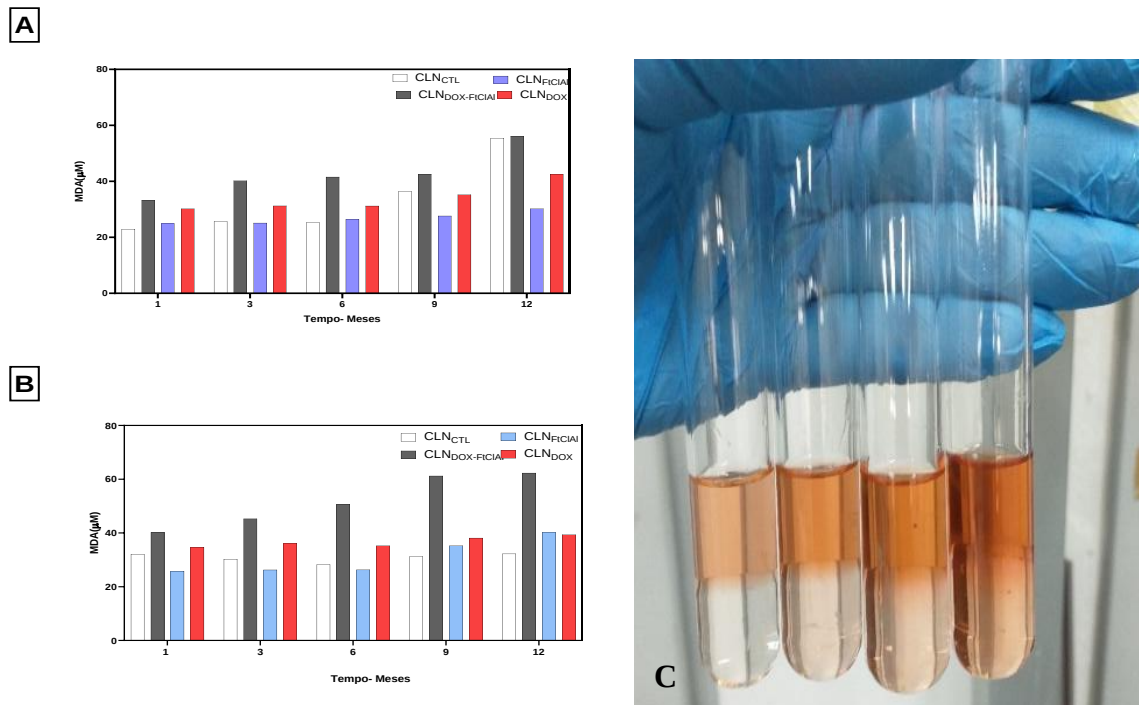


Figura 30 - Variação na concentração de MDA entre as formulações de CLN: sem irradiação (A) e com irradiação de 18J/cm² (B). Formação de cromóforo avermelhado, pela reação dos endoperóxidos com TBA (C).

Após irradiação o aumento nos níveis de endoperóxido foi de cerca de 14% na amostra CLN_{FtCIAI} (Figura 30B). No entanto, se considerarmos a concentração total de lipídios na formulação (ca. 400 mM, somando-se LS e LL – ver Tabela 7), os níveis de MDA formados (40 µM) representam 0,01 mol % dos lipídios totais das CLN, sendo, portanto, desprezíveis e indicando que a formação de endoperóxidos não deve afetar a estabilidade ou o efeito terapêutico dos CLN desenvolvidos.

4.11. Ensaio de Citotoxicidade

O estudo da toxicidade celular foi avaliado com base no ensaio de MTT, descrito no item 3.2.13.1, em células adenocarcinoma mamário murino (4T1-luc), adenocarcinoma mamário humano (MCF-7) e em fibroblastos murinos normais (NIH-3T3).

4.11.1. Citotoxicidade em culturas de fibroblastos murinos (NIH-3T3)

Os resultados na linhagem de fibroblastos murinos (NIH-3T3) revelaram que a viabilidade celular diminuiu para 57,0% com 50 µM da formulação CLN_{DOX} (Figura 31 A) e para DOX livre decaiu a 48% já com 3,12 µM do antineoplásico (Figura 31 B), indicando

redução da citotoxicidade nos fibroblastos tratadas com DOX encapsulado. Além disso, houve redução na viabilidade celular após irradiação, especialmente na dose 18 J/cm^2 , das células tratadas DOX livre (Fig. 31 B), mas não nas tratadas com CLN_{DOX} (Fig. 31A).

Para células tratadas com $\text{CLN}_{\text{FtClAl}}$ (Fig. 31 C) e não irradiadas, os resultados revelaram que na maior concentração testada ($50 \text{ } \mu\text{M}$ FtClAl), houve uma redução para 48% na viabilidade celular de fibroblastos. Contudo, após irradiação na dose de 9 J/cm^2 , a viabilidade celular caiu para 46% já na concentração de $12,5 \text{ } \mu\text{M}$ do FS. Nas amostras expostas ao laser vermelho na dose de 18 J/cm^2 , registrou-se viabilidade de 45%, na concentração de $0,4 \text{ } \mu\text{M}$ FtClAl. A influência direta e dependente da concentração do FS e da potência da irradiação na regulação da toxicidade celular induzida por irradiação também foi observada também com FtClAl não encapsulado (Fig. 31 D), embora sem tanta variação com a potência, como visto para $\text{CLN}_{\text{FtClAl}}$.

Os resultados obtidos com $\text{CLN}_{\text{DOX/FtClAl}}$ (Fig. 31 E) mostraram na maior concentração de fármacos ($50 \text{ } \mu\text{M}$ de cada) uma redução da viabilidade celular para 49%, sem irradiação. Quando as células foram irradiadas a 9 J/cm^2 , a viabilidade celular caiu para 53%, já na concentração de $1,6 \text{ } \mu\text{M}$ dos ativos. Já nas amostras irradiadas a 18 J/cm^2 , a viabilidade foi reduzida a 48% na concentração de $0,2 \text{ } \mu\text{M}$. A queda na viabilidade dos fibroblastos tratados com os ativos livres (Fig. 31 F) foi maior que a observada com $\text{CLN}_{\text{DOX/FtClAl}}$, mostrando que a encapsulação reduz a toxicidade para essas células. Novamente (Fig. 31 E e F), os parâmetros da TFD afetaram significativamente a toxicidade aos fibroblastos NIH 3T3.

A Fig. 31 G mostra que o tratamento dos fibroblastos com CLN_{CTL} não afetou significativamente a viabilidade, nas condições testadas. Já a Fig. 31 H mostra o efeito do etanol, usado como solvente para solubilizar DOX e FtClAl (Fig. 31 D, F) e que apresentou toxicidade significativa quando usado em volumes equivalentes aos das concentrações de $3,12$ (sem irradiação) ou $6,25 \text{ } \mu\text{M}$ (com irradiação) dos ativos.

IC_{50} , a concentração de um fármaco ou inibidor capaz de inibir a viabilidade celular em 50%, é um parâmetro comumente usado como medida da potência do fármaco em ensaios de cultivo celular e em triagens de descoberta de novos medicamentos. A Tabela 8 mostra valores de IC_{50} determinados para a linhagem de NIH-3T3 após tratamento com as formulações – CLN_{DOX} , $\text{CLN}_{\text{FtClAl}}$, $\text{CLN}_{\text{DOX/FtClAl}}$, CLN_{CTL} - e seus controles (DOX, FtClAl, DOX/FtClAl) nas condições sem irradiação e com irradiação (a 9 e 18 J/cm^2).

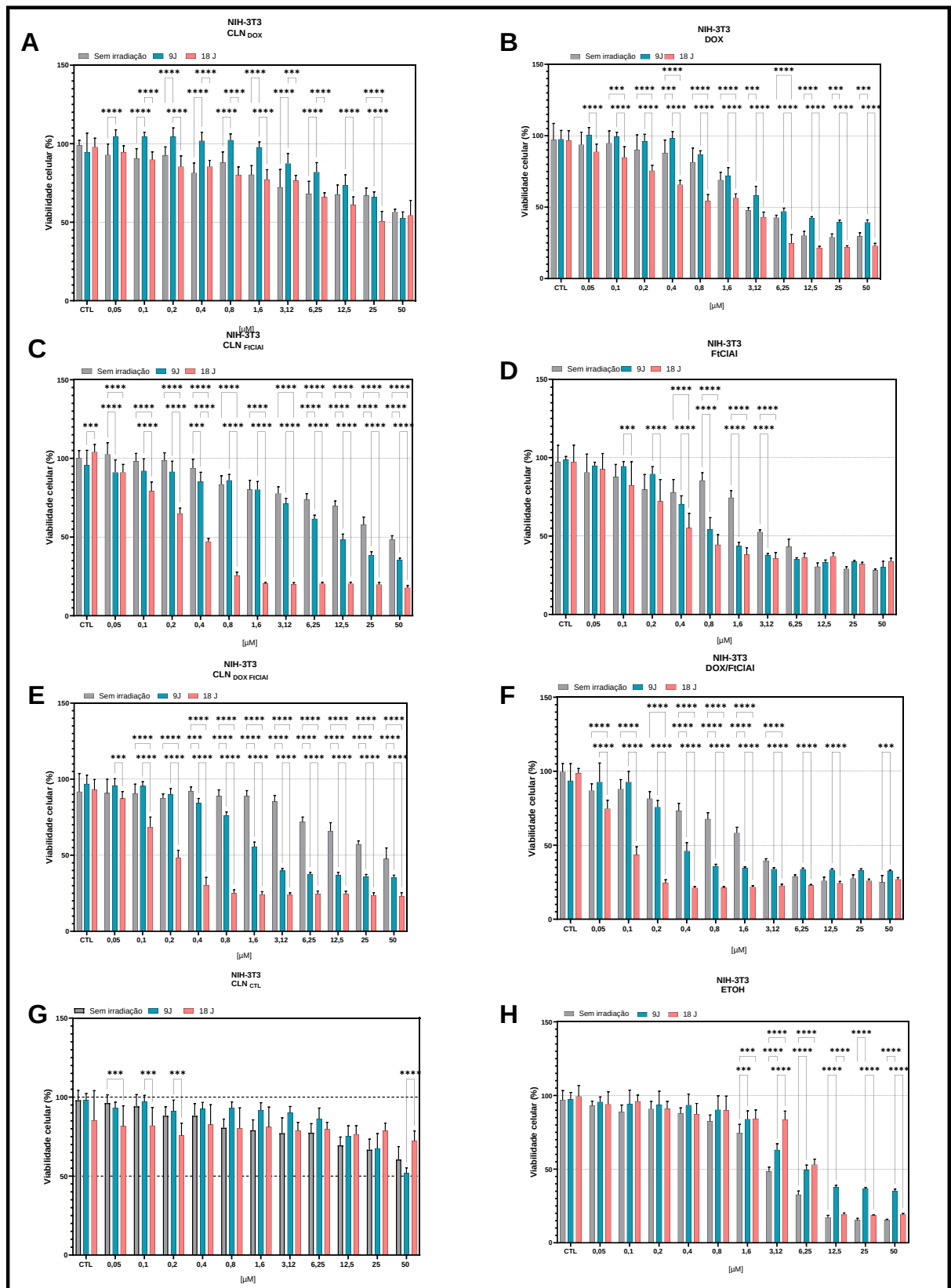


Figura 31 - Viabilidade celular após exposição das células de **fibroblastos murinos (NIH/3T3)** por 30 min. às formulações (CLN_{DOX}, CLN_{FIClA}, CLN_{DOX/FIClA}, CLN_{CTL}) e seus respectivos controles (ativos livres e etanol), em concentrações seriadas (0,05-50 μM de DOX e/ou FtClA), sem ou com irradiação (com LED de 660nm, por 6 min a 9 ou 18 J/cm²). Análise estatística por Two-way ANOVA mais post hoc de Tukey-Kramer. *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

Tabela 8 - Valores de IC_{50} determinados em fibroblastos **NIH-3T3** após tratamento com as nanoformulações, DOX e FtClAl livres e com etanol, sem e com irradiação (9 ou 18 J/cm²) para TFD. Análise feita com o software GraphPad Prisma 10.2.3.

	Sem irradiação (μM)	9 J/cm ² (μM)	18 J/cm ² (μM)
CLN_{DOX}	123,1 ± 3,0	53,4 ± 2,8	22,4 ± 3,1
CLN_{FtClAl}	49,6 ± 10,6	14,2 ± 1,1	0,3 ± 0,0
CLN_{DOX/FtClAl}	56,3 ± 7,4	4,7 ± 0,1	0,4 ± 0,0
DOX	5,7 ± 0,3	10,6 ± 1,1	1,9 ± 0,3
FtClAl	5,2 ± 0,3	2,6 ± 0,5	2,2 ± 0,2
DOX+FtClAl	2,4 ± 0,1	1,2 ± 0,1	0,0 ± 0,0
ETOH	3,6 ± 0,1	10,5 ± 1,0	7,2 ± 0,3

Os dados da Tabela 8 deixam claro o efeito citotóxico nas células de fibroblastos, dependente dos parâmetros da TFD. Uma observação interessante refere-se aos controles (DOX e FtClAl) não encapsulados, que apresentaram maior toxicidade do que nas respectivas formulações, em todas as condições testadas. Essa toxicidade pode estar relacionada ao solvente (etanol) utilizado para solubilizar esses ativos, que têm baixa solubilidade aquosa. Tal hipótese, foi confirmada pelo teste realizado nas mesmas condições de tratamento, somente com etanol (ETOH). Além disso, efeito semelhante foi observado em tratamentos subsequentes, feitos com as células cancerígenas das linhagens 4T1-luc (Tabela 9) e MCF-7 (Tabela 10). Estes resultados reforçam a importância do uso de nanocarreadores para o transporte eficiente destes fármacos, diminuindo sua toxicidade, em relação as apresentações comerciais disponíveis no mercado.

4.11.2. Citotoxicidade em culturas de adenocarcinoma mamário murino

Para a linhagem 4T1-luc, o tratamento com CLN_{DOX} (Fig. 32 A) reduziu a viabilidade celular de 51% a 12,5 μM; após irradiação a 18 J/cm² a viabilidade foi de 48% em 6,25 μM de CLN_{DOX}. Como observado com fibroblastos NIH-3T3 o tratamento com DOX livre (Fig. 32 B) foi mais tóxico, com ou sem irradiação, que aquele com o fármaco encapsulado.

As células 4T1-luc tratadas com CLN_{FtClAl} (Figura 32 C) apresentaram 49% de viabilidade celular na concentração de 3,12 μM; resultado semelhante (50% na concentração de 3,12 μM) foi observado após irradiação a 9 J/cm² e após irradiação a 18 J/cm² uma viabilidade de 46% foi medida na concentração de 0,4 μM de CLN_{FtClAl}, confirmando a citotoxicidade dependente da potência da irradiação. O mesmo efeito de fotocitotoxicidade, diretamente proporcional à fluência, foi também observado por Rodrigues e col. em células 4T1

tratadas com FtClAl encapsuladas em nanoemulsões; nesse trabalho os autores constataram que as células tumorais tratadas com maior fluência de PDT sofreram estresse oxidativo mediado pelas ROS fotogeradas, promovendo fragmentação do núcleo e morte celular (RODRIGUES et al, 2020).

Como observado anteriormente, o efeito citotóxico de FtClAl não encapsulado (Fig. 32 D) foi maior que o da formulação CLN_{FtClAl} . $CLN_{DOX/FtClAl}$ reduziu a viabilidade das células de carcinoma murino até 38%, na maior concentração testada (50 μM), até 51% com 0,8 μM após irradiação a 9 J/cm² e até 42% na concentração de 0,8 μM , quando irradiada a 18 J/cm² (Fig. 32 E). Em relação aos ativos livres DOX+FtClAl (Fig. 32 F) eles levaram à viabilidade de ca. 50% com 3,2 μM (amostra não irradiada) e com 0,1 μM após irradiação com 18 J/cm². Candido e col. avaliaram o efeito de FtClAl combinada a doxorrubicina (de 0,5 μM a 2 μM) em nanoemulsões frente a linhagem 4T1, e igualmente constataram a significativa redução da viabilidade celular (aproximadamente a 10%). Os autores confirmaram a eficiência da terapia demonstrando aumento na taxa de apoptose e na parada do ciclo celular em G2 nas células de adenocarcinoma mamário (CANDIDO et al., 2018).

A toxicidade da formulação CLN_{CTL} e do solvente etanol sobre as células 4T1-luc é mostrada nas Fig. 32 G e H, respectivamente. CLN_{CTL} reduziu a viabilidade em 50% em concentrações acima de 25 μM , independentemente da irradiação. Já com etanol a viabilidade caiu abruptamente quando usado em volumes equivalentes aos presentes nas formulações com mais de 6,25 μM de ativo.

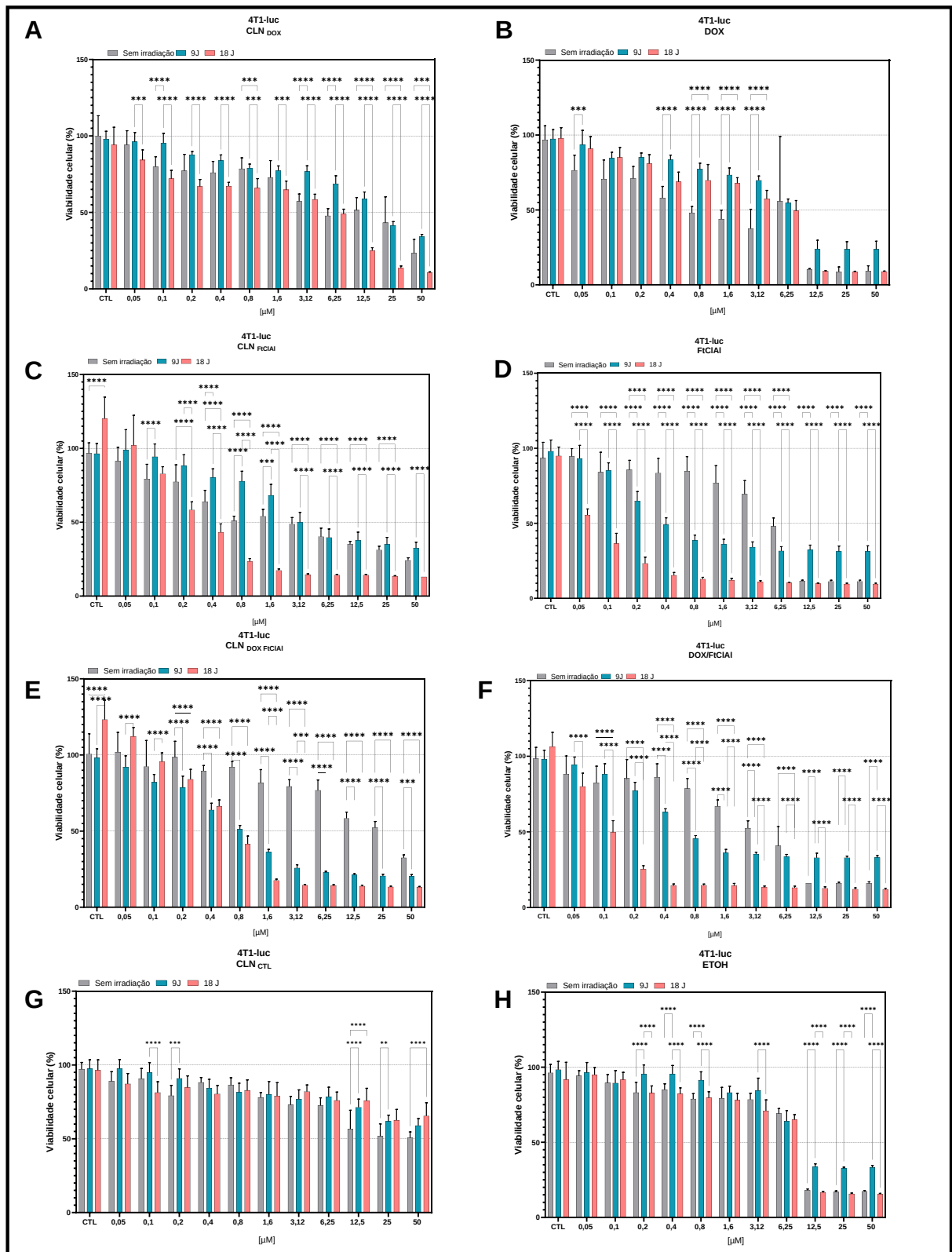


Figura 32 - Viabilidade celular após exposição das células de **adenocarcinoma mamário murino (4T1-luc)** por 30 min. às formulações (CLN_{DOX}, CLN_{FICIAI}, CLN_{DOX/FICIAI}, CLN_{CTL}) e seus respectivos controles (ativos livres e etanol), em concentrações seriadas (0,05-50 μ M de DOX e/ou FtCIAI), sem ou com irradiação (com LED de 660nm, por. 6 min a 9 ou 18 J/cm²). Análise estatística por Two-way ANOVA mais post hoc de Tukey-Kramer. ** p < 0,01; *** p < 0,001, **** p < 0,0001.

A Tabela 9 mostra os valores de IC_{50} determinados para a linhagem de 4T1-luc, após tratamento com CLN_{DOX} , CLN_{FtClAl} , $CLN_{DOX/FtClAl}$, CLN_{CTL} , DOX, FtClAl e etanol, irradiadas a 9 ou 18 J/cm² e não irradiadas. Mais uma vez, o efeito do etanol foi testado porque este solvente foi usado na solubilização dos princípios ativos livres (DOX e FtClAl).

Tabela 9 - Valores de IC_{50} em μM determinados contra células 4T1-luc nas condições de – sem TFD, com TFD a 9 J/cm² e 18 J/cm². Análise feita com o software GraphPad Prisma 10.2.3.

	Sem irradiação (μM)	9 J/cm ² (μM)	18 J/cm ² (μM)
CLN_{DOX}	10,5 $\pm$ 2,9	19,1 $\pm$ 3,0	3,1 $\pm$ 0,3
CLN_{FtClAl}	3,0 $\pm$ 1,0	5,8 $\pm$ 0,7	0,1 $\pm$ 0,0
$CLN_{DOX/FtClAl}$	25,3 $\pm$ 2,4	1,0 $\pm$ 0,0	0,3 $\pm$ 0,0
DOX	1,2 $\pm$ 0,6	7,0 $\pm$ 0,9	2,9 $\pm$ 0,4
FtClAl	4,8 $\pm$ 1,5	1,1 $\pm$ 0,1	0,0 $\pm$ 0,0
DOX+FtClAl	3,7 $\pm$ 0,4	1,7 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0
ETOH	7,4 $\pm$ 0,2	11,7 $\pm$ 0,5	6,8 $\pm$ 0,5

Os dados da Tabela 9 mostram que a encapsulação nos CLN reduziu a toxicidade dos ativos DOX e FtClAl, como observado também para as células não cancerígenas (Tab. 8). Por outro lado, o tratamento com a formulação otimizada ($CLN_{DOX-FtClAl}$) irradiada foi mais efetivo em reduzir a viabilidade celular das células de câncer de mama, que o tratamento com cada ativo, encapsulado (CLN_{DOX} , CLN_{FtClAl}) ou não, em separado (DOX, FtClAl) ou combinado (DOX+FtClAl), mostrando o efeito sinérgico do ativo doxorrubicina e da TFD.

4.11.3. Citotoxicidade em culturas de adenocarcinoma mamário humano

Os resultados com as células MCF-7 tratadas com CLN_{DOX} não irradiado revelaram decaimento da viabilidade celular para 51% a 25 μM (Fig. 33 A). Após irradiação a mesma viabilidade foi observada com 25 μM (9 J/cm²) e 12,5 μM (18 J/cm²) de CLN_{DOX} . O tratamento com DOX livre (Fig. 33 B) foi mais citotóxico que aquele da DOX encapsulada.

Como observado nas linhagens celulares anteriores, o tratamento com CLN_{FtClAl} (Fig. 33C) foi menos citotóxico que aquele com FtClAl livre (Fig. 33 D) e a irradiação exacerbou a diminuição da viabilidade celular (18 J/cm² > 9 J/cm²).

O tratamento com $CLN_{DOX/FtClAl}$ (Fig. 33 E) reduziu a viabilidade para cerca de 50% na concentração de 25 μM , 6,25 μM após irradiação a 9 J/cm² e 0,4 μM após irradiação a 18 J/cm². Em comparação aos ativos livres (solubilizados em etanol), a viabilidade celular foi sempre

maior com CLN_{DOX/FtCIAI} devido também à citotoxicidade do etanol, já discutida. A Tabela 10 apresenta os valores de IC₅₀ determinados na linhagem de MCF-7 após tratamento com CLN_{DOX}, CLN_{FtCIAI}, CLN_{DOX/FtCIAI}, CLN_{CTL} e ativos livres, sem e com irradiação de 9 J/cm² e 18 J/cm².

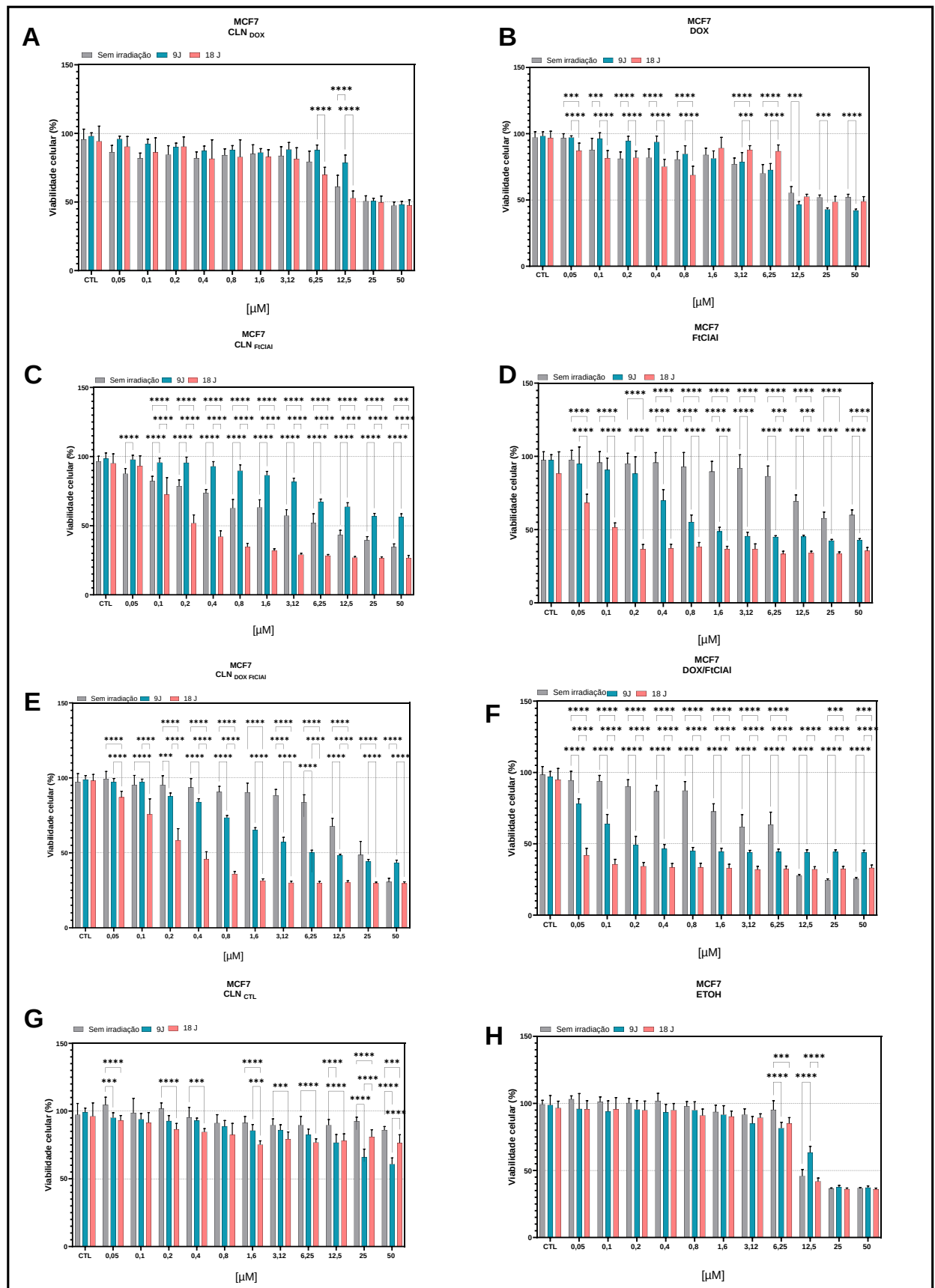


Figura 33 - Viabilidade celular após exposição das células de **adenocarcinoma mamário humano (MCF-7)** por 30 min. às formulações (CLN_{DOX}, CLN_{FtCIAI}, CLN_{DOX/FtCIAI}, CLN_{CTL}) e seus respectivos controles (ativos livres e etanol), em concentrações seriadas (0,05-50 μM de DOX e/ou FtCIAI), sem ou com irradiação (com LED de

660nm, por. 6 min a 9 ou 18 J/cm²). Análise estatística por Two-way ANOVA mais post hoc de Tukey-Kramer. *** p < 0,001, **** p < 0,0001.

Tabela 10 - Valores de IC₅₀ determinados para contra células MCF-7 nas condições: sem TFD, com TFD a 9 J/cm² e 18 J/cm². Análise feita com o software GraphPad Prisma 10.2.3.

	Sem irradiação (µM)	9 J/cm ² (µM)	18 J/cm ² (µM)
CLN_{DOX}	55,0 ± 17,2	51,2 ± 13,3	35,6 ± 5,9
CLN_{FtCIAI}	55,5 ± 8,4	9,5 ± 1,8	0,7 ± 0,1
CLN_{DOX/FtCIAI}	25,9 ± 2,8	11,4 ± 0,3	0,7 ± 0,2
DOX	47,4 ± 5,2	76,0 ± 28,6	20,8 ± 2,1
FtCIAI	70,6 ± 9,1	6,2 ± 1,3	0,1 ± 0,0
DOX+FtCIAI	7,5 ± 1,4	2,5 ± 0,7	1,2 ± 0,0
ETOH	19,8 ± 0,5	20,8 ± 0,4	17,8 ± 0,2

Os dados da Tabela 10 mostram que a encapsulação nos CLN reduziu a toxicidade de FtCIAI e DOX sobre a linhagem de adenocarcinoma humano. O tratamento com a formulação otimizada (CLN_{DOX/FtCIAI}), que combina os dois ativos, foi bastante efetivo, demonstrando o efeito sinérgico do quimioterápico e do FS. CLN_{DOX/FtCIAI} foi mais citotóxica que DOX livre, e teve efeito equivalente ao de CLN_{FtCIAI}.

A comparação dos dados de IC₅₀ das Tabelas 8 a 10 evidencia que os 3 tipos celulares têm susceptibilidade diferente aos tratamentos. Por exemplo, as células de fibroblastos murinos NIH-3T3 são menos sensíveis aos efeitos citotóxicos de DOX e FtCIAI livre que as células 4T1-luc de adenocarcinoma murino, porém mais sensíveis que as células MCF-7, de adenocarcinoma humano. Apesar das características das diferentes linhagens, de maneira geral o tratamento com a formulação otimizada e irradiada foi eficaz em reduzir a viabilidade celular, em todas as linhagens.

4.11.4. Análise comparativa dos valores de IC₅₀ determinados nas linhagens tumorais

Uma análise comparativa entre as nanoformulações, considerando o IC₅₀ determinado nas linhagens tumorais (Tabelas 9 e 10), irradiadas a 9 J/cm² e 18 J/cm² é apresentada a seguir.

Considerando os dados das Tabelas 9 e 10 para os valores de IC₅₀, na irradiação de 9 J/cm², foi analisada qual nanoformulação foi mais eficaz, isto é, requereu menor concentração para reduzir a viabilidade celular das linhagens celulares 4T1 e MCF-7. Aqui, não foram

considerados para comparação os valores de IC_{50} dos ativos livres (DOX e FtClAl), já que toxicidade do solvente etanol (usado para solubilizá-los) poderia afetar a análise do efeito isolado dos fármacos, indicando uma toxicidade falsamente positiva daqueles tratamentos. Além disso, o objetivo foi observar qual formulação poderia apresentar características mais promissoras para o tratamento do câncer de mama.

Para a linhagem 4T1 na fluência 9 J/cm², foram observados os seguintes valores de IC_{50} :

CLN_{DOX}: $19,1 \pm 3,0 \mu M$ **CLN_{FtClAl}**: $5,8 \pm 0,7 \mu M$ **CLN_{DOX/FtClAl}**: $1,0 \pm 0,0 \mu M$

indicando que a formulação combinada (CLN_{DOX/FtClAl}) foi a mais eficaz.

Na linhagem MCF-7 na fluência 9 J/cm² foram observados os seguintes valores de IC_{50} :

CLN_{DOX}: $51,2 \pm 13,3 \mu M$ **CLN_{FtClAl}**: $9,5 \pm 1,8 \mu M$ **CLN_{DOX/FtClAl}**: $11,4 \pm 0,3 \mu M$

indicando que, para a linhagem de adenocarcinoma humano, a formulação CLN_{FtClAl} foi tão eficaz quanto a CLN_{DOX/FtClAl}, sem diferença significativa entre os valores de IC_{50} .

Considerando a dose de 18 J/cm² para 4T1, foram anotados os IC_{50} :

CLN_{DOX}: $3,1 \pm 0,3 \mu M$ **CLN_{FtClAl}**: $0,1 \pm 0,0 \mu M$ **CLN_{DOX/FtClAl}**: $0,3 \pm 0,0 \mu M$

apontando ótimos resultados para as formulações CLN_{FtClAl} e a CLN_{DOX/FtClAl}, com IC_{50} muito baixos e semelhantes, para as células de adenocarcinoma murino.

Para a linhagem MCF-7, aplicando-se a dose 18 J/cm², os valores de IC_{50} foram:

CLN_{DOX}: $35,6 \pm 5,9 \mu M$ **CLN_{FtClAl}**: $0,7 \pm 0,1 \mu M$ **CLN_{DOX/FtClAl}**: $0,7 \pm 0,2 \mu M$

indicando que, para igual efetividade de CLN_{FtClAl} e CLN_{DOX/FtClAl} contra MCF-7.

Assim, na irradiação de 9 J/cm² a formulação CLN_{DOX/FtClAl} foi a mais eficaz contra a linhagem 4T1. Na mesma condição de irradiação, para a linhagem MCF-7 tanto a formulação CLN_{FtClAl} como a CLN_{DOX/FtClAl} mostraram ser relevantes e eficazes. Na dose de fluência a 18 J/cm² as formulações CLN_{FtClAl} e CLN_{DOX/FtClAl} apresentaram bons resultados frente a ambas as linhagens (4T1 e MCF-7). Portanto, estes dados revelam que tanto a formulação CLN_{FtClAl} como a CLN_{DOX/FtClAl} podem ser promissoras para o tratamento de tais modelos tumorais. No entanto, é necessária uma investigação complementar para avaliar quais vias de morte celular são ativadas, assim como os efeitos de cada tratamento.

4.12.Avaliação da viabilidade reprodutiva (ensaio clonogênico)

A capacidade das células de se proliferar e formar colônias, assim como a capacidade de adesão celular pós-tratamento, foi avaliado pelo ensaio clonogênico, que avalia a viabilidade reprodutiva e disposição das células formarem descendentes, após a exposição a agentes citotóxicos (RAFEHI et al. 2011). Para isso, foram utilizadas as formulações: CLN_{CTL},

CLN_{DOX}, CLN_{FtClAl}, CLN_{DOX/FtClAl}, CTL_{DOX/FtClAl} e os ativos livres (DOX, FtClAl) na concentração de IC₅₀ previamente determinada (Tabelas 9 e 10).

As células de adenocarcinoma mamário: murino (4T1-luc) (Figura 34 A) e humano (MCF-7) (Figura 34 B) foram testadas com o objetivo de avaliar o efeito antiproliferativo pós-tratamento destas linhagens, visto que elas apresentam características de quimiorresistência aos antineoplásicos. Como ilustrado na Figura 34, as células-controle e as tratadas com CLN_{CTL} foram capazes de aderir às placas, proliferar e formar colônias, confirmando a não-toxicidade da formulação “branca”. Já as células tratadas com as formulações contendo ativos apresentaram quantidades inferiores de colônias em relação às células não-tratadas, efeito evidente nas formulações CLN_{DOX}, CLN_{FtClAl} e CLN_{DOX/FtClAl} e seus respectivos controles (ativos livres), nos quais o número de colônias foi drasticamente reduzido e sua capacidade de adesão celular perdida, mais acentuadamente na linhagem MCF-7. Nota-se ainda maior formação de colônias nas placas tratadas com DOX e FtClAl, comparativamente as células tratadas com formulações de DOX+FtClAl, o que pode indicar que as células resistiram mais aos efeitos citotóxicos dos fármacos em separado, do que combinados. Esse comportamento é ainda mais evidente após irradiação a 9 ou 18 J/cm², podendo estar relacionado com a liberação sustentada pelas CLN, pois mesmo as células que resistiram ao tratamento podem ter internalizado as nanopartículas, morrendo após 24 h de tratamento, como observado com outras nanoformulações de antineoplásicos de liberação sustentada (PEIRA et al., 2016). De fato, o mesmo efeito citotóxico foi observado por Franchi e colaboradores (FRANCHI et al., 2018), que utilizaram FtClAl incorporada em uma nanoemulsão para a inativação fotodinâmica de células HeLa e A549. Os autores constataram que a PDT diminuiu a clonogenicidade de HeLa e A549, induzindo apoptose, comprovada por detecção de sub-G1 e anexina.

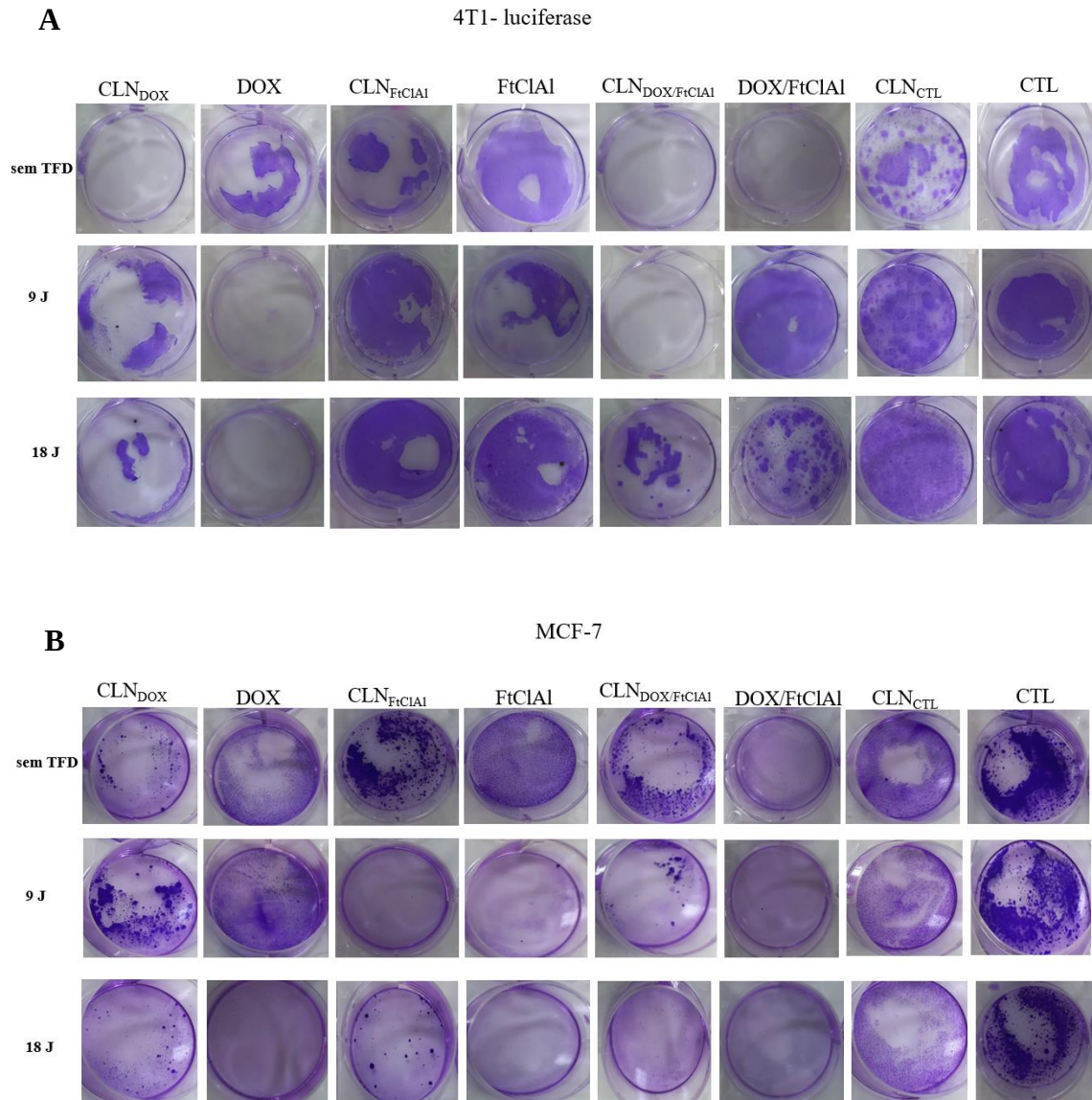


Figura 34 - Efeito do tratamento com as formulações (CLN_{DOX}, CLN_{FtCIAI}, CLN_{DOX/FtCIAI}, CLN_{CTL}) e seus respectivos controles (DOX, FtCIAI, DOX/FtCIAI e CTL) na capacidade das células 4T1-LUC (A) e MCF-7 (B) de formarem colônias. CTL refere-se a células sem tratamento. As células foram tratadas na concentração de IC₅₀ por 24 h; a aderência foi verificada após 14 dias, nas células que sobreviveram aos tratamentos.

4.13. Internalização das formulações, medida por microscopia confocal, nas células da linhagem 4T1-luc

A TFD depende da acumulação eficiente do fotossensibilizador dentro das células alvo, antes da ativação pela luz. Assim, determinar a internalização das nanopartículas, por microscopia confocal, é etapa crucial para otimizar a eficácia terapêutica. A microscopia confocal permite determinar a localização subcelular das nanopartículas, o que é essencial para garantir que o fotossensibilizador se acumule em organelas específicas, como mitocôndrias ou lisossomos, influenciando diretamente a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e determinado a morte celular. Conhecer o tempo de internalização ajuda a sincronizar a

irradiação com a máxima acumulação do fotossensibilizador, otimizando a produção de ROS (RODRIGUES et al., 2020). Além disso, essa medida demonstra que o fotossensibilizador é capaz de se penetrar especificamente as células alvo, minimizando os danos às células saudáveis. A taxa de internalização das nanopartículas influencia a liberação do fotossensibilizador e a microscopia confocal pode correlacionar o tempo de internalização com a cinética de liberação, assegurando que ele esteja na forma ativa, no momento da irradiação (RODRIGUES et al., 2020; 2022). Portanto, entender o tempo de internalização também ajuda a planejar o regime de tratamento, incluindo a dosagem das nanopartículas e o *timing* da irradiação, para maximizar a eficácia terapêutica e minimizar os danos adversos.

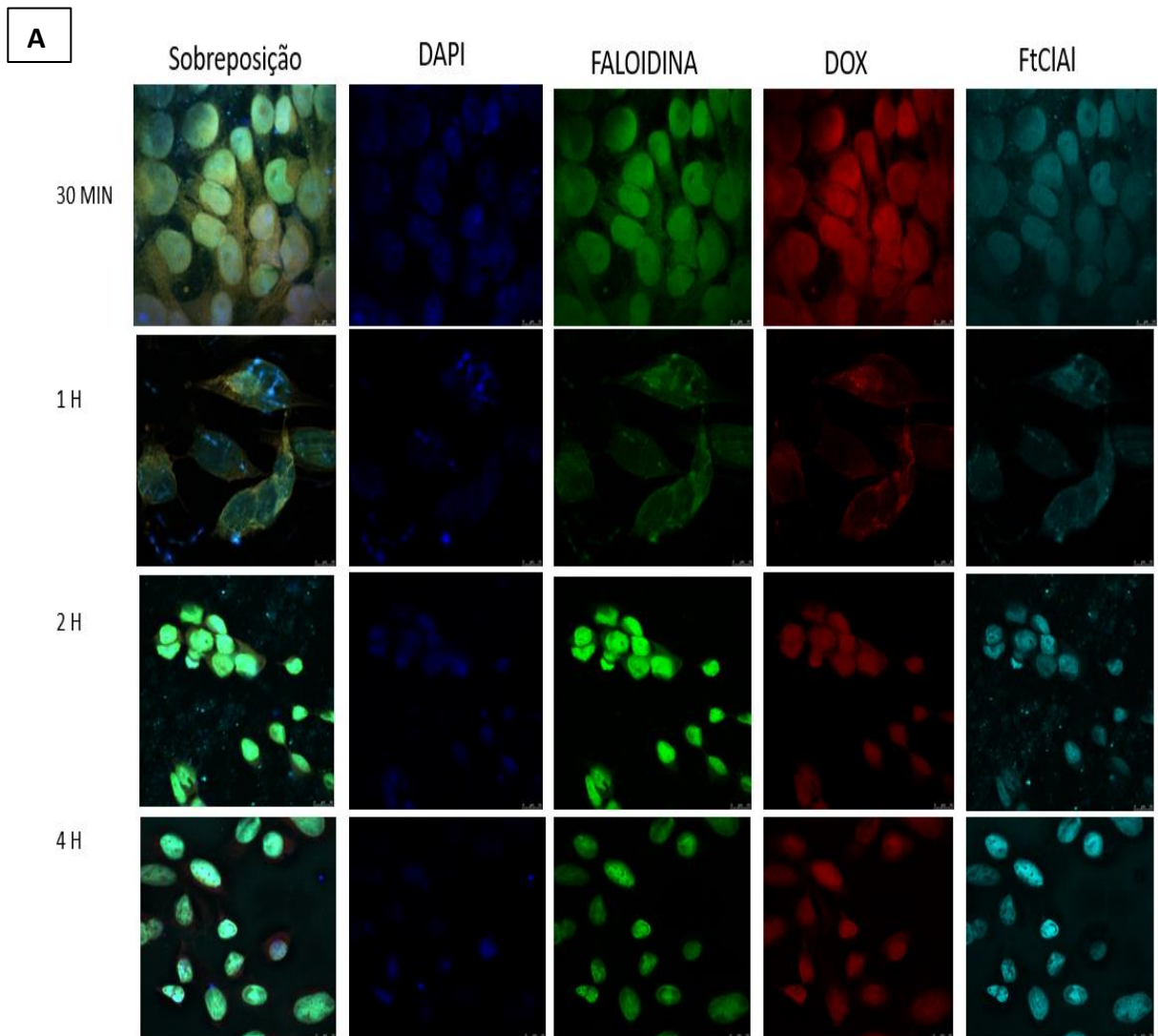
A entrega direcionada dos ativos para as células mamárias neoplásicas foi analisada por microscopia confocal. A Figura 35 mostra a imunofluorescência das células 4T1-luc marcadas com os fluoróforos DAPI (marcação do núcleo celular, em azul) e faloidina (marcação do citoesqueleto, em verde), da DOX e do FtClAl. Como descrito em métodos, a DAPI e faloidina podem revelar alterações como fragmentação nuclear (indicada por DAPI) ou desorganização dos filamentos de actina (faloidina). As células tratadas com CLN_{DOX/FtClAl}, CLN_{FtClAl}, e CLN_{DOX} foram visualizadas nos tempos de 30 minutos, 1, 2 ou 4 horas de tratamento.

Nas células tratadas com CLN_{DOX/FtClAl} (Figura 35 A), A partir de 2 horas houve um maior percentual de células que internalizaram as partículas, evidenciado pela fluorescência de FtClAl. Porém, após 4 h, observou-se a mesma quantidade de internalização, indicando que as células podem ter parado de internalizá-las, ou passaram a jogar para fora as nanopartículas. As imagens de microscopia confocal mostraram ainda o perfil de distribuição intracelular das formulações no citoplasma das células 4T1-luc.

Na Figura 35 B, percebe-se com CLN_{FtClAl} o mesmo comportamento de internalização, visto a partir de 1 hora pela fluorescência de FtClAl. Houve aumento evidente na internalização no tempo de 4 horas. FtClAl mostrou localização subcelular específica na região perinuclear (Figura 35 B), proporcionando um melhor sinal de fluorescência e melhor entrega em função do tempo de internalização (Figura 35 A-B). É possível observar que FtClAl (em verde água) encontra-se preferencialmente no citoplasma celular, indicando que se acumula, preferencialmente, em organelas como os lisossomos e mitocôndria. Muehlmann et al. (2015) demonstraram que FtClAl veiculada em nanoemulsões foi encontrada principalmente no citoplasma das células de adenocarcinoma mamário humano (MCF-7), com muito baixa retenção no núcleo. O estudo realizado por Rodrigues e col. (RODRIGUES et al., 2020) mostrou resultado semelhante, ou seja, não foi observado sinal significativo de FtClAl nos núcleos de células da linhagem 4T1. Essa baixa afinidade do fotossensibilizador pelo núcleo é

considerada uma vantagem para a TFD anticâncer (RODRIGUES et al., 2015; MUEHLMANN et al, 2015; LIU et al., 2016), já que o dano oxidativo direto ao DNA poderia causar alterações genéticas que, potencialmente, favorecessem o desenvolvimento de novos clones de células neoplásicas (MACDONALD & DOUGHERTY, 2001). Em suma, esses resultados confirmaram a endocitose das nanopartículas pelas células 4T1, uma etapa importante no mecanismo de ação de um medicamento (YANG, 2018). Vale ainda ressaltar que a não detecção do sinal de FtCIAI após a exposição ao tratamento poderia ser indicativa da degradação dessa molécula, ou mesmo de fenômenos de extinção (*quenching*) de sua fluorescência, o que não foi observado nestes ensaios.

Na Figura 35 C, observa-se o tratamento de CLN_{DOX} que, por problemas na medida, só pode ser analisada nos tempos de 30 minutos e 1 hora. A internalização (em vermelho) está presente já a partir de 30 minutos de tratamento e fica mais evidente no tempo de 1 hora de tratamento.



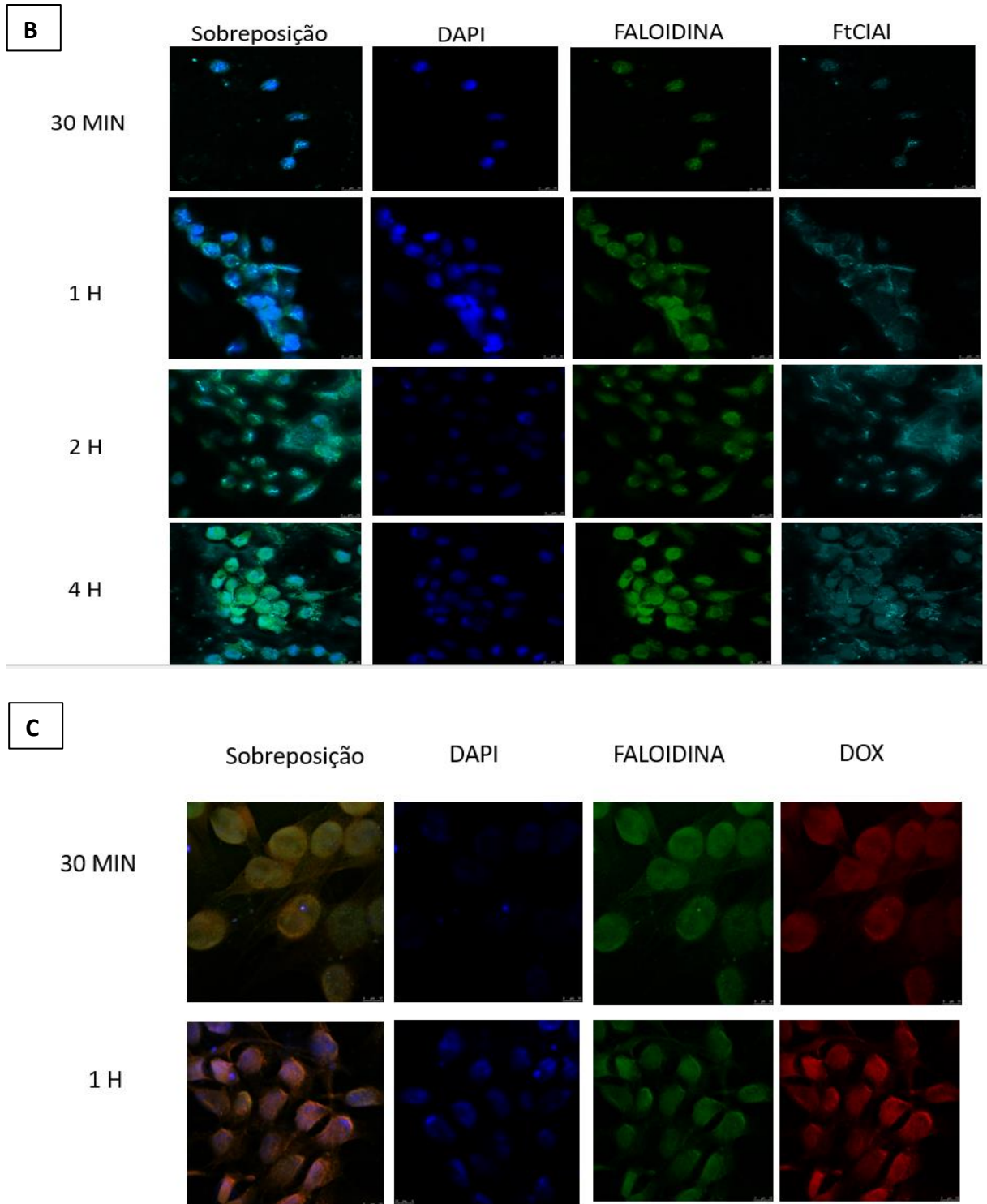


Figura 35 - Imagens de microscopia confocal, mostrando acúmulo e localização subcelular, em células de adenocarcinoma mamário murino (4t1-luciferase) expostas às nanoformulações contendo FtCIAI e/ou DOX. **A)** tratadas com $CLN_{DOX/FtCIAI}$ e coradas com DAPI (núcleos celulares em azul); Faloidina (marcação do citoesqueleto em verde); DOX (em vermelho) e FtCIAI (em azul celeste); com análise de sobreposição (merge), para os tempos de 30 min, 1h, 2h e 4h. **B)** tratadas com CLN_{FtCIAI} e coradas com DAPI faloidina e FtCIAI; com análise de sobreposição para os tempos de 30 min, 1h, 2h e 4h. **C)** tratadas com CLN_{Dox} e coradas com DAPI, faloidina e DOX com análise de sobreposição para os tempos de 30 min e 1h. As imagens foram colhidas levando-se em consideração os comprimentos de onda de excitação e emissão de cada fármaco (DOX - Ex: $\lambda = 480$ nm e Em: $\lambda = 560$ nm; FtCIAI - Em: $\lambda = 610$ nm e Ex: $\lambda = 680$ nm). As imagens foram obtidas em uma magnitude de 40x e tratadas com o software ImageJ® (NIH, Bethesda, EUA).

Abaixo, comparamos parâmetros de internalização celular de CLN_{FtCIAI} e CLN_{DOX/FtCIAI} nas células 4T1-luc:

<i>Formulações</i>	<i>Tempo de Internalização</i>	<i>Distribuição Intracelular</i>
CLN_{FtCIAI}	A internalização foi notável a partir de 1 h, com um aumento contínuo até 4 h. Este comportamento sugere uma possível internalização mais rápida e contínua, em comparação com CLN _{DOX/FtCIAI} .	A fluorescência de FtCIAI nas células tratadas com CLN _{FtCIAI} mostrou localização na região perinuclear, indicando uma entrega eficiente do fotossensibilizador, no citoplasma.
CLN_{DOX/FtCIAI}	Maior percentual de internalização das partículas foi observado a partir de 2 h. No entanto, após 4 h o sinal (internalização) se estabilizou, sugerindo que as células poderiam ter se saturado.	As imagens de microscopia confocal mostraram que, após internalização, as nanopartículas de CLN _{DOX/FtCIAI} distribuíram-se no interior das células.

Comparando as duas formulações, CLN_{FtCIAI} demonstrou internalização ligeiramente mais rápida e contínua em células 4T1-luc que CLN_{DOX/FtCIAI}. Em contraste, a internalização de CLN_{DOX/FtCIAI} parece se estabilizar após 4 horas. Portanto, estes dados indicam que as nanopartículas contendo FtCIAI estão sendo eficientemente internalizadas pelas células-alvo (4T1-luc), acumulando-se em compartimento intracelular estratégico, como o citoplasma. Essa internalização eficiente e a localização subcelular adequada são cruciais para a eficácia da TFD, pois garantem a geração máxima das ROS necessárias para induzir a morte celular. Além disso, a baixa afinidade do fotossensibilizador pelo núcleo minimiza o risco de danos ao DNA, reduzindo a possibilidade de causar mutações que poderiam levar ao desenvolvimento de novos clones de células neoplásicas (RODRIGUES et al., 2020). Esses achados suportam a eficácia do tratamento e sugerem que as nanopartículas formuladas têm um potencial terapêutico significativo na TFD. Estudos aprofundados sobre a localização intracelular e com pré-exposição de inibidores de diferentes vias endocíticas, poderiam complementar a compreensão dos mecanismos envolvidos com o efetivo tratamento por TFD.

4.14. Análises de migração celular

Estes experimentos foram feitos com células de adenocarcinoma 4T1-luc. Áreas de ranhura foram fotografadas antes da adição das amostras (tempo 0) e após 24 horas de tratamento com CLN_{DOX}, CLN_{FtCIAI} e CLN_{DOX/FtCIAI} (Figura 36) utilizando-se magnificação (40x) que permitisse a visualização de ambas as bordas da ranhura. As análises demonstraram que entre 0 - 24h a área da ranhura pós-tratamento manteve-se, com o perfil CLN_{DOX/FtCIAI} > CLN_{DOX} > CLN_{FtCIAI} > CLN_{CTL}, evidenciando o efeito da encapsulação nos CLN e a associação dos ativos DOX/FtCIAI na perda de capacidade de migração celular e cicatrização da ferida, como resultado dos tratamentos.

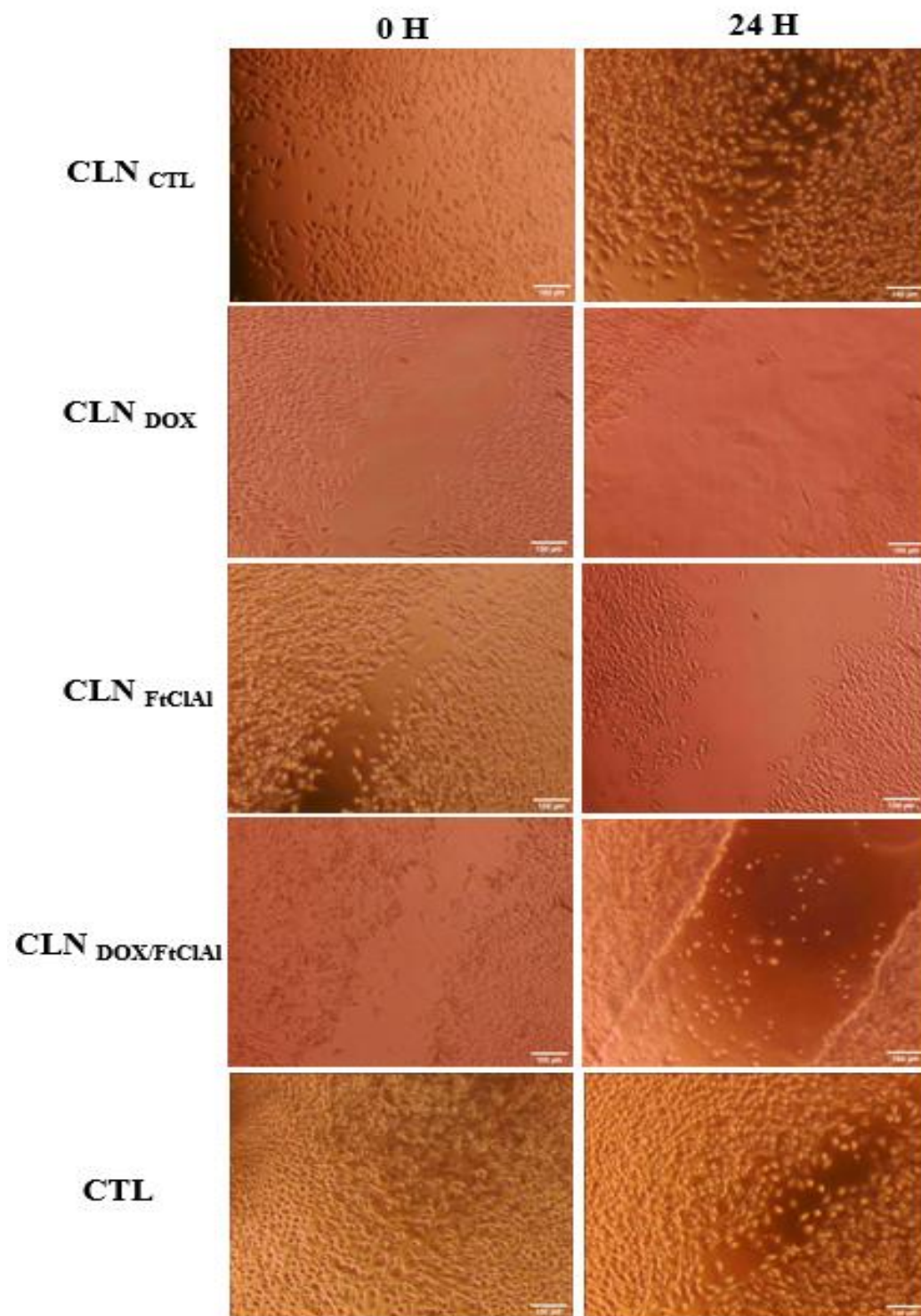


Figura 36 - Fotomicrografias de ensaio de migração celular de células 4T1-luc após 24 horas de tratamento com CLN_{CTL}, CLN_{DOX}, CLN_{FtCIAI} e CLN_{DOX/FtCIAI}, em comparação com CTL (células sem tratamento).

5. CONCLUSÃO

Apesar das limitações impostas pela pandemia da Covid-19, neste projeto de mestrado foi possível desenvolver uma formulação farmacêutica nanoparticulada de carreadores lipídicos nanoestruturados para *codelivery* do antineoplásico doxorrubicina e do fotossensibilizador ftalocianina de cloro alumínio, com o intuito de combinar quimioterapia e fototerapia para o tratamento de câncer de mama. A composição escolhida para o desenvolvimento dos CLN foi de miristato de miristila como lipídio sólido, Miglyol® como lipídio líquido e Poloxamer 188 como surfactante. A partir do planejamento experimental de composto central (29 formulações) foi possível otimizar uma formulação com a quantidade ideal de cada excipiente para: menor tamanho de partículas e PDI e máximo potencial Zeta (em módulo), adequada à administração parenteral. A formulação otimizada (CLN_{DOX/FtClAl}), contendo 10% de lipídios totais (73:27 m:m, de miristil miristato e Mygliol®), 7,5% de P188, 100 µM de DOX e 100 µM de FtClAl, apresentou 4×10^{13} partículas/mL, de diâmetro de 160 nm, baixa polidispersão, potencial zeta negativo e pH ligeiramente ácido. A adição de DOX e FtClAl não alterou o tamanho nem a morfologia nas nanopartículas, que foram estáveis por 12 meses, armazenadas sob refrigeração (2 - 8°C).

A razão molar dos excipientes presentes em cada nanopartícula da formulação de *codelivery* otimizada foi estimada a partir das medidas de NTA (Tabela 7), revelando que os lipídios são seus componentes majoritários (ca. 98%), seguidos pelo surfactante (2%) e pelos fármacos encapsulados (< 1%). Medidas de TGA-FTIR e imagem Raman confirmaram a identidade físico-química dos compostos e a miscibilidade dos excipientes, respectivamente.

A partir das medidas de produção de espécies reativas de oxigênio, foi possível verificar que a encapsulação da FtClAl nas CLN não afetou a produção de ROS induzida por irradiação, indicando que a TFD com esses carreadores pode ser efetiva. Os testes de MDA mostraram que a irradiação empregada para TFD não causa peroxidação significativa (< 0,01 mol % dos lipídios totais dos CLN), não sendo, portanto, capaz de desestabilizar a formulação.

Os ensaios de citotoxicidade comprovaram que associação das estratégias de quimioterapia (DOX) e fototerapia com FtClAl nanoencapsulados em CLN foi efetiva, levando a morte das linhagens tumorais (4T1-luc e MCF-7). Especificamente:

- a encapsulação diminuiu a citotoxicidade do quimioterápico DOX livre contra as 3 linhagens testadas, principalmente a de fibroblastos NIH-3T3, indicando liberação prolongada do antineoplásico. CLN_{DOX} induziu a morte celular das células 4T1-luc > que de fibroblastos NIH-3T3 > células MCF-7.

- o período de incubação de 30 min foi suficiente para aplicação da Terapia Fotodinâmica (TFD) com as nanoformulações produzidas. Como esperado, das potências utilizadas, a de 18 J/cm² causou maior diminuição da viabilidade nas células que a de 9 J/cm².
- O tratamento com TFD, usando FtClAl encapsulada em CLN foi eficiente em induzir a morte de células cancerosas (4T1-luc e MCF-7) ou não (NIH-3T3).
- Na potência de 18 J/cm² ambas as formulações CLN_{FtClAl} e CLN_{DOX/FtClAl} apresentaram bons resultados contra as linhagens de carcinoma murino e humano. Igualmente, na irradiação de 9 J/cm² tanto CLN_{FtClAl} como CLN_{DOX/FtClAl} mostraram ser relevantes e eficazes contra a linhagem MCF-7 enquanto a formulação CLN_{DOX/FtClAl} foi a mais eficaz contra a linhagem 4T1.

No ensaio clonogênico observou-se falta de aderência celular das células 4T1-luc e MCF-7, mais evidente nas células tratadas e irradiadas. A análise de imunofluorescência evidenciou que boa internalização das nanopartículas, no citoplasma as células 4T1-luciferase.

Os experimentos de migração celular, evidenciaram que a formulação de CLN_{DOX/FtClAl} afetou o fechamento da ranhura após 24 horas de tratamento, indicando menor capacidade de migração celular das células tumorais, um fator associado à metástase.

Estes resultados apontam para o potencial das formulações CLN_{DOX/FtClAl} e CLN_{FtClAl} no tratamento do câncer de mama. O fato de a formulação CLN_{FtClAl} ter sido tão efetiva quanto a CLN_{DOX/FtClAl} nos testes *in vitro* pode indicar um tratamento com menos efeitos colaterais (sem o quimioterápico) e maior tolerabilidade pelos pacientes. Considerando que *in vivo* a TFD pode causar ativação do sistema imunológico, tanto CLN_{FtClAl} como CLN_{DOX/FtClAl} poderiam ser opções interessantes de tratamento.

Como perspectivas de pesquisa com este sistema tentaríamos: explorar melhor os mecanismos da morte celular induzidas pelo tratamento; testar o efeito da nanoformulação otimizada em outras linhagens celulares, como de câncer de mama triplo-negativo (MDA-MB-231) e linhagens de células humanas saudáveis (MCF10-A) e posteriormente testar a aplicação *in vivo* desta formulação, em modelo animal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AALTONEN, L. A. et al. Pan-cancer analysis of whole genomes. **Nature**, v. 578, n. 7793, p. 82–93, 2020.
- ABDOLAHPOUR, S. et al. Development of Doxorubicin-Loaded Nanostructured Lipid Carriers: Preparation, Characterization, and In Vitro Evaluation on MCF-7 Cell Line. **BioNanoScience**, v. 7, n. 1, p. 32–39, 2017.
- ABDOLAHPOUR, S. et al. Targeted delivery of doxorubicin into tumor cells by nanostructured lipid carriers conjugated to anti-EGFRvIII monoclonal antibody. **Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology**, v. 46, n. 1, p. 89–94, 2018.
- AGOSTINIS, P. et al. Photodynamic therapy of cancer: An update. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 61, n. 4, p. 250–281, 2011.
- AKRAM, M. W. et al. Tailoring of Au-TiO₂ nanoparticles conjugated with doxorubicin for their synergistic response and photodynamic therapy applications. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, v. 384, n. s. n., p. 112040-112051, 2019.
- ALMEIDA, V. M. et al. Anticancer drug screening: standardization of in vitro wound healing assay. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 55, n. s. n., p. 606-619, 2020.
- ANTTILA, S. et al. Cancer statistics, 2019. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 321, n. 1, p. 7–34, 2019.
- ANTTILA, S.; BOFFETTA, P. **Occupational cancers**. [2 ed.] Springer International Publishing, 2020. (2 ed.), <https://doi.org/10.1007/978-3-030-30766-0>.
- BAHUGUNA, A. et al. MTT assay to evaluate the cytotoxic potential of a drug. **Bangladesh Journal of Pharmacology**, v. 12, n. 2, p. 115–118, 2017.
- BANERJEE, S. M. et al. Photodynamic therapy: Inception to application in breast cancer. **The Breast**, v.31, n. s. n., p.105-113, 2017.
- BELOQUI, A. et al. Nanostructured lipid carriers: Promising drug delivery systems for future clinics. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and medicine**, v. 12, n. 1, p. 143–161, 2016.
- BENNETT, R. L.; LICHT, J. D. Targeting Epigenetics in Cancer. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology. Pharmacol. Toxicol**, v. 58, n. s. n., p. 187–207, 2018.
- BENOV, L. Photodynamic therapy: current status and future directions. **Medical Principles and Practice**, v. 24, n. suppl.1, p. 14-28, 2015.
- BHATTACHARJEE, S. DLS and zeta potential - What they are and what they are not? **Journal of Controlled Release**, v. 235, n. s.n., p. 337–351, 2016.
- BOIX-MONTESINOS, P. et al. The past, present, and future of breast cancer models for nanomedicine development. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 173, n. s.n., p. 306-330, 2021,

BORGES, G. S. M. et al. Sclareol is a potent enhancer of doxorubicin: Evaluation of the free combination and co-loaded nanostructured lipid carriers against breast cancer. **Life Sciences**, v. 232, n. s.n., p. 116678-116690, 2019.

BRANNON-PEPPAS, L.; BLANCHETTE, J. O. Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, n. 11, p. 1649-1659, 2004.

BRASIL, Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação de Prevenção e vigilância. Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil, Brasília, 2018. Disponível: <https://www.gov.br/inca/Fatimapt-br/assuntos/cancer/tipos/mama>. Acesso em: 21 de fevereiro de 2023.

BRAY, F. et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 68, n. 6, p. 394-424, 2018.

BREITKREITZ, M. C. et al. Characterization of semi-solid Self-Emulsifying Drug Delivery Systems (SEDDS) of atorvastatin calcium by Raman image spectroscopy and chemometrics. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 73, n. s.n, p. 3-12, 2013.

BRODIN, N. P.; GUHA, C.; TOMÉ, W. A. Photodynamic therapy and its role in combined modality anticancer treatment. **Technology in Cancer Research and Treatment**, v. 14, n. 4, p. 355-368, 2015.

CAGEL, M. et al. Doxorubicin: nanotechnological overviews from bench to bedside. **Drug Discovery Today**, v. 22, n. 2, p. 270-281, 2017.

CANDIDO, N. M. et al. Combining photodynamic therapy and chemotherapy: improving breast cancer treatment with nanotechnology. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 14, n. 5, p. 994-1008, 2018.

CARVALHO, F. M. Triple-negative breast cancer: from none to multiple therapeutic targets in two decades. **Frontiers in Oncology**, v. 13, n. s.n., p. 1244781-244795, 2023.

CAVALCANTE, C. H. et al. Doxorubicin-loaded pH-sensitive micelles: A promising alternative to enhance antitumor activity and reduce toxicity. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 134, n. s.n., p. 111076-111086, 2021.

CHANG-QING, Y. et al. Recent treatment progress of triple negative breast cancer. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v.151, n. s.n., p. 40-53, 2020.

CHEN, G. et al. Advances in cancer theranostics using organic-inorganic hybrid nanotechnology. **Applied Materials Today**, v. 23, n. s.n., p. 101003-101025, 2021.

CHEN, J. et al. Advances in nanomaterials for photodynamic therapy applications: Status and challenges. **Biomaterials**, v. 237, n. s.n., p. 119827-119853, 2020.

CHEN, L. et al. Tumor-Targeted Drug and CpG Delivery System for Phototherapy and Docetaxel-Enhanced Immunotherapy with Polarization toward M1-Type Macrophages on Triple Negative Breast Cancers. **Advanced Materials**, v. 31, n. 52, p. 1904997-1905005, 2019.

CHEUNG-ONG, K.; GIAEVER, G.; NISLOW, C. DNA-Damaging Agents in Cancer Chemotherapy: Serendipity and Chemical Biology. **Chemistry & Biology**, v.20, n. 5, p. 648-659, 2013.

CHILAKAMARTHI, U.; GIRIBABU, L. Photodynamic Therapy: Past, Present and Future. **Chemical Record**, v. 17, n. 8, p. 775–802, 2017.

CHO, K. et al. Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 14, n. 5, p. 1310–1316, 2008.

COOMBES, R. C. et al. Personalized detection of circulating tumor DNA antedates breast cancer metastatic recurrence. **Clinical Cancer Research**, v. 25, n. 14, p. 4255–4263, 2019.

DANIELL, M. D.; HILL, J. S. A history of photodynamic therapy. **Australian and New Zealand Journal of Surgery**, v. 5, n.61, p.340-348, 1991.

DE FREITAS, L. F.; HAMBLIN, M. R. Proposed Mechanisms of Photobiomodulation or Low-Level Light Therapy. **IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics**, v. 22, n. 3, p. 348–364, 2016.

DE LAS HERAS, E. et al. Photosensitive EGFR-targeted nanocarriers for combined photodynamic and local chemotherapy. **Pharmaceutics**, v. 14, n. 2, p. 405-425, 2022.

DE MORAES, M. et al. Effects of photodynamic therapy mediated by nanoemulsion containing chloro-aluminum phthalocyanine: A histologic and immunohistochemical study in human gingiva. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 12, n. 4, p. 592–597, 2015.

DE PAULA, E. et al. Liposome-Based Delivery of Therapeutic Agents. In: **Controlled Drug Delivery Systems**. 1. ed. New York: CRC Press Taylor & Francis Group, 2020. p. 299–324.

DESANTIS, C. E. et al. Breast cancer statistics, 2019. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 69, n. 6, p. 438–451, 2019.

DOUGHERTY, T. J. et al. Photoradiation Therapy for the Treatment of Malignant Tumors. **Cancer Research**, v. 38, n. 8, p. 2628–2635, 1978.

DOUGHERTY, T. J. Photodynamic therapy—new approaches. **Seminars in Surgical Oncology**, v. 5, n. 1, p. 6–16, 1989.

DRAGOVIC, Rebecca A. et al. Sizing and phenotyping of cellular vesicles using Nanoparticle Tracking Analysis. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 7, n. 6, p. 780-788, 2011.

EL-DALY, S. M.; ABBA, M. L.; GAMAL-ELDEEN, A. M. The role of microRNAs in photodynamic therapy of cancer. **European Journal of Medicine Chemistry**. v.142, n. s.n., p. 550-555, 2017.

ETCHEVERRY, M. E. et al. Photodynamic therapy in 2D and 3D human cervical carcinoma cell cultures employing LED light sources emitting at different wavelengths. **Physics in Medicine and Biology**, v. 65, n. 1, p. 015017-015055, 2020.

FANGUEIRO, J. F. et al. Design of cationic lipid nanoparticles for ocular delivery: Development, characterization and cytotoxicity. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 461, n. 1–2, p. 64–73, 2014.

FATIMA, A. et al. A comprehensive review on nanocarriers as a targeted delivery system for the treatment of breast cancer. **Intelligent Pharmacy**, v.2, n. s., p. 415–426, 2024.

FELSHER, D. W. Cancer revoked: Oncogenes as therapeutic targets. **Nature Reviews Cancer**, v. 3, n. s.n, p. 375–380, 2003.

FERLAY, J. et al. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **International Journal of Cancer**, v. 136, n. 5, p. E359–E386, 2015.

FRANCHI, L. P. et al. In vitro effects of photodynamic therapy induced by chloroaluminum phthalocyanine nanoemulsion. **Photodiagnosis and photodynamic therapy**, v. 16, n. s. n., p. 100–105, 2016.

FRANCIES, F. Z. et al. Breast cancer in low-middle income countries: abnormality in splicing and lack of targeted treatment options, **American Journal of Cancer Research**. v.10, n. s.n., p. 1568–1591, 2020.

FUKUDA, I. M. et al. Design of experiments (DoE) applied to pharmaceutical and analytical quality by design (QbD). **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 54, n. Special Issue, p. 1–16, 2018.

GAIO, E. et al. Keratin nanoparticles co-delivering Docetaxel and Chlorin e6 promote synergic interaction between chemo- and photo-dynamic therapies. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 199, n. s. n., p. 111598–111610, 2019.

GANTA, S. et al. Formulation development of a novel targeted theranostic nanoemulsion of docetaxel to overcome multidrug resistance in ovarian cancer. **Drug Delivery**, v. 23, n. 3, p. 968–980, 2016.

GARRIDO-CASTRO, A.C.; LIN, N.U.; POLYAK, K. Insights into molecular classifications of triple-negative breast cancer: improving patient selection for treatment. **Cancer discovery**, v.9, p. 176–198, 2019.

GENTA, I. et al. GE11 peptide as an active targeting agent in antitumor therapy: A minireview. **Pharmaceutics**, v.10, n. 1, p. 2–15, 2017.

GHANDI, M. et al. Next-generation characterization of the Cancer Cell Line Encyclopedia. **Nature**, v. 569, n. 7757, p. 503–508, 2019.

GOTO, P. L.; SIQUEIRA-MOURA, M. P.; TEDESCO, A. C. Application of aluminum chloride phthalocyanine-loaded solid lipid nanoparticles for photodynamic inactivation of melanoma cells. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 518, n. 1–2, p. 228–241, 2017.

GROSS, J. et al. Nanoparticle tracking analysis of particle size and concentration detection in suspensions of polymer and protein samples: Influence of experimental and data evaluation parameters. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 104, n. s.n, p. 30–41, 2016.

GROTTO, D. et al. Importance of the lipid peroxidation biomarkers and methodological aspects FOR malondialdehyde quantification. *Quim. Nova*, v. 32, n. 1, 169-174, 2009.

HAHN, Virginia S. et al. Heart failure with targeted cancer therapies: mechanisms and cardioprotection. **Circulation research**, v. 128, n. 10, p. 1576-1593, 2021.

HAIDER, M. et al. Nanostructured lipid' carriers for delivery of chemotherapeutics: A review. **Pharmaceutics**, v. 12, n. 3, p. 288-313, 2020.

HAN, F. et al. Effect of surfactants on the formation and characterization of a new type of colloidal drug delivery system: Nanostructured lipid carriers. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 315, n. 1-3, p. 210-216, 2008.

HANAHAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p.646-674, 2011.

HARBECK, N. et al. Breast cancer. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 5, n. 1, p. 66-96, 2019.

HIBBERT, D. B. Experimental design in chromatography: A tutorial review. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 910, n. s. n., p. 2-13, 2012.

HÖRMANN, K.; ZIMMER, A. Drug delivery and drug targeting with parenteral lipid nanoemulsions - A review. **Journal of Controlled Release**, v.223, n. s.n., p. 85-98, 2016.

HOSNI, M. et al. Reviewing ensemble classification methods in breast cancer. **Computer Methods and Programs in Biomedicine**, v.177, n. s. n., p. 89-112, 2019.

HOSSEINI, H. et al. Early dissemination seeds metastasis in breast cancer. **Nature**, v. 540, n. 7634, p. 552-558, 2016.

HU, Z. et al. Targeting tissue factor as a novel therapeutic oncotarget for eradication of cancer stem cells isolated from tumor cell lines, tumor xenografts and patients of breast, lung and ovarian cancer. **Oncotarget**, v. 8, n. 1, p. 1481-1494, 2016.

HUA, J. et al. Current Strategies for Tumor Photodynamic Therapy Combined with Immunotherapy. **Frontiers in Oncology**. v. 11., n. s. n., p. 738323-738336, 2021.

HULKOWER, K. I.; HERBER, R. L. Cell migration and invasion assays as tools for drug discovery. **Pharmaceutics**, v. 3, n. 1, p. 107-124, 2011.

INCA. INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. Estimativa/2020. Incidência de Câncer no Brasil, Janeiro: INCA; 2020. Disponível < <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/gestor-e-profissional-de-saude/controlado-cancer-de-mama/dados-e-numeros/rastreamento-do-cancer-de-mama-na-populacao-alvo> >. Acesso em: 10 de janeiro de 2023.

JENA, L.; MCERLEAN, E.; MCCARTHY, H. Delivery across the blood-brain barrier: nanomedicine for glioblastoma multiforme. **Drug Delivery and Transl Research**. v. 10, n. s. n., p. 304-318, 2020.

JEON, G.; KO, Y. T. Enhanced photodynamic therapy via photosensitizer-loaded nanoparticles for cancer treatment. **Journal of Pharmaceutical Investigation**, v. 49, n. 1, p. 1–8, 2019.

JIN, H. et al. EGFR-targeting PLGA-PEG nanoparticles as a curcumin delivery system for breast cancer therapy. **Nanoscale**, v. 9, n. 42, p. 16365–16374, 2017.

JIN, S.; YE, K. Targeted Drug Delivery for Breast Cancer Treatment. **Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery**, v. 8, n. 2, p. 143–153, 2013.

JOSHI, H.; PRESS, M. F. Chapter 22 - Molecular oncology of breast cancer. *In*: BLAND, K. I.; COPELAND, E. M.; KLIMBERG, V. S.; GRADISHAR, W. J. (Eds.) **The Breast (Fifth Edition)**: Comprehensive Management of Benign and Malignant Diseases. Elsevier, 2018, p. 282-307e.5. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-35955-9.00022-2>.

KAMMERER, E. et al. Proton therapy for locally advanced breast cancer: A systematic review of the literature. **Cancer Treatment**, v. 63, n. s.n., p. 19-27, 2018.

KANWAL, U. et al. Advances in nano-delivery systems for doxorubicin: an updated insight. **Journal of Drug Targeting**, v. 26, n. 4, p. 296–310, 2018.

KESSEL, D. Delivery of photosensitizing agents. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, n. 1, p. 7–8, 2004.

KESSEL, D. Photodynamic Therapy: A Brief History. **Journal of Clinical Medicine**, v. 8, n. 10, p. 1581 - 1587, 2019.

KLEVOS, G. A. et al. A Breast Cancer Review: Through the Eyes of the Doctor, Nurse, and Patient. **Journal of Radiology**, v. 36, n. s. n., p.158-165, 2017.

KLOCHKOV, S. G. et al. Implications of nanotechnology for the treatment of cancer: Recent advances. **Seminars in Cancer Biology**, v. 69, n. s. n., p. 190-199, 2021.

KOBOLDT, D. C. et al. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. **Nature**, v. 490, n. 7418, p. 61–70, 2012.

KRAMER, N. et al. In vitro cell migration and invasion assays. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 752, n. 1, p. 10-24, 2013.

KUBIAK, M. et al. Cell reactions and immune responses to photodynamic therapy in oncology. **Postepy Higieny Medycyny Dosw**, v. 70, n. s. n., p. 735-742, 2016.

KWIATKOWSKI, S. et al. Photodynamic therapy – mechanisms, photosensitizers and combinations. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 106, n. s. n., p. 1098-1107, 2018.

LAGES, E. B. et al. Co-delivery of doxorubicin, docosahexaenoic acid, and α -tocopherol succinate by nanostructured lipid carriers has a synergistic effect to enhance antitumor activity and reduce toxicity. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 132, n. s. n., p. 110876-110887, 2020.

LAKSHMI, P.; KUMAR, G. A. Nano - Suspension technology: A Review. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 2, n. Suppl 4, p. 35–40, 2010.

LASON, E. et al. NLC delivery systems for alpha lipoic acid: Physicochemical characteristics and release study. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 532, n. s. n., p. 57–62, 2017.

LEARDI, R. Experimental design in chemistry: A tutorial. **Analytica Chimica Acta**, v. 652, n. 1–2, p. 161–172, 2009.

LI, M.; WILKINSON, D.; PATCHIGOLLA, K. Comparison of Particle Size Distributions Measured Using Different Techniques. **Particulate Science and Technology**, v. 23, n. 3, p. 265–284, 2007.

LI, W. T. et al. Mild photothermal therapy/photodynamic therapy/chemotherapy of breast cancer by Lyp-1 modified Docetaxel/IR820 Co-loaded micelles. **Biomaterials**, v. 106, n. s. n., p. 119–133, 2016.

LIU, J. Y. et al. In vitro photodynamic activities of zinc (II) phthalocyanines substituted with pyridine moieties. **Photodiagnosis and photodynamic therapy**, v. 13, n. s. n., p. 341–343, 2016.

LIYANAGE, P. Y. et al. Nanoparticle-mediated targeted drug delivery for breast cancer treatment. **Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer**, v. 1871, n. s. n., p. 419–433, 2019.

LO, P. C. et al. The unique features and promises of phthalocyanines as advanced photosensitisers for photodynamic therapy of cancer. **Chemical Society Reviews**, v. 49, n. 4, p. 1041–1056, 2020.

LONGO, J. P. F. et al. Prevention of distant lung metastasis after photodynamic therapy application in a breast cancer tumor model. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 12, n. 4, p. 689–699, 2016.

LÓPEZ-MARÍN, N.; MULET, R. In silico modelling of apoptosis induced by photodynamic therapy. **Journal of Theoretical Biology**, v. 436, n. s. n., p. 8–17, 2018.

LOVITT, C. J.; SHELPER, T. B.; AVERY, V. M. Doxorubicin resistance in breast cancer cells is mediated by extracellular matrix proteins. **BMC Cancer**, v. 18, n. 41, p. 1–11, 2018.

MACDONALD, I. J.; DOUGHERTY, T. J. Basic principles of photodynamic therapy. **Journal of porphyrins and Phthalocyanines**, v. 5, n. 2, p. 105–129, 2001. 7

MASJEDI, M. et al. Nose-to-brain delivery of sumatriptan-loaded nanostructured lipid carriers: preparation, optimization, characterization and pharmacokinetic evaluation. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 72, n. 10, p. 1341–1351, 2020.

MEI, L. et al. A novel docetaxel-loaded poly (ϵ -caprolactone)/Pluronic F68 nanoparticle overcoming multidrug resistance for breast cancer treatment. **Nanoscale Research Letters**, v. 4, n. 12, p. 1530–1539, 2009.

MENDES, A. I. et al. Miconazole-loaded nanostructured lipid carriers (NLC) for local delivery to the oral mucosa: Improving antifungal activity. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 111, n. s. n., p. 755–763, 2013.

MENDES, M. et al. Modeling of ultra-small lipid nanoparticle surface charge for targeting glioblastoma. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 117, n. s. n., p. 255–269, 2018.

MENDES, M. et al. Biomimetic ultra-small lipid nanoconstructs for glioblastoma treatment: A computationally guided experimental approach. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 587, n. s. n., p. 119661-119680, 2020.

MFOUO-TYNGA, I. S. et al. Features of third generation photosensitizers used in anticancer photodynamic therapy: Review. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 34, n. s. n., p. 102091-102101, 2021.

MIAO, L. et al. Nanoformulations for combination or cascade anticancer therapy. **Advanced Drug Delivery**, v. 115, n. s. n., p. 3-22, 2017.

MIGLIETTA, F. *et al.* Major advancements in metastatic breast cancer treatment: when expanding options means prolonging survival. **ESMO open**, v. 7, p. 100409-100426, 2022.

MITSUTAKE, H.; POPPI, R. J.; BREITKREITZ, M. C. Raman imaging spectroscopy: History, fundamentals and current scenario of the technique. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 30, n. 11, p. 2243-2258, 2019.

MOHAMMADIAN, J. et al. Formulation of Stattic as STAT3 inhibitor in nanostructured lipid carriers (NLCs) enhances efficacy of doxorubicin in melanoma cancer cells. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 393, n. 12, p. 2315–2323, 2020.

MOMENIMOVAHED, Z.; SALEHINIYA, H. Epidemiological characteristics of and risk factors for breast cancer in the world. **Breast Cancer: Targets and Therapy**, v. 11, n. s.n., p. 151-164, 2019.

MORET, F.; VARCHI, G. Drug Delivery in Photodynamic Therapy. **Pharmaceutics**, v. 15, n. 7, p. 1784-1787, 2023.

MUEHLMANN, L. A. et al. Aluminium-phthalocyanine chloride nanoemulsions for anticancer photodynamic therapy: Development and in vitro activity against monolayers and spheroids of human mammary adenocarcinoma MCF-7 cells. **Journal of nanobiotechnology**, v. 13, n. 36, p. 1-11, 2015.

MULLER, R. H.; RADTKE, M.; WISSING, S. A. Nanostructured lipid matrices for improved microencapsulation of drugs. **International Journal of Pharmaceutical**, v. 242, n. 1-2, p. 121–128, 2002.

NASCIMENTO, R. G. DO; OTONI, K. M. Histological and molecular classification of breast cancer: what do we know? **Mastology**, v. 30, n. s.n., p. 1-8, 2020.

NASIRIZADEH, S.; MALAEKEH-NIKOUEI, B. Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers in oral cancer drug delivery. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 55, n. s. n., p. 101458-101469, 2020.

NEW, R.R.C. Liposomes: a practical approach. 1990.

NOVAES, C. G. et al. Optimization of analytical methods using response surface methodology part I: Process variables. **Revista Virtual de Química**, v. 9, n. 3, p. 1184–1215, 2017.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, v. 95, n. 2, p. 351–358, 1979.

OSTAŃSKA, E.; AEBISHER, D.; BARTUSIK-AEBISHER, D. The potential of photodynamic therapy in current breast cancer treatment methodologies. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 137, n. s. n., p.111302-111311, 2021.

ÖZDEMİR, S.; ÇELİK, B.; ÜNER, M. Chapter 15 - Properties and therapeutic potential of solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers as promising colloidal drug delivery systems. In: HOLBAN, A. M.; GRUMEZESCU, A. M. (Eds.). **Materials for Biomedical Engineering: Nanomaterials-based drug delivery**. Elsevier, 2019, p. 457–505. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816913-1.00015-5>.

PEIRA, E. et al. Solid lipid nanoparticles carrying lipophilic derivatives of doxorubicin: Preparation, characterization, and in vitro cytotoxicity studies. **Journal of microencapsulation**, v. 33, n. 4, p. 381-390, 2016.

PINTON, L. et al. Targeting of immunosuppressive myeloid cells from glioblastoma patients by modulation of size and surface charge of lipid nanocapsules. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 18, n. s.n., p. 1-12, 2020.

POLITIS, S. N. et al. Design of experiments (DoE) in pharmaceutical development. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 43, n. 6, p. 889–901, 2017.

PRADHAN, M. et al. Statistically optimized calcipotriol fused nanostructured lipid carriers for effectual topical treatment of psoriasis. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 61, n. s.n., p. 102168-102178, 2020.

PUGLIA, C. et al. Nanostructured Lipid Carriers (NLC) as Vehicles for Topical Administration of Sesamol: In Vitro Percutaneous Absorption Study and Evaluation of Antioxidant Activity. **Planta Med.**, v. 83, n. 5, p. 398-404, 2016.

PUGLIA, C.; BONINA, F. Lipid nanoparticles as novel delivery systems for cosmetics and dermal pharmaceuticals. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 9, n.4, p. 429–441, 2012.

RAFEHI H, et al. Clonogenic assay: adherent cells. **Journal of Visualized Experiments**, v. 13;(49):2573. 2011.

RIBEIRO, L. N. D. M. et al. Use of nanoparticle concentration as a tool to understand the structural properties of colloids. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 982-989, 2018.

RIBEIRO, L. N. M. et al. Natural lipids-based NLC containing lidocaine: from pre-formulation to in vivo studies. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 106, n. s.n., p. 102–112, 2017.

RIBEIRO, L. N. M. et al. Nanostructured lipid carriers as robust systems for topical lidocaine-prilocaine release in dentistry. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 93, n. s.n., p. 192–202, 2016.

RIDOLFI, D. M. et al. Chitosan-solid lipid nanoparticles as carriers for topical delivery of tretinoin. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 93, n. s.n., p. 36–40, 2012.

ROBISON, J. E.; PERREARD, L.; BERNARD, P. S. State of the science: Molecular classifications of breast cancer for clinical diagnostics. **Clinical Biochemistry**, v. 37, n. 7, p. 572-578, 2004.

RODRIGUES DA SILVA, G. H. et al. Optimised NLC: a nanotechnological approach to improve the anaesthetic effect of bupivacaine. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 529, n. 1–2, p. 253–263, 2017.

RODRIGUES DA SILVA, G. H. et al. Antineoplastics encapsulated in nanostructured lipid carriers. **Molecules**, v. 26, n. 22, p. 6929–6953, 2021.

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

RODRIGUES, M. C. et al. Photodynamic therapy mediated by aluminum-phthalocyanine nanoemulsion eliminates primary tumors and pulmonary metastases in a murine 4T1 breast adenocarcinoma model. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 204, n. s. n., p. 111808-111818, 2020.

RODRIGUES, M. C. et al. Induction of immunogenic cell death by photodynamic therapy mediated by aluminum-phthalocyanine in nanoemulsion. **Pharmaceutics**, v. 14, n. 1, p. 196-208, 2022.

RUI, L. L. et al. Functional organic nanoparticles for photodynamic therapy. **Chinese Chemical Letters**, v. 27, n. 8, p. 1412–1420, 2016.

SABZICHI, M. et al. Vitamin D-Loaded Nanostructured Lipid Carrier (NLC): A New Strategy for Enhancing Efficacy of Doxorubicin in Breast Cancer Treatment. **Nutrition and Cancer**, v. 69, n. 6, p. 840–848, 2017.

SANTOS, K. L. M. et al. Prospective application of phthalocyanines in the photodynamic therapy against microorganisms and tumor cells: A mini-review. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 32, n. s.n., p. 102032-102041, 2020.

SHAFEI, A. et al. A review on the efficacy and toxicity of different doxorubicin nanoparticles for targeted therapy in metastatic breast cancer. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 95, n. s.n., p. 1209-1218, 2017.

SILVA, C. “Sistema lipossomal de ftalocianina de cloro-alumínio, contendo ácido fólico, aplicada à Terapia Fotodinâmica”. Dissertação (Mestrado em Ciências). Departamento de Química, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, p.68, 2013.

SILVA, E. P. da et al. Reflections on the impacts of breast cancer treatment on women’s family dynamics. **Research, Society and Development**, v. 12, n. 1, p. e0712139372-e0712139380, 2023.

SKOBE, M. et al. Induction of tumor lymphangiogenesis by VEGF-C promotes breast cancer metastasis. **Nature Medicine**, v. 7, n. 2, p. 192–198, 2001.

SOMARELLI, Jason A. et al. Molecular biology and evolution of cancer: from discovery to action. **Molecular biology and evolution**, v. 37, n. 2, p. 320-326, 2020.

SPILLER, W. et al. Singlet Oxygen Quantum Yields of Different Photosensitizers in Polar Solvents and Micellar Solutions. **Journal of Porphyrins and Phthalocyanines**, v. 02, n. 02, p. 145–158, 1998.

STILES, M.; ALLEN, L. Stability of doxorubicin hydrochloride in portable pump reservoirs. **American Journal of Hospital Pharmacy**, v. 48, n. s. n., p. 1976-1977, 1991.

STORM, G. et al. Surface modification of nanoparticles to oppose uptake by the mononuclear phagocyte system. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 17, n. 1, p. 31–48, 1995.

SUN, P. et al. Transferrin receptor-targeted peg-pla polymeric micelles for chemotherapy against glioblastoma multiforme. **International Journal of Nanomedicine**, v. 15, n. s. n., p. 6673–6688, 2020.

SUN, Y. S. et al. Risk factors and preventions of breast cancer. **International Journal of Biological Sciences**, v.13, n. 11, p. 1387-1397, 2017.

SUVÀ, M. L.; RIGGI, N.; BERNSTEIN, B. E. Epigenetic Reprogramming in Cancer. **Science**, v. 339, n. 6127, p. 1567-1570, 2013.

TAMJIDI, F. et al. Nanostructured lipid carriers (NLC): A potential delivery system for bioactive food molecules. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 19, n. s. n., p. 29-43, 2013.

TANG, Y. et al. Classification, Treatment Strategy, and Associated Drug Resistance in Breast Cancer. **Clinical Breast Cancer**. v. 16, n. 5, p. 335-343, 2016.

TIWARI, G. et al. Drug delivery systems: An updated review. **International Journal of Pharmaceutical Investigation**, v. 2, n. 1, p. 2, 2012.

TRIEFENBACH, F. Design of Experiments: The D-Optimal Approach and Its Implementation As a Computer Algorithm, **Bachelor Thesis in Information and Communication Technology**, 2008.

VELLOSO, F. T. et al. Desenvolvimento e validação de método analítico em CLAE-UV para a quantificação de ácido retinóico em microcápsulas de alginato e quitosana. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 45, n. 1, p. 177–183, 2009.

VELMURUGAN, R.; SELVAMUTHUKUMAR, S. Development and optimization of ifosfamide nanostructured lipid carriers for oral delivery using response surface methodology. **Applied Nanoscience (Switzerland)**, v. 6, n. 2, p. 159–173, 2016.

VIDEIRA, M.; REIS, R. L.; BRITO, M. A. Deconstructing breast cancer cell biology and the mechanisms of multidrug resistance. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1846, n. s. n., p. 312-325, 2014.

VILSINSKI, B. 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. **Quimica Nova**, v. 38, n. 5, p. 631–639, 2015.

WACHOWSKA, M. M.; ANGELIKA & GOLAB, JAKUB. Targeting Epigenetic Processes in Photodynamic Therapy-Induced Anticancer Immunity. **Frontiers in Oncology**, v. 5, n. s. n., p. 176 - 204, 2015.

WAKS, A. G.; WINER, E. P. Breast Cancer Treatment: A Review. **Journal of the American Medical Association**, v. 321, n. 3, p. 288–300, 2019.

WANG, X. et al. Analysis of the in vivo and in vitro effects of photodynamic therapy on breast cancer by using a sensitizer, Sinoporphyrin sodium. **Theranostics**, v. 5, n. 7, p. 772–786, 2015.

WINSLOW, S. et al. Prognostic stromal gene signatures in breast cancer. **Breast Cancer Research**, v. 17, n. 1, p. 1–13, 2015.

WOLFRAM, J.; FERRARI, M. Clinical cancer nanomedicine. **Nano Today**, v. 25, n. s. n., p. 85-98, 2019.

YANG, Z. et al. Hypoglycemic mechanism of a novel proteoglycan, extracted from *Ganoderma lucidum*, in hepatocytes. **European journal of pharmacology**, v. 820, n. s. n., p. 77-85, 2018.

ZAFAR, A. et al. Novel nanotechnology approaches for diagnosis and therapy of breast, ovarian and cervical cancer in female: A review. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 61, n. s. n., p. 102198-102209, 2021.

ZHANG, H. W. et al. Development, characterization and evaluation of doxorubicin nanostructured lipid carriers for prostate cancer. **Journal of Buon**, v. 22, n. 1, p. 102–111, 2017.

ZHANG, R. X. et al. Nanomedicine of synergistic drug combinations for cancer therapy – Strategies and perspectives. **Journal of Controlled Release**, v. 240, n. s. n., p. 489–503, 2016.

ZHAO, L. P. et al. Self-Delivery Nanomedicine for O₂-Economized Photodynamic Tumor Therapy. **Nano Letters**, v. 20, n. 3, p. 2062–2071, 2020.

ZHAO, X. et al. Facile preparation of biocompatible nanostructured lipid carrier with ultra-small size as a tumor-penetration delivery system. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 170, n. s. n., p. 355–363, 2018.

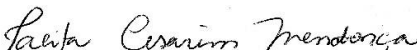
ZHENG, G. et al. Improving breast cancer therapy using doxorubicin loaded solid lipid nanoparticles: Synthesis of a novel arginine-glycine-aspartic tripeptide conjugated, pH sensitive lipid and evaluation of the nanomedicine in vitro and in vivo. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 116, n. s.n., p. 109006-109015, 2019.

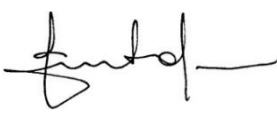
ZHU, C.; SUAREZ, S. I.; LUKEH III, J. C. Illuminating and alleviating cellular oxidative stress with an ROS-activated, H₂S-donating theranostic. **Tetrahedron Letters**, v. 69, n. s.n., p. 152944-152948, 2021.

ANEXOS

DECLARAÇÃO DE BIOÉTICA E BIOSSEGURANÇA

Em observância ao **§5º do Artigo 1º da Informação CCPG-UNICAMP/001/15**, referente a Bioética e Biossegurança, declaro que o conteúdo de minha Dissertação de Mestrado intitulada “*Terapia fotodinâmica com ftalocianina de cloro-alumínio em carreadores lipídicos nanoestruturados contendo doxorubicina para tratamento do câncer de mama*”, desenvolvida no Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular e Morfofuncional do Instituto de Biologia da Unicamp, não versa sobre pesquisa envolvendo seres humanos, animais ou temas afetos a Biossegurança.

Assinatura: 
Nome do(a) aluno(a): Talita Cesarim Mendonça

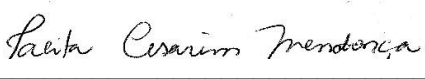
Assinatura: 
Nome do(a) orientador(a): Eneida de Paula

Data: 30 de agosto de 2024.

DECLARAÇÃO DE DIREITOS AUTORAIS

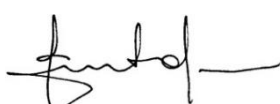
As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação de Mestrado, intitulada “*Terapia fotodinâmica com ftalocianina de cloro-alumínio em carreadores lipídicos nanoestruturados contendo doxorubicina para tratamento do câncer de mama*”, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 30 de agosto de 2024.

Assinatura :  _____

Nome do(a) autor(a): Talita Cesarim Mendonça

RG n.º 47.381.719-6

Assinatura :  _____

Nome do(a) orientador(a): Eneida de Paula

RG n.º 15.121.559-5