



UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO  
ESCOLA DE FARMÁCIA  
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA



HENRIQUE ARAÚJO DE OLIVEIRA

**ATIVIDADE FOTODINÂMICA *IN VITRO* DE NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS  
CONJUGADAS COM LIGANTE PARA DIRECIONAMENTO ATIVO À CÉLULAS  
DE CÂNCER DE MAMA**

OURO PRETO

2025

HENRIQUE ARAÚJO DE OLIVEIRA

**ATIVIDADE FOTODINÂMICA *IN VITRO* DE NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS  
CONJUGADAS COM LIGANTE PARA DIRECIONAMENTO ATIVO À CÉLULAS  
DE CÂNCER DE MAMA**

Monografia apresentada ao Curso de Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito parcial para a obtenção do grau de Bacharel em Farmácia.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dra. Vanessa Carla Furtado Mosqueira

Coorientadora: Prof<sup>a</sup> Mestra Márcia Pacheco Fialho

Ouro Preto

2025

## SISBIN - SISTEMA DE BIBLIOTECAS E INFORMAÇÃO

- O48a Oliveira, Henrique Araujo de.  
Atividade fotodinâmica in vitro de nanocápsulas poliméricas conjugadas com ligante para direcionamento ativo à células de câncer de mama. [manuscrito] / Henrique Araujo de Oliveira. - 2025.  
54 f.: il.: color., gráf., tab..
- Orientadora: Profa. Dra. Vanessa Carla Furtado Mosqueira.  
Coorientadora: Profa. Ma. Márcia Célia Pacheco Fialho.  
Monografia (Bacharelado). Universidade Federal de Ouro Preto. Escola de Farmácia. Graduação em Farmácia .
1. Nanotecnologia. 2. Nanopartículas. 3. Polímeros. 4. Fotoquimioterapia. 5. Mamas - Câncer. I. Mosqueira, Vanessa Carla Furtado. II. Fialho, Márcia Célia Pacheco. III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU 620.3

Bibliotecário(a) Responsável: Soraya Fernanda Ferreira e Souza - CRB6/2322



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO  
REITORIA  
ESCOLA DE FARMÁCIA  
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA



**FOLHA DE APROVAÇÃO**

**Henrique Araújo de Oliveira**

**ATIVIDADE FOTODINÂMICA IN VITRO DE NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS CONJUGADAS COM LIGANTE  
PARA DIRECIONAMENTO ATIVO À CÉLULAS DE CÂNCER DE MAMA**

Monografia apresentada ao Curso de Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito parcial para obtenção do ao grau de Farmacêutico Generalista

Aprovada em 03 de setembro de 2025.

**Membros da banca**

Profa. Dra. Vanessa Carla Furtado Mosqueira - Orientadora (Universidade Federal de Ouro Preto)  
Profa. Dra. Márcia Célia Pacheco Fialho - Coorientadora (Universidade Federal de Ouro Preto)  
Dra. Marina Guimarães Carvalho Machado - (Universidade Federal de Ouro Preto)  
Dra. Tâmilis Caroline Fernandes Pedrosa - (Universidade Federal de Minas Gerais)

A Profa. Dra. Vanessa Carla Furtado Mosqueira, orientadora do trabalho, aprovou a versão final e autorizou seu depósito na Biblioteca Digital de Trabalhos de Conclusão de Curso da UFOP em 05/01/2026



Documento assinado eletronicamente por **Vanessa Carla Furtado Mosqueira, PROFESSOR DE MAGISTERIO SUPERIOR**, em 15/06/2026, às 22:26, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [http://sei.ufop.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](http://sei.ufop.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **1124601** e o código CRC **C6CD8FDF**.

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Antônio e Maria, por todo incentivo, carinho, amor e atenção dispensados, não somente durante a graduação, mas ao longo de toda minha vida.

À minha irmã, Marisa, pelo seu jeito doce e singelo que me alegra e motiva a cada dia. Minha amiga e confidente de todas as horas.

À Élyca, pelo companheirismo, paciência, amor e afeto. Caminhar ao seu lado tem sido uma oportunidade única de ser uma pessoa melhor e mais feliz.

Às minhas famílias materna e paterna. Avó, tios, tias, primos e primas que estiveram presentes nos momentos desafiadores e sempre me incentivaram a buscar novos horizontes ao longo desses anos.

Aos irmãos da República Canil, que fizeram da graduação muito mais do que um processo de formação acadêmica, transformando-a em uma jornada repleta de autoconhecimento, persistência, amizade e fraternidade.

À Universidade Federal de Ouro Preto, à Escola de Farmácia e todo corpo técnico de docentes, técnicos administrativos e funcionários que contribuíram para minha formação. É um enorme privilégio ser aluno e fazer parte da história dessas instituições.

Às professoras Vanessa, Raquel, Maria Alice e Márcia pelas oportunidades e por todo conhecimento transmitido nas aulas e durante os experimentos no LDG-nano, me moldando enquanto aluno e profissional.

À Diretoria de Relações Internacionais e à Universidade do Porto por possibilitarem a realização do tão sonhado intercâmbio, experiência marcante que ampliou minha visão de mundo pelo contato com culturas tão diversas e pessoas tão singulares.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, que fomentou e viabilizou os projetos em que atuei, financiando estrutura física, capacitação dos professores, insumos, equipamentos e as bolsas de iniciação científica a mim atribuídas durante o ensino fundamental, médio e graduação.

Muito obrigado!

## RESUMO

A terapêutica do câncer permanece como um desafio de saúde pública global. Nas últimas décadas, poucas terapias incorporadas nos protocolos de tratamento inovaram de modo a se estabelecer na prática clínica, fazendo com que as abordagens padrão continuem sendo quimioterapia convencional, radioterapia e remoção cirúrgica. Avanços no campo da Nanotecnologia vêm possibilitando a manipulação da matéria a nível atômico e o estudo de interações na interface nano-biológica, permitindo desenvolver materiais com aplicação ao tratamento e diagnóstico da doença. Quando ambas propriedades são conciliadas em uma única preparação, pode-se denominá-la teranóstico. Nanocápsulas poliméricas são estruturas de dimensões nanométricas com núcleo oleoso envolto por matriz polimérica que possibilitam veicular fármacos e agentes de imagem, podendo ter propriedades teranósticas. O uso dessa classe de nanopartículas em terapias inovadoras, como a terapia fotodinâmica, vêm sendo amplamente explorado a nível de pesquisa acadêmica. Terapia fotodinâmica trata-se da combinação de três elementos para gerar toxicidade em células alvo: agente fotossensibilizador, luz em comprimento de onda adequado e moléculas de oxigênio dissolvidas no meio celular. Um fator central para a efetividade dessa terapia é o direcionamento ativo das cargas de fotossensibilizador para o ambiente intracelular, sendo desafiador o desenvolvimento de uma formulação que apresente, para além da propriedade teranóstica, biocompatibilidade e alta afinidade por células tumorais. Um dos meios explorados para induzir essa afinidade é a conjugação das nanoestruturas a ligantes bioativos, como os carboidratos, classe de moléculas fundamental no metabolismo e manutenção da bioenergética de tumores. O presente trabalho teve como objetivo desenvolver e caracterizar no aspecto físico-químico nanocápsulas poliméricas carregadas com fotossensibilizador IR-780 e ligante carboidrato ligados covalentemente ao PLA e avaliar a citotoxicidade frente células de tumor de mama murino 4T1, com ou sem irradiação por laser. A preparação das partículas foi adequada, obtendo-se nanocápsulas de tamanho médio de aproximadamente 133 nanômetros, índice de polidispersão de 0,151 e potencial zeta próximo de -35 mV. As formulações causaram citotoxicidade às células 4T1, principalmente quando a terapia fotodinâmica foi conduzida, com valor mínimo de viabilidade de 65% para a formulação NC IR-PLA-LIG 5X após exposição. Esses resultados reforçam o potencial das nanocápsulas poliméricas para aplicações oncológicas e abrem caminho para o desenvolvimento de novas plataformas para entrega de fármacos.

## ABSTRACT

Cancer therapy remains a global public health challenge. In recent decades, few therapies incorporated into treatment protocols have innovated enough to establish themselves in clinical practice, meaning that standard approaches remain conventional chemotherapy, radiotherapy, and surgical removal. Advances in Nanotechnology have enabled the manipulation of matter at the atomic level and the study of interactions at the nanobiological interface, enabling the development of materials applicable to the treatment and diagnosis of cancer. When both properties are combined in a single preparation, it can be termed theranostic. Polymeric nanocapsules are nanometric structures capable of incorporating theranostic properties due to their composition of an oily core surrounded by a polymer matrix that enables the delivery of drugs and imaging agents. The use of this class of nanoparticles in innovative therapies, such as photodynamic therapy, has been widely explored in academic research. Photodynamic therapy involves the combination of three elements to generate toxicity in target cells: a photosensitizing agent, light at an appropriate wavelength, and oxygen molecules dissolved in the cellular environment. A central factor in the effectiveness of this therapy is the active targeting of photosensitizing loads to the intracellular environment, making it challenging to develop a formulation that presents, in addition to theranostic properties, biocompatibility, and high affinity for tumor cells. One of the means explored to induce this affinity is the conjugation of nanostructures to bioactive ligands, such as carbohydrates, a class of molecules fundamental to the metabolism and maintenance of tumor bioenergetics. Thus, this work aimed to develop, physicochemically characterize and evaluate the cytotoxicity of polymeric nanocapsules, conjugated to the photosensitizer IR-780 and carbohydrate ligand, against 4T1 murine breast tumor cells. Cytotoxicity was compared in the absence and presence of laser irradiation. Particle preparation was adequate, yielding nanocapsules with a mean size of approximately 133 nanometers, a dispersion of 0.151, and a zeta potential close to -35 mV. The formulations caused cytotoxicity to 4T1 cells, particularly when photodynamic therapy was administered, with a minimum cell viability value of 65% for the NC-IR-PLA 5X formulation after irradiation. This study reiterates the potential of polymeric nanoparticles for oncology applications and paves the way for the development of new drug delivery systems.

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                             |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1.</b> Representação esquemática de nanoesfera e nanocápsula. ....                                                                | 20 |
| <b>Figura 2.</b> Quimioterapia convencional com agentes de baixo peso molecular versus terapia com nanoestrutura baseada no efeito EPR..... | 22 |
| <b>Figura 3.</b> Glicose e alguns análogos biosimilares sintetizados visando interações ligante-receptor. ....                              | 24 |
| <b>Figura 4.</b> Estrutura química da sonda IR-780.....                                                                                     | 25 |
| <b>Figura 5.</b> Diagrama de Jablonski adaptado: representação esquemática do mecanismo de fototoxicidade estimulado pela TFD.....          | 27 |
| <b>Figura 6:</b> Representação esquemática do processo de preparação das nanocápsulas.....                                                  | 33 |
| <b>Figura 7:</b> Caracterização das nanocápsulas.....                                                                                       | 35 |
| <b>Figura 8:</b> Nanopartícula envolta de camadas de íons e contra-íons.....                                                                | 39 |
| <b>Figura 9:</b> Representação gráfica das forças que atuam na interação de duas partículas e sua resultante.....                           | 37 |
| <b>Figura 10:</b> Fluxograma das etapas realizadas na Terapia Fotodinâmica.. ....                                                           | 37 |
| <b>Figura 11:</b> Representação gráfica das distribuições de Tamanho e Potencial Zeta das formulações .....                                 | 42 |
| <b>Figura 12:</b> Gráfico comparativo da viabilidade celular resultante de cada tratamento. ....                                            | 44 |

## LISTA DE TABELAS

|                                                                                                                                             |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 1:</b> Principais tratamentos para o câncer e seus efeitos colaterais mais frequentes.....                                        | 16 |
| <b>Tabela 2:</b> Limitações das terapias convencionais e vantagens potenciais da nanotecnologia no tratamento do câncer de mama. ....       | 17 |
| <b>Tabela 3:</b> Componentes das formulações de nanocápsulas poliméricas Branca, IR-PLA, IR-PLA-LIG 1X, IR-PLA-LIG 3X e IR-PLA-LIG 5X. .... | 34 |
| <b>Tabela 4:</b> Caracterização físico-química das nanocápsulas poliméricas. ....                                                           | 40 |
| <b>Tabela 5:</b> Média e desvio padrão englobando todas medições de Dh e $\zeta$ . ....                                                     | 41 |
| <b>Tabela 6:</b> Outros estudos que utilizaram IR-780.....                                                                                  | 45 |

## LISTA DE ABREVIATURAS

**DNA** ácido desoxirribonucleico

**Dh** Diâmetro hidrodinâmico

**EPR** efeito de permeabilidade e retenção aumentadas

**GLUT** transportadores de glicose

**GLUT 1** transportador de glicose subtipo 1

**GLUT 3** transportador de glicose subtipo 3

**HER2** fator de crescimento epidermal 2

**IR-780** Iodeto de 2-[2-[2-Cloro-3-[(1,3-di-hidro-3,3-dimetil-1-propil-2H-indol-2-ilideno)etilideno]-1-ciclo-hexen-1-il]etenilo]-3,3-dimetil-1-propilindolio

**mPEG-PLA/PLA-PEG** copolímero lactídeo-co-poli(etilenoglicol)ídeo

**NE** nanoesferas

**NC** nanocápsulas

**NIR** fluorescência no infra-vermelho próximo

**Nm** nanômetros

**NP** nanopartículas

**PA** polianidridos

**PACA** poli-alquil-cianocrilatos

**PCL** policaprolactona

**PDT** terapia fotodinâmica

**PLA** polímero polilactídeo

**PLGA** copolímero lactídeo-co-glicólídeo

**PM** peso molecular

**PTT** terapia fototérmica

**RE $\alpha$**  alfa de estrogênio

**ROS** espécies reativas de oxigênio

**RP** receptor de progesterona

$\zeta$  Potencial Zeta

## SUMÁRIO

|           |                                                                                                                                             |    |
|-----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>1</b>  | <b>INTRODUÇÃO</b>                                                                                                                           | 11 |
| <b>2</b>  | <b>REVISÃO DA LITERATURA</b>                                                                                                                | 15 |
| 2.1       | Câncer de mama: panorama e desafios terapêuticos                                                                                            | 15 |
| 2.2       | Nanotecnologia aplicada ao tratamento do câncer                                                                                             | 17 |
| 2.3       | Estratégias de direcionamento ativo para células tumorais                                                                                   | 23 |
| 2.4       | IR-780 Aplicado ao câncer: propriedades, mecanismos e potencial terapêutico                                                                 | 24 |
| 2.5       | Terapia fotodinâmica: fundamentos e aplicações                                                                                              | 27 |
| 2.6       | Modelo de cultivo de linhagem tumoral de mama (4T1) na Avaliação de atividade Antitumoral <i>in vitro</i>                                   | 28 |
| <b>3</b>  | <b>JUSTIFICATIVA</b>                                                                                                                        | 30 |
| <b>4</b>  | <b>OBJETIVOS</b>                                                                                                                            | 31 |
| 4.1       | Objetivo Geral                                                                                                                              | 31 |
| 4.2       | Objetivos específicos                                                                                                                       | 31 |
| <b>5</b>  | <b>MATERIAIS</b>                                                                                                                            | 32 |
| 5.1       | Reagentes                                                                                                                                   | 32 |
| 5.2       | Equipamentos                                                                                                                                | 32 |
| <b>6</b>  | <b>MÉTODOS</b>                                                                                                                              | 33 |
| 6.1       | Preparo de nanocápsulas poliméricas                                                                                                         | 33 |
| 6.2       | Caracterização das nanopartículas                                                                                                           | 35 |
| 6.3       | Avaliação da estabilidade das formulações                                                                                                   | 38 |
| 6.4       | Estudo da citotoxicidade e fototoxicidade do IR-PLA associado às nanocápsulas funcionalizadas frente às células de tumor de mama murino 4T1 | 38 |
| 6.5       | Análise de dados                                                                                                                            | 39 |
| <b>7</b>  | <b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>                                                                                                               | 40 |
| 7.1       | Preparo e caracterização das nanopartículas                                                                                                 | 40 |
| 7.2       | Avaliação da estabilidade das formulações                                                                                                   | 43 |
| 7.3       | Estudo da citotoxicidade e fototoxicidade do IR-PLA associado às nanocápsulas funcionalizadas frente às células de tumor de mama murino 4T1 | 43 |
| <b>8</b>  | <b>CONCLUSÃO</b>                                                                                                                            | 48 |
| <b>9</b>  | <b>REFERÊNCIAS</b>                                                                                                                          | 49 |
| <b>10</b> | <b>ANEXO A – Trabalhos publicados em anais de congressos e seminários</b>                                                                   | 54 |

## 1 INTRODUÇÃO

Câncer é a denominação dada a um conjunto de doenças que se assemelham pela proliferação acelerada e irrestrita de células de tecidos epiteliais (carcinomas) ou tecidos conjuntivos (sarcoma), que podem evoluir a um tumor e eventualmente se disseminar por órgãos diversos. A alteração na taxa de multiplicação das células se inicia quando mutações genéticas ocorrem, alterando a integridade do ácido desoxirribonucleico (DNA) e consequentemente as sinalizações e funcionamento adequado da maquinaria celular (INCA, 2022). Em 2022, o número estimado de casos diagnosticados de câncer no mundo foi de 20 milhões (20.000.000) (Nierengarten, 2024). O câncer de mama contribui expressivamente para esses números, uma vez que é o tipo de câncer de maior incidência entre as mulheres. No Brasil, para o triênio 2023-2025, estima-se que surgiram cerca de 73.000 novos casos, o que equivale a 66 casos a cada 100.000 mulheres. (INCA, 2023).

Radioterapia e cirurgia são os principais meios para tratamento de tumores pontuais e localizados. Por outro lado, a quimioterapia baseada em agentes citotóxicos se destaca no manejo clínico de cânceres disseminados pelo organismo, chamados metastáticos. Dentre as alternativas mais recentes para esse fim, pode-se também citar: terapia hormonal, terapia com imunobiológicos e a utilização de células portadoras de antígeno quimérico (*CAR-T cells*). A cirurgia para remoção de tumores é um procedimento invasivo, além de não ser aplicável em diversos tipos de câncer. Os antineoplásicos convencionais utilizados na quimioterapia são pouco seletivos para as células tumorais, o que acarreta em uma elevada citotoxicidade em células e tecidos saudáveis. Com isso, observa-se morte celular em tecidos e órgãos nos quais não há presença de tumores e efeitos colaterais agressivos ao paciente em tratamento (Tanaka et al., 2009).

Estudos em nanotecnologia voltada para a área médica têm apresentado inovações com potencial de uso no diagnóstico e tratamento de doenças. Acerca do câncer, os sistemas de liberação controlada de medicamentos têm se mostrado uma ferramenta promissora da nanotecnologia em aspectos relacionados à qualidade de vida do paciente (Mitchell et al., 2021).

Nanocarreadores biocompatíveis desenvolvidos para vetorização de fármacos vêm se consolidando como instrumento na terapêutica do câncer, com alguns já disponíveis comercialmente e incorporados à prática clínica, a exemplo dos lipossomas carreadores de doxorrubicina (Doxil) e das nanopartículas associadas a albumina e paclitaxel (Abraxane) (Gabizon; De Rosales; La-Beck, 2020). Nanocarreadores são estruturas de dimensões

nanométricas ( $< 1\mu\text{m}$ ) que permitem o direcionamento e liberação controlada da substância que está sendo veiculada (Delgado, 2013).

A aplicação de nanopartículas poliméricas associadas a fármacos antitumorais têm despertado interesse no campo farmacêutico. As propriedades físico-químicas que esses sistemas apresentam favorecem o direcionamento e interação com o tecido de interesse. Nesse contexto, destacam-se as nanocápsulas (NC) e nanoesferas (NS), ambas formadas por material polimérico, mas que se diferem pela presença de um núcleo oleoso no interior das NC (Souto et al., 2012).

O efeito de permeabilidade e retenção aumentadas (EPR) descrito por Matsumura e Maeda (1986) resulta da presença de fenestrações (espaços) entre as células do endotélio vascular dos neovasos sanguíneos (formados de forma desorganizada, denominada neoangiogênese) são mais permeáveis e favorecem a passagem das nanoestruturas do sangue para o espaço extravascular e tumoral. Além disso a drenagem linfática nesses locais é prejudicada. Assim, há uma maior interação das nanopartículas com o tecido tumoral em comparação aos demais tecidos. Esse fenômeno leva ao chamado direcionamento passivo. Ele é observado em grande parte dos tumores malignos que acometem humanos e têm sido um dos princípios norteadores no desenvolvimento nanosistemas para o tratamento de tumores sólidos (Matsumura; Maeda, 1986).

O perfil peculiar de expressão de receptores de membrana das células tumorais tem sido explorado como ferramenta para entrega direcionada de fármacos ao tumor, sendo uma abordagem distinta do direcionamento passivo. Nesse contexto, ligantes são ancorados à superfície das nanopartículas visando a interação ligante-receptor com um receptor específico expresso na membrana das células do tumor. Esse direcionamento ativo permite aprimorar a internalização das nanopartículas e a liberação intracelular da carga de fármaco veiculada (Gabizon; De Rosales; La-Beck, 2020). Além de fármacos, moléculas com propriedades óticas de fluorescência também podem ser associadas a essas estruturas, que por meio de interação com organelas e constituintes das membranas celulares possibilitam aplicabilidade da formulação no diagnóstico e monitoramento da progressão da doença.

A fluorescência no infra-vermelho próximo (NIR) vem sendo largamente aplicada às técnicas de imagem *in vivo*, principalmente devido à baixa absorção e autofluorescência dos tecidos biológicos na faixa do espectro eletromagnético de 700 a 1000 nm, o que garante alta sensibilidade dessas técnicas. Marcadores fluorescentes e fotossensibilizadores com emissão na região do NIR são moléculas que podem ser excitadas em determinado comprimento de onda e

dissipar a energia absorvida na forma de fluorescência, energia térmica e produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). Esses últimos geram radicais tóxicos que levam à morte celular. Desse modo, fotossensibilizadores NIR vêm sendo estudados como agentes promissores para aplicação em terapia fotodinâmica (PDT) e terapia fototérmica (PTT) (Palao-Suay et al., 2017).

A PDT é baseada na aplicação local ou sistêmica de um composto fotossensível (fotossensibilizador) que irá se acumular no tecido de interesse e após ser irradiado com um comprimento de onda adequado levará à geração de oxigênio singleto e tripleto e destruição das células alvo. O mecanismo molecular dessa terapia é embasado na interação de três componentes: o fotossensibilizador, luz no comprimento de onda adequado e átomos de oxigênio dissolvidos nas células (Kwiatkowski et al., 2018).

Nesse contexto, o fotossensibilizador IR-780 vem se mostrando um agente promissor devido à sua tendência de acumular nas mitocôndrias de células tumorais, capacidade de absorção/emissão no NIR, alta intensidade de fluorescência (807-823 nm) e versatilidade para conjugação com outras moléculas. Apesar do potencial do IR-780 como agente teranóstico, fatores como sua solubilidade muito baixa em água e rápida depuração sanguínea inviabilizam a administração direta desse fotossensibilizador. Desse modo, sua associação a nanoestruturas é fundamental para viabilizar seu uso como agente de PDT e para monitoramento por imageamento *in vivo* (Alves et al., 2018).

Em estudos do nosso grupo de pesquisa, nanopartículas de PLA-PEG foram usadas para encapsular IR-780 em várias concentrações. Uma molécula de IR-780 ligada covalentemente ao polímero PLA foi sintetizada por meio de uma reação de cicloadição azida-alcino (De Oliveira et al., 2019). Tal síntese química foi proposta para garantir que o IR-780 fique ligado covalentemente às nanoestruturas, garantindo um rastreamento mais preciso pelas técnicas de imagem. Nos estudos de imageamento *in vivo* (biodistribuição) foi comprovada a influência da ligação química e as vantagens da utilização deste marcador fluorescente conjugado ao polímero (IR-PLA) (Machado et al., 2022). Além do PLA-PEG e do IR-PLA, sintetizados a partir de um polilactídeo modificado, variados polímeros funcionalizados podem ser obtidos a partir da combinação com outras classes de moléculas, como os carboidratos.

Considerando que os análogos de carboidratos são potenciais ligantes de receptores superexpressos em células tumorais, a funcionalização dessas nanocápsulas com carboidratos de baixo peso molecular pode aumentar o direcionamento para os tumores e intensificar os efeitos fotodinâmicos e fototérmicos do IR-PLA, além de fornecer imagens confiáveis de monitoramento da biodistribuição nos sítios alvo (Tekade; Sun, 2017).

Dessa forma, esse trabalho teve como objetivo avaliar a citotoxicidade de nanocápsulas poliméricas funcionalizadas com ligante carboidrato e IR-PLA, em linhagem de células 4T1, após terapia fotodinâmica. Foram testadas nanocápsulas com diferentes densidades de ligante carboidrato e avaliada a capacidade das formulações em promover redução da viabilidade celular, combinadas ou não com irradiação de laser a 808 nm. É um trabalho inovador, com potencial de abrir caminhos para novas abordagens terapêuticas e diagnósticas para o câncer.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 CÂNCER DE MAMA: PANORAMA E DESAFIOS TERAPÊUTICOS

Câncer é a denominação dada a um conjunto de doenças caracterizadas pela proliferação acelerada e irrestrita de células de tecidos epiteliais (carcinomas) ou tecidos conjuntivos (sarcomas). Esse comportamento celular anormal está frequentemente associado à diminuição da capacidade apoptótica, favorecendo a formação de tumores. À medida que o tumor se desenvolve, observa-se a ocorrência da neoangiogênese, processo de formação de novos vasos para irrigação e nutrição da massa tumoral. Eventualmente, fragmentos podem se desprender e, por meio de vasos sanguíneos e linfáticos, disseminar-se para diferentes órgãos, originando novos tumores em um processo denominado metástase (Gabizon et al., 2020; INCA, n.d.; Pérez-Herrero & Fernández-Medarde, 2015).

Em 2022, o número estimado de casos diagnosticados de câncer no mundo foi de 20 milhões (20.000.000). As projeções estatísticas indicam que para o ano de 2050 é esperado um aumento de 77% nesse número, chegando a 35 milhões (35.000.000) de diagnósticos. A respeito dos tipos de câncer mais recorrentes, destacam-se, em ordem decrescente de incidência: câncer de pulmão (12,4%), câncer de mama feminino (11,6%), câncer colorretal (9,6%), câncer de próstata (7,3 %) e câncer de estômago (4,9%). Esses dados representam estatísticas globais, sem distinção por sexo, idade ou região. Quando analisados separadamente por sexo, os dados mostram que o câncer de mama é o mais comumente diagnosticado e o que causa mais mortes na população feminina mundial (Nierengarten, 2024).

Como métodos diagnósticos para a doença cita-se os exames radiográficos, a avaliação clínica, as técnicas analíticas para identificação de biomarcadores, a ultrassonografia, a ressonância magnética e a avaliação citopatológica (biópsia) como técnicas mais difundidas e utilizadas, a depender do tipo e localização do tumor (Ouyang et al., 2022; Thakur & Kutty, 2019). Entretanto, existem limitações inerentes a cada técnica. Os métodos de imagem e biópsia de amostras, por exemplo, são incapazes de indicar com precisão a extensão tecidual significativamente afetada por lesões cancerígenas. No geral, para atingir elevada sensibilidade e precisão, as técnicas citadas demandam equipamentos de grande porte e/ou etapas complexas de pré-processamento (Peng et al., 2020).

Dentre as intervenções mais aplicadas na prática clínica, destacam-se a quimioterapia, radioterapia e remoção cirúrgica, técnicas convencionais empregadas há várias décadas no manejo do câncer. Mais recentemente, alternativas terapêuticas inovadoras estão sendo

desenvolvidas e incorporadas nos sistemas de saúde, a exemplo da imunoterapia, terapia hormonal, quimioterápicos nanoestruturados e células portadoras de antígeno quimérico (*CAR-T cells*). A combinação dessas técnicas é possível em determinadas situações, a depender do tipo de câncer, quadro do paciente, entre outros fatores (Alves et al., 2018; Gabizon; De Rosales; La-Beck, 2020). A tabela 1 traz as principais intervenções terapêuticas e os efeitos colaterais associados a elas.

**Tabela 1:** Principais tratamentos para o câncer e seus efeitos colaterais mais frequentes

| Tipo de tratamento  | Descrição dos efeitos colaterais comuns                                                                                                    | Referência                                                  |
|---------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|
| Quimioterapia       | Náusea e vômito, mucosite, diarreia, constipação, deficiência imunológica/susceptibilidade à infecções, cardiotoxicidade, queda de cabelo. | (Hack et al., 2015; Salata et al., 2021)                    |
| Radioterapia        | Eritema, lesões e queimaduras na pele, linfedema, cardiotoxicidade, inchaço, infecção.                                                     | (Hack et al., 2015; Salata et al., 2021)                    |
| Cirurgia oncológica | Dor, cicatrização complexa, linfedema, hematoma, mobilidade limitada, infecção, trombose.                                                  | (Hack et al., 2015; Jacob et al., 2021; Klein et al., 2021) |
| Imunoterapia        | Dor nas articulações, ossos e músculos, febre, calafrios, sintomas gripais, miocardite, danos neurológicos.                                | (Ertl et al., 2024; Hack et al., 2015)                      |
| Terapias hormonais  | Dor nas articulações, ossos e músculos, dislipidemias, eventos cardiovasculares, osteonecrose.                                             | (Gillesen et al., 2023; Hack et al., 2015)                  |

A remoção cirúrgica e a radioterapia são viáveis em lesões pontuais e não metastáticas, sobretudo tornam-se ineficientes em quadros de cânceres hematológicos ou tumores sólidos com metástase instaurada. Dessa forma, a quimioterapia é o tratamento de escolha em grande parte dos casos de câncer, seja por meio de pequenas moléculas citotóxicas, hormônios, anticorpos ou bioconjugados. Ainda assim, são observadas limitações em relação à seletividade das drogas antineoplásicas pelas células tumorais, o que afeta células saudáveis que possuem alta taxa de proliferação como folículos capilares, medula óssea e células do trato gastrointestinal, levando a efeitos colaterais e à diminuição da qualidade de vida do paciente (Guo et al., 2015; Pérez-Herrero & Fernández-Medarde, 2015; Tanaka et al., 2009). Além da seletividade, fatores físico-químicos e farmacocinéticos das substâncias, como dissolução, solubilidade e biodisponibilidade também determinam a efetividade da terapia (Kumar et al., 2012).

## 2.2 NANOTECNOLOGIA APLICADA AO TRATAMENTO DO CÂNCER

É notável o avanço da nanotecnologia e do desenvolvimento de nanomateriais com propriedades inovadoras para aplicações biológicas (Faria et al., 2018). A interação entre micro e nanoestruturas com sistemas biológicos possui aspectos singulares, o que as destacam como candidatas para abordagens inovadoras no diagnóstico e tratamento de diversas doenças. Ao serem associadas a fármacos e outras moléculas de interesse é possível modular aspectos físico-químicos e farmacocinéticos que, de outra forma, inviabilizariam seu uso, como baixa solubilidade, baixo tempo de meia-vida e incapacidade de transpor barreiras biológicas (Kumar et al., 2012; Nel et al., 2009).

As nanopartículas (NP) podem ser classificadas de diferentes formas, seja levando em conta o material de composição, seu formato, a rota sintética, a complexidade de sua estrutura, entre outros aspectos. De acordo com o material, pode-se classificá-las em NP poliméricas, NP inorgânicas e NP baseadas em lipídios. Dentre as nanopartículas poliméricas, destacam-se polímerosossomos, dendrímeros, micelas poliméricas, nanoesferas (NE) e nanocápsulas (NC) (Mitchell et al., 2021). A Tabela 2 ilustra comparativamente as principais limitações das abordagens tradicionais e as vantagens oferecidas pela nanotecnologia no tratamento do câncer de mama.

**Tabela 2:** Limitações das terapias convencionais e vantagens potenciais da nanotecnologia no tratamento do câncer de mama.

| Aspecto                          |            | Terapias Convencionais (Químio., Radio., Cirurgia)                                                                                                                                                                                  | Nanotecnologia (Nanocápsulas, Nanopartículas, etc.)                                                                                                                                               | Referência                |
|----------------------------------|------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------|
| Especificidade tumoral           |            | Mínima, normalmente a biodistribuição do composto terapêutico é sistêmica, atingindo praticamente todos órgãos e tecidos. Isso faz com que a dose administrada precise ser elevada, para que quantidade suficiente chegue ao tumor. | Aumentada, por meio de fenômenos fisiológicos, como o efeito EPR, ocorre direcionamento passivo e acúmulo das nanoestruturas no tumor. Direcionamento ativo também contribui para especificidade. | (Gupta et al., 2024)      |
| Efeitos sistêmicos               | colaterais | Diversos e agressivos.                                                                                                                                                                                                              | Mínimos.                                                                                                                                                                                          | (Kumar et al., 2012)      |
| Biodisponibilidade de fármaco    | do         | Limitada, a depender das características físico-químicas das moléculas utilizadas.                                                                                                                                                  | Biodisponibilidade prolongada, permitindo abordagens inovadoras. Farmacocinética dependente da estrutura e composição química das nanoestruturas.                                                 | (Kumar et al., 2012)      |
| Resistência tumoral              |            | Resistência à quimioterápicos: alterações nas etapas do ciclo celular, no transporte e metabolismo da droga, reparo de DNA, apoptose.                                                                                               | Permite mecanismos de liberação da droga em locais específicos do interior da célula, contornando mecanismos de resistência.                                                                      | (Long et al., 2024)       |
| Invasividade do tratamento       | do         | Muitas abordagens são invasivas, incômodas e diminuem qualidade de vida do paciente.                                                                                                                                                | Terapias minimamente invasivas, toxicidade reduzida, maior chance de adesão ao tratamento e pouca interferência na rotina do paciente.                                                            | (Mitchell et al., 2021)   |
| Capacidade de imagem/diagnóstico | de         | Limitada, exames complementares externos são necessários.                                                                                                                                                                           | Possibilidade de diagnóstico e terapia simultâneos (teranósticos).                                                                                                                                | (Palao-Suay et al., 2017) |
| Alvo específico                  | molecular  | Receptores de membrana, organelas, núcleo, material genético.                                                                                                                                                                       | Receptores de membrana, organelas, núcleo, material genético.                                                                                                                                     | (Mitchell et al., 2021)   |

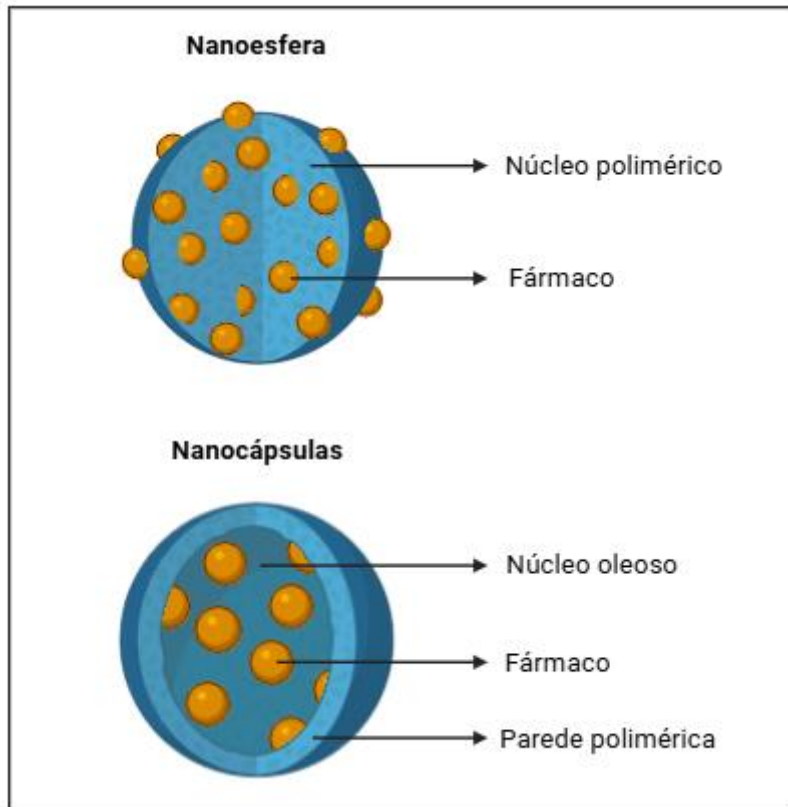
A aplicação dessas estruturas é corroborada pela possibilidade de controlar com precisão suas características durante a síntese, sua flexibilidade para acomodar moléculas hidrofílicas e hidrofóbicas, pela facilidade de modificação/funcionalização da superfície, por sua capacidade em transpor mucosas e outras barreiras biológicas, por sua furtividade do sistema fagocítico mononuclear, controle da liberação, aumento da biodisponibilidade, entre outros fatores. No geral, a versatilidade inerente à essas estruturas para se testar novas combinações de materiais, fármacos e biomoléculas e a aplicação para diferentes doenças, tem despertado grande interesse no campo farmacêutico (Misra; Acharya; Sahoo, 2010; Mosqueira et al., 2001; Shan et al., 2022).

Nanocápsulas poliméricas são estruturas vesiculares compostas por um núcleo oleoso envolto por uma matriz polimérica, descritas pela primeira vez no ano de 1986 (Rollot et al., 1986). Uma gama de polímeros pode ser empregada na formulação de NC, sejam de origem natural ou sintética. Alguns exemplos de polímeros biodegradáveis sintéticos comumente utilizados incluem: polilactídeo (PLA), poli-(lactideo-co-glicosídeo) (PLGA), polianidridos (PA), policaprolactona (PCL) e poli-álquil-cianocrilatos (PACA) (Kumar et al., 2012).

Por ser biocompatível e largamente utilizado para aplicações biomédicas, como próteses e implantes, o PLA é um material com potencial uso na preparação de NC. Fessi e colegas foram os primeiros a formular e descrever NC compostas exclusivamente por PLA, utilizando o método de deposição interfacial de polímero pré-formado. Ao longo das últimas décadas estratégias vêm sendo desenvolvidas para sintetizar formas de PLA mais versáteis, permitindo sua conjugação com agentes de imagem, outros polímeros e ligantes bioativos para direcionamento ativo às células-alvo (de Oliveira et al., 2023).

Polietilenoglicol (PEG) é outro polímero de interesse na preparação de nanopartículas. Sua característica hidrofílica permite incorporar às nanocápsulas propriedades que viabilizam sua aplicação *in vivo* (Mosqueira et al., 2001). Uma vez associado adsorvido ou covalentemente ao PLA, recobrando as partículas, promove uma camada de solvatação que garante um maior tempo de circulação sanguínea, redução da opsonização por proteínas e ativação do sistema complemento, diminuição da taxa de absorção por macrófagos, aumento da permeabilidade e absorção de fármacos por interações particulares com o muco e epitélio intestinal, entre outros efeitos (De Oliveira; Araújo; Mosqueira, 2023). A figura 1 ilustra a estrutura das NE e NC poliméricas.

**Figura 1.** Representação esquemática de nanoesfera e nanocápsula associadas a um fármaco.



Fonte: BioRender

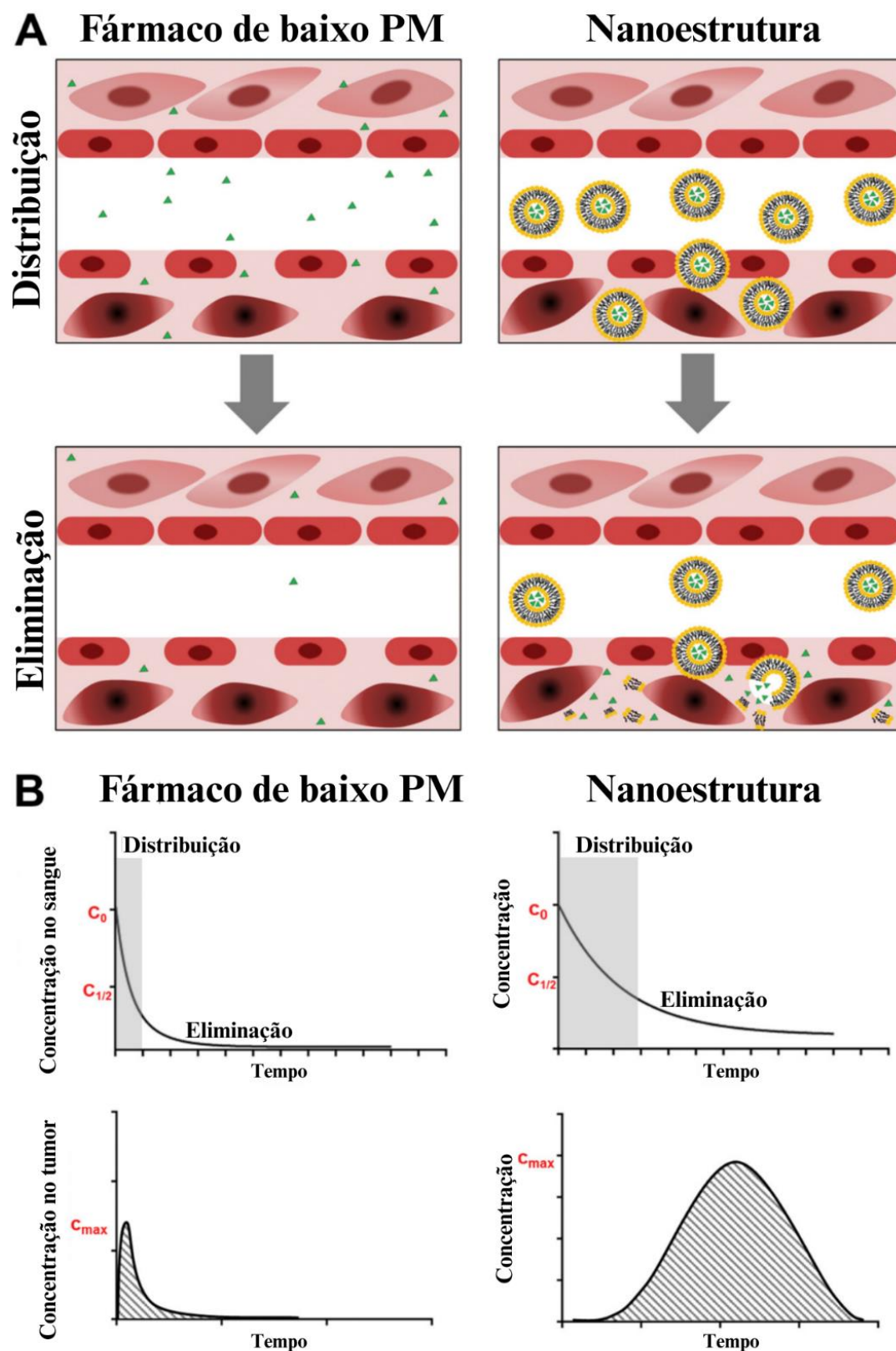
As dimensões das NC variam de 5 a 10 nanômetros (nm) até o limite de 1000 nanômetros. Normalmente, sua síntese visa mantê-las entre 100 nm e 500 nm, sendo o tamanho um fator determinante para o comportamento dessas estruturas (Mora-Huertas et al., 2010; Shan et al., 2022). Alterações fisiológicas resultantes das doenças também são um fator-chave para esse comportamento, uma vez administrada a formulação. Em tumores sólidos, a presença de fenestrações entre células vasculares combinada com a drenagem linfática limitada resulta no chamado Efeito de Permeabilidade e Retenção aumentadas (EPR), descrito por Matsumura e Maeda (Matsumura & Maeda, 1986). Moléculas de baixo peso molecular (PM) extravasam dos vasos sanguíneos com facilidade em tecidos saudáveis, sobretudo, devido ao seu tamanho, as NC não ultrapassam essa barreira. Por outro lado, a presença anormal de fenestrações nos vasos que irrigam os tumores possibilita a passagem de partículas com algumas centenas de nanômetros (Golombek et al., 2018).

O efeito EPR é o principal fenômeno que norteia a aplicação de nanoestruturas no tratamento de câncer. O chamado direcionamento passivo das partículas para o tecido tumoral acontece principalmente devido às fenestrações abundantes e à drenagem linfática reduzida na

neovasculatura (Tsvetkova et al., 2017). O perfil peculiar de expressão de receptores também é explorado para otimizar o direcionamento e internalização nesta população celular.

A figura 2 ilustra esse fenômeno: na parte superior da imagem (A) estão representadas as fases farmacocinéticas de Distribuição e Eliminação de moléculas de baixo PM comparativamente às nanopartículas. Observa-se que a distribuição de pequenas moléculas atinge tecidos saudáveis e tumorais, sem seletividade, sendo em seguida eliminadas rapidamente. As nanopartículas apresentam seletividade para tecido tumoral via fenestrações entre células do endotélio vascular e eliminação retardada devido a propriedades físico-químicas e de superfície. Na parte inferior da imagem (B), estão as representações gráficas desses comportamentos em termos de concentração do fármaco no sangue e no tumor ao longo do tempo. A concentração máxima de fármaco no tumor é obtida por meio de sua combinação com nanoestruturas, marcando a capacidade dessas de proteger o fármaco frente metabolização e prolongar sua liberação no organismo.

**Figura 4.** Quimioterapia convencional com agentes de baixo PM versus terapia com nanoestrutura baseada no efeito EPR.



Fonte: Adaptado (Golombek et al., 2018)

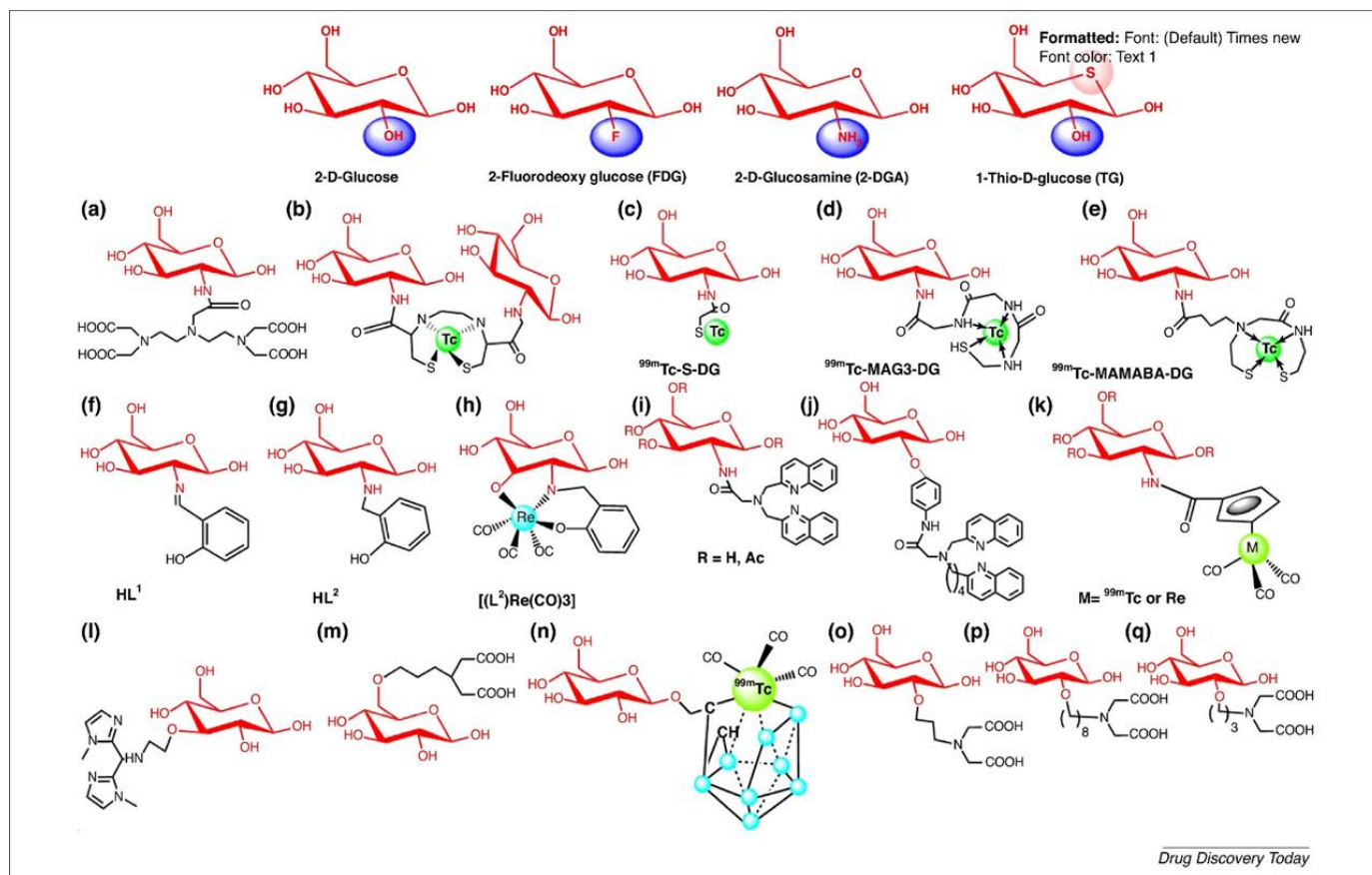
### 2.3 ESTRATÉGIAS DE DIRECIONAMENTO ATIVO PARA CÉLULAS TUMORAIS

O direcionamento ativo se baseia no uso de ligantes ou moléculas que, uma vez ancorados na superfície das NC, podem reconhecer e se ligar de forma específica à marcadores, receptores ou proteínas de membrana das células alvo (Gupta et al., 2024). Essa abordagem promove aumento da seletividade para células tumorais e permite atingir alvos intracelulares, como organelas e estruturas envolvidas com o ciclo celular, pois após o reconhecimento ligante-receptor as nanocápsulas são internalizadas por endocitose (Gabizon; De Rosales; La-Beck, 2020). Diversos tipos de ligantes podem ser utilizados nessa estratégia. Alguns exemplos são peptídeos, anticorpos, aptâmeros e pequenas moléculas como carboidratos e açúcares.

Visando sustentar as altas taxas de proliferação, as células tumorais sofrem modificações em seu metabolismo, passando a consumir mais nutrientes para suprir a demanda energética aumentada. Estima-se que a conversão de glicose em lactato, sob condições aeróbicas, é até 10 vezes maior em cânceres do que em tecidos saudáveis (Koppenol et al., 2011). Além disso, também se observa a mudança da fosforilação oxidativa mitocondrial para via glicolítica glicose-dependente como principal rota metabólica para geração de energia, resultando em uma maior taxa de captação de moléculas de glicose, fenômeno conhecido como efeito Warburg (Racker, E., 1972). Inúmeras pesquisas se baseiam nesse fenômeno e nos efeitos decorrentes dele para projetar e sintetizar moléculas e nanoestruturas inovadoras, algumas ilustradas pela figura 3 (Bayly et al., 2004; Chen et al., 2006; Dwarakarnath; Jain, 2009; Ferreira et al., 2006; Sogbein et al., 2005).

Para garantir o aporte necessário de glicose, as células neoplásicas passam a superexpressar transportadores de glicose na membrana celular, com destaque para o GLUT1, superexpresso em diversos tipos de tumores. Nesse contexto, a superexpressão de GLUTs é um alvo promissor para o desenvolvimento de agentes teranósticos para o câncer (Tekade & Sun, 2017). A denominação agente teranóstico diz respeito a uma formulação passível de aplicação simultaneamente no diagnóstico e no tratamento da doença. A versatilidade das NC vem consolidando-as como um desses agentes, podendo denominá-las nanoteranóstico, quando formuladas para esse fim (Andreou et al., 2017; Gupta et al., 2024). Para o câncer, essa combinação exige moléculas com ação citotóxica e que permitam um rastreo por meio de alguma técnica de imagem. Existem moléculas que possuem ambas características como é o caso do marcador fluorescente IR-780.

**Figura 7.** Glicose e alguns análogos biosimilares sintetizados visando interações ligante-receptor.

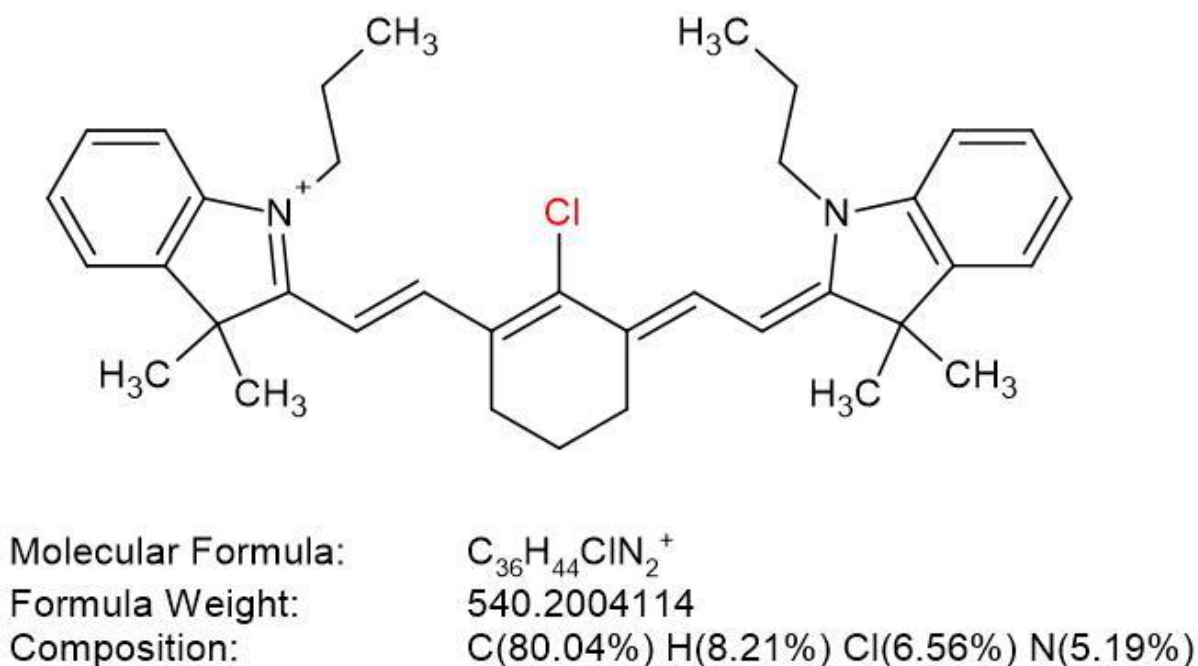


Fonte: (Tekade & Sun, 2017)

## 2.4 IR-780 APLICADO AO CÂNCER: PROPRIEDADES, MECANISMOS E POTENCIAL TERAPÊUTICO

IR-780 é uma cianina lipofílica com pico de absorção em 780 nm capaz de se acumular seletivamente em células tumorais. Exibe propriedades ópticas no infravermelho próximo e atividade tumoricida em cânceres com resistência a farmacoterapias convencionais (Alves et al., 2018; Bazylińska et al., 2014; Yi et al., 2016). Essas propriedades corroboram a aplicação dessa sonda em técnicas de imageamento molecular na faixa do infravermelho próximo, terapia fotodinâmica (PDT) e terapia fototérmica (PTT). A figura 4 ilustra a estrutura do fotossensibilizador em sua forma de base livre, sem a presença do contra-íon iodeto.

**Figura 10.** Estrutura química da sonda IR-780 na forma de base livre.



Fonte: ChemSketch

Uma extensa revisão sobre esse fotossensibilizador e suas aplicações foi publicada recentemente por nosso grupo de pesquisa (Fialho et al., 2025). A utilização do IR-780 como agente teranóstico é justificada por suas propriedades fotofísicas, principalmente o brilho molecular, entendido como a capacidade de uma entidade química emitir fótons em resposta à excitação por luz em determinado comprimento de onda. Apesar do enorme potencial do IR-780, fatores como sua baixa solubilidade em água, toxicidade aguda e rápida depuração sanguínea inviabilizam a administração desse fotossensibilizador em meio aquoso. Por outro lado, sua lipofilia facilita a incorporação em NP formadas por polímeros hidrofóbicos, como PLA, PLGA e mPEG-PLA, sendo essa associação fundamental para aprimorar o potencial terapêutico e diagnóstico desse agente em técnicas de imageamento molecular (Alves et al., 2018; Fialho et al., 2025).

Zhang e colaboradores (2014) compararam o comportamento do IR-780 frente a modelos celulares tumorais e não tumorais por meio da coloração com MitoTracker Red (coloração de mitocôndrias) e comprovaram sua afinidade pelas mitocôndrias de células tumorais. Os efeitos terapêuticos dos sistemas de vetorização são aprimorados quando uma concentração suficiente do fotossensibilizador atinge as mitocôndrias tumorais, nesse sentido,

formulações que promovam uma liberação dentro das mitocôndrias são de grande relevância (Tan, Y., 2019).

Se baseando nessa afinidade característica do fotossensibilizador, Wang e colaboradores (2020) desenvolveram nanoesferas compostas por PLGA incorporadas com IR-780 e glicose oxidase, visando penetração em tumores sólidos, acúmulo nas mitocôndrias e atuação sinérgica da fototerapia e atuação enzimática. Por meio de modelo *in vitro* 3D e reconstrução *in vivo* da massa tumoral, foi constatada a capacidade de penetração profunda das nanoesferas mediada pela propriedade lipofílica e catiônica do IR-780, além da afinidade inerente por mitocôndrias. A fototerapia foi eficiente na geração de ROS e a catálise enzimática promoveu redução no suprimento energético das células tumorais, levando a desordem metabólica e morte celular (Wang et al., 2020).

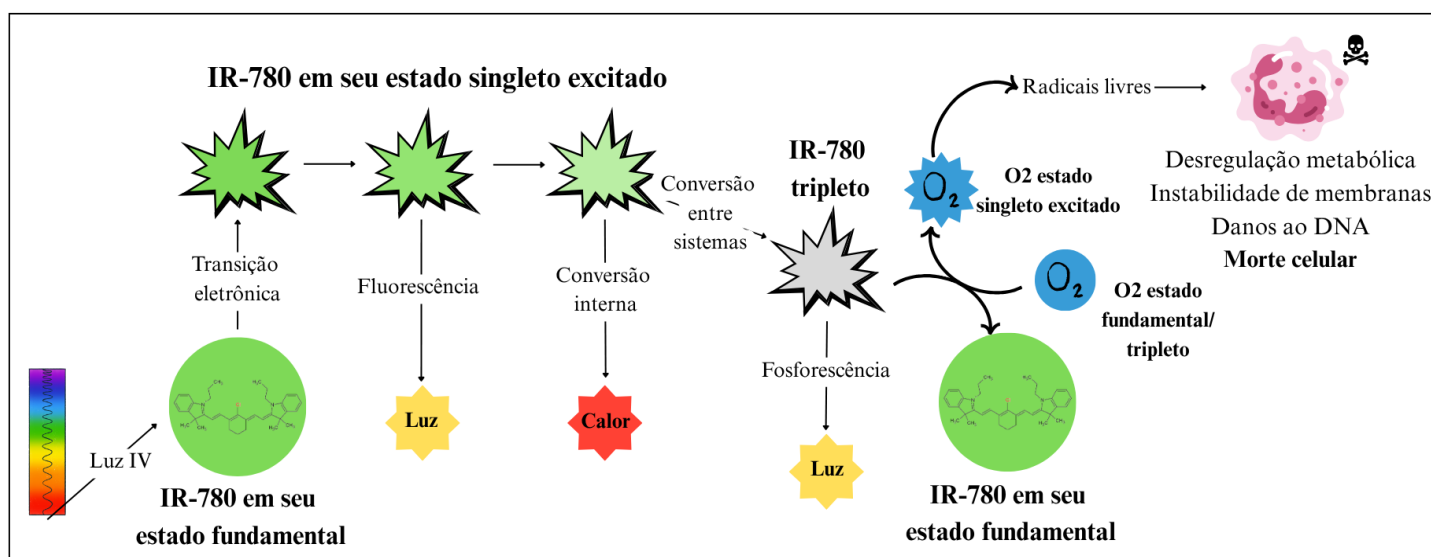
Combinando IR-780 e a biomolécula transferrina em uma nanoplataforma multifuncional, pesquisadores testaram uma associação de duas terapias, PDT e PTT. As nanopartículas automontadas apresentaram boa distribuição de tamanho, fotoestabilidade, acúmulo no tumor e eficiência na geração de ROS sob irradiação, destacando o potencial de direcionamento e capacidade teranóstica da formulação. Após injeção intravenosa em camundongos portadores de tumor CT26 constatou-se taxas de absorção celular e supressão tumoral expressiva, marcadas pela manutenção do tamanho da massa tumoral, que aumentou menos de 5% ao longo de 16 dias nos camundongos tratados com nanopartículas e irradiação de laser (Wang et al., 2016).

Em outros estudos do nosso grupo, nanopartículas de PLA-PEG foram usadas para encapsular IR-780 em diferentes concentrações. Uma molécula de IR-780 ligada covalentemente ao polímero PLA foi sintetizada por meio de uma reação de cicloadição azida-alcino (de Oliveira et al., 2019). A marcação estável obtida com esta conjugação polímero-sonda, associada às nanopartículas, promoveu maior retenção do fluoróforo nos sistemas poliméricos (NC e NE). A obtenção desse conjugado foi um resultado disruptivo. Pela primeira vez o fotossensibilizador foi ligado covalentemente por meio de estratégias da química click, de forma termodinamicamente favorável e com rendimento de reação considerável. Além disso, foi a primeira descrição da ligação entre o IR-780 e um polímero da classe dos poliésteres biodegradáveis (de Oliveira, 2019).

## 2.5 TERAPIA FOTODINÂMICA: FUNDAMENTOS E APLICAÇÕES

A terapia fotodinâmica (PDT) baseia-se na aplicação local ou sistêmica de um composto fotossensível (fotossensitizador), que se acumula no tecido de interesse, e após ser irradiado com um comprimento de onda adequado, leva à destruição das células-alvo. O mecanismo molecular dessa terapia, ilustrado pela figura 5, é embasado na interação de três componentes: o fotossensitizador, luz no comprimento de onda adequado e átomos de oxigênio dissolvidos nas células. A absorção de fótons leva o fotossensitizador a passar do estado fundamental de energia singleto  $S^0$  para o estado excitado singleto  $S^1$ . Após a excitação, parte da energia absorvida é irradiada na forma de fluorescência, parte na forma de energia térmica, e por meio de conversão intersistema, a sonda atinge seu estado excitado tripleto  $T^1$ , que é a forma terapêutica, capaz de transferir energia ao oxigênio e às biomoléculas do ambiente celular levando à formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e radicais livres (Kwiatkowski et al., 2018; Palao-Suay et al., 2017).

**Figura 11.** Diagrama de Jablonski adaptado: representação esquemática do mecanismo de fototoxicidade estimulado pela PTD.



Fonte: Adaptado de (Kwiatkowski et al., 2018) e (Fialho et al., 2025).

Machado e colaboradores avaliaram formulações com o fotossensitizador na forma livre, encapsulado fisicamente ou conjugado ao polímero em duas linhagens de células de câncer de mama humano (MCF-7 e MDA-MB-231). O IR-780 livre induziu mais citotoxicidade que o IR-780 ligado covalentemente ao polímero, após a irradiação do laser. Sobretudo é

importante ressaltar a manutenção da atividade do agente fotossensibilizador mesmo após sua conjugação com o polímero, sendo capaz de produzir ROS após a aplicação do laser (Machado, M. G.C., 2021).

A morte celular provocada por PDT pode resultar de vias metabólicas distintas, de acordo com a região/organelas mais comprometidas. A via apoptótica (programada) ocorre quando o fotossensibilizador utilizado se acumula nas mitocôndrias. Danos às membranas celulares e a perda de integridade desencadeiam na via necrótica (desordenada). O acúmulo da sonda no retículo endoplasmático e nos lisossomos pode estimular a via autofágica (Allison & Moghissi, 2013).

Um fator crucial para a eficiência da PDT é a concentração de oxigênio no meio intracelular (Castano et al., 2005). A promoção do estresse oxidativo em grande extensão apenas é possível quando o oxigênio está presente em quantidades consideráveis, uma vez que ele é um agente intermediário da cascata de interações que levará à fototoxicidade. A depleção de oxigênio durante a terapia, levando algumas vezes à quadros de hipóxia tumoral, é um fenômeno amplamente descrito pela literatura (Allison & Moghissi, 2013; Kwiatkowski et al., 2018; Tromberg et al., 1990).

## 2.6 MODELO DE CULTIVO DE LINHAGEM TUMORAL DE MAMA (4T1) NA AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE ANTITUMORAL *IN VITRO*

Tumores de mama cujas células não expressam receptor alfa de estrogênio (RE $\alpha$ ), receptor de progesterona (RP) e fator de crescimento epidermal 2 (HER2) são caracterizados como triplo negativos e se apresentam de forma mais agressiva, com piores prognósticos e expectativa de vida para as portadoras, quando comparados com tumores não triplo negativos. (Waks, A.G, 2019; Pal, S.K, 2011). A linhagem de adenocarcinoma de mama murino 4T1 tem se mostrado um bom modelo celular para estudos preliminares sobre o câncer de mama, principalmente por serem também do tipo triplo negativo, pela sua similaridade fenotípica, de comportamento agressivo e de perfil metastático humano (Silva et al., 2016; Tao et al., 2008). De maneira análoga ao câncer de mama humano, as células 4T1 se desenvolvem e se espalham espontaneamente a partir do tumor inicial, por meio da drenagem linfática, atingindo linfonodos e outros órgãos do animal (Pulaski; Ostrand-Rosenberg, 2000).

Relativamente ao metabolismo, Simões e colaboradores compararam duas linhagens celulares e suas adaptações em resposta a diferentes ambientes extracelulares: 4T1 (altamente

metastática) e 67NR (não metastática). Foi constatado um maior fluxo do ciclo glicolítico e do ciclo do ácido cítrico na linhagem 4T1, além da capacidade de troca repentina entre glicólise e fosforilação oxidativa como via para obtenção de energia. O estudo indica que os pontos de metástase formados pelas células 4T1 são mais aptos a ajustar seu metabolismo frente ao estresse do ambiente extracelular. Também sugere que a plasticidade e adaptação metabólica são mais importantes no fenótipo metastático de câncer de mama do que a proliferação celular em si (Simões et al., 2015).

O perfil bioenergético das células muda continuamente durante a tumorigênese, a depender da localização, da disponibilidade de glicose, do tamanho do tumor, da interação com o meio extracelular e da taxa de crescimento. Nesse sentido, é descrito pela literatura o modo como condições de hipóxia ativam genes responsáveis pela expressão de enzimas glicolíticas e de transportadores de membrana GLUT1 e GLUT3 (Jose; Bellance; Rossignol, 2011). Como citado anteriormente neste trabalho, a endocitose mediada por GLUT é um alvo no desenvolvimento de sistemas teranósticos funcionalizados com ligantes.

Chen e colaboradores avaliaram a interação de células 4T1 com lipossomas decorados com glicosídeos derivados da planta Ginseng, *Panax ginseng* C.A. Meye, os quais apresentaram bons perfis de circulação, direcionamento ativo e elevada citotoxicidade. Foi conduzido um estudo de *docking* molecular que avaliou as interações intermoleculares entre a porção do glicosídeo composta pela glicose e o transportador, em diferentes estados conformacionais. Todos os ginsenosídeos (glicosídeos do Ginseng) testados apresentaram alta afinidade pelo transportador de membrana GLUT1 e foi constatado que a internalização dos lipossomas pelas células ocorreu quase que exclusivamente por essa via (Chen et al., 2022).

No contexto da terapia fotodinâmica, a linhagem 4T1 vem sendo amplamente utilizada como plataforma para estudos de agentes terapêuticos inovadores, capazes de promover citotoxicidade após irradiação por luz (Dehariya et al., 2025; Lu et al., 2022; Mohammadpour; Fekrazad, 2016; Palao-Suay et al., 2017; Veloso et al., 2017).

Para avaliação da viabilidade celular após os tratamentos, grande parte dos estudos realizam o ensaio do vermelho neutro, reagente capaz de se acumular no lisossomo de células viáveis, permitindo mensurar de forma aproximada a quantidade de células que sofreram morte celular após o tratamento com as formulações e a fototerapia (Borenfreund; Puerner, 1985). Por ser um ensaio relativamente simples, reprodutível e vastamente difundido na literatura, optou-se por sua utilização neste trabalho.

### 3 JUSTIFICATIVA

Embora a tecnologia tenha levado a avanços significativos no campo da quimioterapia para o tratamento de tumores, incluindo imunoterapia, fototerapia e terapia gênica, é importante observar que o câncer continua sendo a principal causa de mortalidade globalmente. No cenário brasileiro, dados epidemiológicos mostram que os diferentes tipos de câncer se distribuem de forma não homogênea pelo território, variando conforme fatores genéticos, demográficos e socioeconômicos. Dentre os mais recorrentes, destaca-se o câncer de mama como principal causa de morte na população feminina brasileira (Cruz et al., 2023).

Para além das abordagens terapêuticas, o diagnóstico preciso do câncer de mama também é crucial no manejo clínico da doença, tanto na detecção inicial quanto no acompanhamento da evolução dos tumores, uma vez iniciado o tratamento. Os métodos diagnósticos mais difundidos atualmente permitem detectar tumores sólidos a partir de determinado tamanho, sobretudo apresentam limitações no que diz respeito a precisão e sensibilidade, além de envolverem etapas onerosas e complexas de pré e pós processamento (Peng et al., 2020).

Com isso em vista, este trabalho tem como foco o desenvolvimento de nanocápsulas funcionalizadas para a associação do IR-PLA, uma molécula inovadora com potencial no diagnóstico e terapia de tumores. Dada a experiência do nosso laboratório em sintetizar polímeros e desenvolver formulações variadas de nanocarreadores, como nanocápsulas e nanoesferas poliméricas capazes de transportar diferentes fármacos e marcadores fluorescentes, em trabalhos recentes o IR-780 foi ligado covalentemente ao PLA e utilizado tanto no tratamento quanto no diagnóstico do câncer (De Oliveira et al., 2019).

Busca-se verificar se as nanocápsulas funcionalizadas por ligação covalente de ligante carboidrato apresentam maior eficácia antitumoral na terapia fotodinâmica *in vitro* em comparação com nanocápsulas sem adição dos ligantes. Além disso, visa alcançar resultados satisfatórios para a estabilidade físico-química do novo sistema desenvolvido.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver formulações de nanopartículas poliméricas contendo o polímero-sonda IR-PLA e avaliar a atividade fotodinâmica em testes *in vitro*, comparando o efeito da introdução do ligante e suas concentrações sobre o efeito citotóxico em modelo celular de tumor murino.

### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Preparar nanocápsulas sem ligante de superfície e com ligante em diferentes proporções, contendo IR-PLA, pelo método de nanoprecipitação;
- Caracterizar as nanocápsulas quanto ao tamanho hidrodinâmico e potencial zeta;
- Avaliar a atividade fotodinâmica das nanocápsulas frente células de câncer de mama murino (4T1) utilizando a técnica de vermelho neutro;
- Estudar o efeito da densidade de ligante de superfície sobre a viabilidade celular após exposição à irradiação a laser.
- Analisar os dados estatisticamente.

## 5 MATERIAIS

### 5.1 REAGENTES

- Copolímeros em bloco poly(D,L-lactide)-block-polyethylene glycol (PEG5k-PLA20k, Mn 22,200 g/mol, Ð 1.38) sintetizado no laboratório;
- Polímero poly(D,L)lactide (PLA20k) sintetizado no laboratório;
- Polímero IR-PLA sintetizado no laboratório;
- Polímero PLA-LIG sintetizado no laboratório;
- Miglyol® 810N, PIC, São Paulo;
- IR-780 (2-[2-[2-chloro-3-[(1,3-dihydro-3,3-dimethyl-1-propyl-2H-indol-2-ylidene)ethylidene]-1-cyclohexen-1-yl]ethenyl]-3,3-dimethyl-1-propylindolium iodide, 98%);
- Água Ultrapura (Equipamento Symplicity 185 de Purificação de Água-MilliQ);
- Cloreto de Sódio (NaCl), Synth, São Paulo;
- Acetona, LiChrosolv®, USA;
- Lipoid S75, Lipoid®, Alemanha;
- Reagente vermelho neutro (cloreto de 2-amino-3metil-7-dimetil-amino-fenazônio);

### 5.2 EQUIPAMENTOS

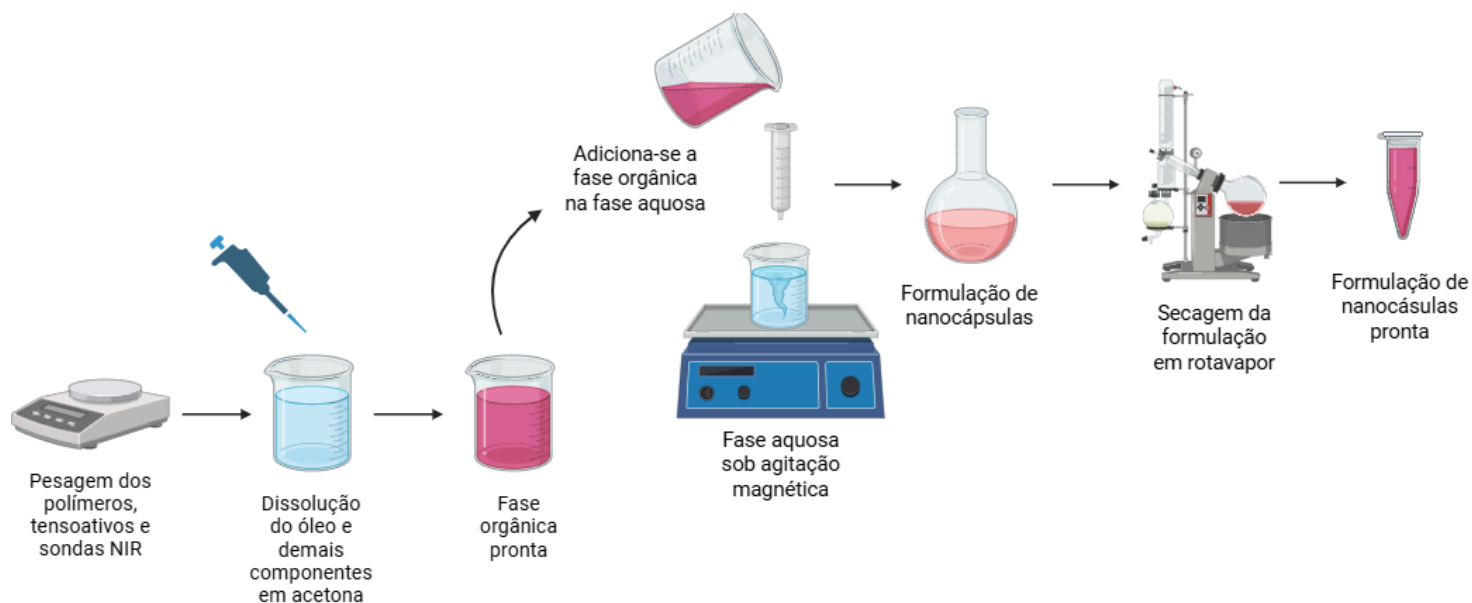
- Rotaevaporador (Buchi R-3, Switzerland);
- Zetasizer Nanoseries Nano-ZS (Malvern Instrument, UK);
- Leitor de microplacas Infinite 200 Pro (TECAN, Switzerland);
- Incubadora de CO2 (Thermo Fischer Scientific, USA);
- Sonda laser de 808 nm (Therapy EC Laser Equipment, DMC Equipment, Brasil)

## 6 MÉTODOS

### 6.1 PREPARO DE NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS

As NC foram preparadas por meio do método de nanoprecipitação, também chamado de deposição interfacial de polímero pré-formado (Fessi et al.1989). Foram preparadas nanocápsulas contendo o IR-780 associado covalentemente ao PLA (IR-PLA) com e sem ligante localizado à superfície e nanocápsulas brancas, constituídas dos polímeros mPEG-b-PLA e PLA. Para isso, foram diluídos em acetona o material polimérico, o conjugado polímero-sonda (exceto para NC branca), Lipoid® S75 e Miglyol® sob aquecimento de 40 °C (fase orgânica). Em seguida, a fase orgânica foi vertida em água ultrapura por meio de uma seringa, e a mistura obtida mantida em agitação por 10 minutos, conforme esquema da figura 6. Após esse tempo, o material foi submetido a evaporação rotativa (Rotavapor R3, Buchi) a 35 °C para que o solvente e parte da água evaporassem até um volume final de 2 mL. Os componentes utilizados para cada formulação estão elucidados na Tabela 3.

**Figura 12:** Representação esquemática do processo de preparação das nanocápsulas.



Fonte: BioRender

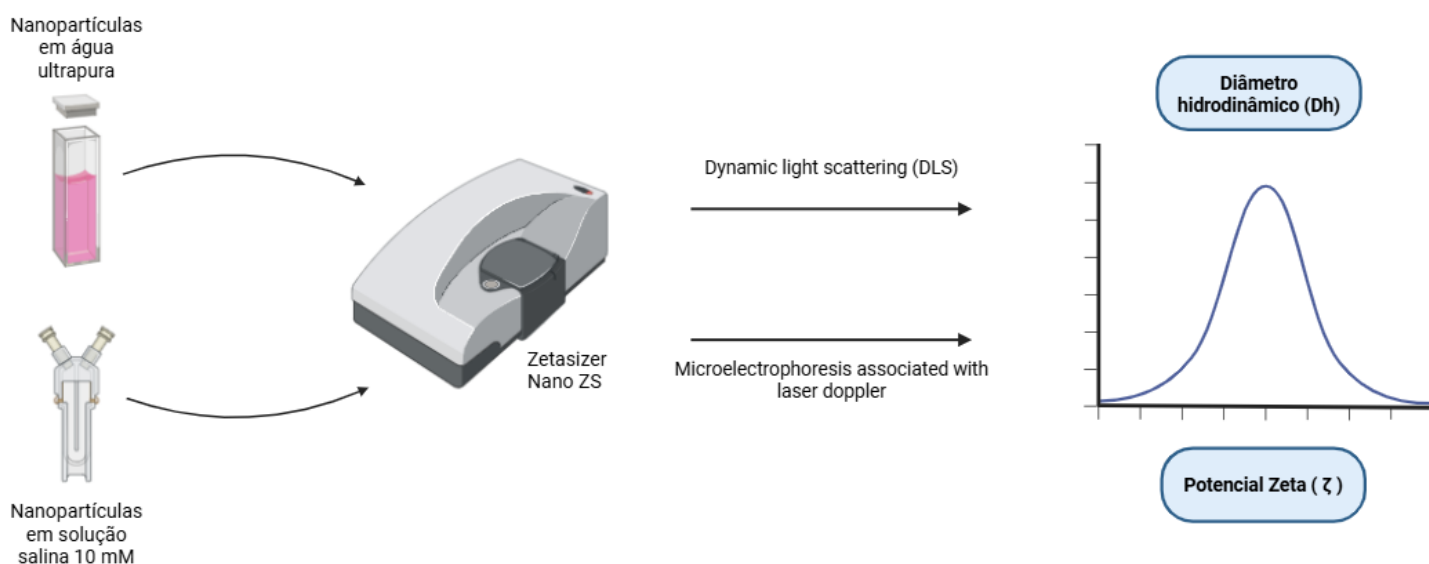
**Tabela 3:** Componentes das formulações de nanocápsulas (NC) poliméricas Branca, IR-PLA, IR-PLA-LIG 1X, IR-PLA-LIG 3X e IR-PLA-LIG 5X.

| Componentes                           | NC Branca | NC IR-PLA | NC IR-PLA-LIG<br>1X | NC IR-PLA-LIG<br>3X | NC IR-PLA-LIG<br>5X |
|---------------------------------------|-----------|-----------|---------------------|---------------------|---------------------|
| PLA <sub>20k</sub> -PEG <sub>5k</sub> | 12 mg     | 12mg      | 12mg                | 12mg                | 12mg                |
| PLA <sub>20k</sub>                    | 13,6 mg   | 12,5 mg   | 10,0 mg             | 5,0 mg              | -                   |
| PLA-IR                                | -         | 1,1 mg    | 1,1 mg              | 1,1 mg              | 1,1 mg              |
| PLA-LIG                               | -         | -         | 2,5mg               | 7,5mg               | 12,5mg              |
| Lipoid®S75                            | 15mg      | 15mg      | 15mg                | 15mg                | 15mg                |
| Miglyol®810N                          | 50µL      | 50µL      | 50µL                | 50µL                | 50µL                |
| Acetona                               | 4mL       | 4mL       | 4mL                 | 4mL                 | 4mL                 |
| Água                                  | 8mL       | 8mL       | 8mL                 | 8mL                 | 8mL                 |

## 6.2 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS

A caracterização físico-química foi avaliada em termos de tamanho hidrodinâmico ( $D_h$ ), potencial zeta ( $\zeta$ ) e índice de polidispersão ( $\mathfrak{D}$ ). Para determinar o tamanho médio, 5  $\mu\text{L}$  da formulação foram diluídos com 1000  $\mu\text{L}$  de água ultrapura em uma cubeta de vidro. O método de dispersão dinâmica de luz (DLS, do inglês *dynamic light scattering*), com um ângulo de detecção de retroespalhamento de  $173^\circ$  foi usado para medir o tamanho médio e o índice de polidispersão. O potencial zeta foi medido pela microeletroforese associada ao laser doppler utilizando cubetas específicas a partir da diluição de 5  $\mu\text{L}$  da formulação em 1000  $\mu\text{L}$  de NaCl 1 mM. Todos os procedimentos foram realizados em triplicata e o equipamento utilizado foi o Zetasizer Nanoseries Nano-ZS (Malvern Instrument, UK), conforme ilustrado pela figura 7.

**Figura 13:** Caracterização das nanocápsulas.



Fonte: BioRender

O tamanho das partículas, representado pelo diâmetro hidrodinâmico médio, foi obtido por meio da técnica de espalhamento dinâmico de luz, também chamada de espectroscopia de correlação de fótons, que consiste em incidir um feixe de luz na amostra contendo as partículas em solução e medir o quanto esse feixe é espalhado ao interagir com as partículas. O espalhamento da luz está diretamente relacionado com a taxa de difusão ou movimento browniano das partículas no fluido. Entende-se por difusão o transporte de massas de moléculas individuais por uma barreira ou espaço livre, que ocorre segundo um processo aleatório, e que depende de um gradiente de concentração (Netz, P.A.; González-Ortega, G, 2002). Partindo da

medição desse parâmetro e tendo conhecimento da temperatura da amostra e da viscosidade do diluente, foi possível calcular o tamanho das partículas por meio da equação de Stokes-Einstein, exemplificada a seguir.

$$D = \frac{K_B T}{6\pi\eta r}$$

Em que D é o coeficiente de difusão,  $K_B$  é a constante de Boltzmann, T é a temperatura,  $\eta$  é a viscosidade do diluente e r é o raio equivalente das partículas. Por meio dessa medida é possível avaliar o grau de agregação e de sedimentação das NC, fatores importantes para determinar sua viabilidade de aplicação para o fim proposto e também informar sobre a estabilidade das formulações ao longo do tempo (Carvalho et al., 2018; Schaffazick et al., 2003).

O índice de polidispersão (PDI), ou apenas dispersão ( $\mathfrak{D}$ ), é uma medida de heterogeneidade do tamanho das partículas em suspensão, ou seja, mensura se as partículas possuem diâmetros em uma faixa estreita de tamanho ou se existem partículas de tamanhos muito variados na amostra. É uma medida adimensional, obtida por tratamentos matemáticos a partir do espalhamento dinâmico de luz. Para uma amostra totalmente uniforme/monodispersa o valor de PDI é 0.0 (Malvern Panalytical, 2025.).

O potencial zeta ( $\zeta$ ) é o parâmetro que mede a carga da partícula coloidal. Ele foi obtido por meio da técnica de microeletroforese associada ao laser doppler. Trata-se da medida da carga efetiva, determinada pelo balanço de íons e contra-íons em solução ao redor da partícula, em uma dada distância de sua superfície. A figura 8 ilustra onde é medido o potencial zeta de uma partícula. A equação para o cálculo do potencial zeta é a seguinte:

$$\zeta = \frac{4\pi\eta}{\varepsilon E}$$

Em que  $\varepsilon$  é a constante dielétrica, E é o campo magnético aplicado na partícula e  $\eta$  é a viscosidade do diluente (Heusch, 2000). Essa variável está no cerne do entendimento da estabilidade de coloides, cujas bases foram propostas por Derjaguin, Landau, Verwey e Overbeek (teoria de DLVO).

The diagram illustrates a cross-section of a cell membrane. The interior of the cell is represented by a light blue area containing yellow circles with minus signs (-). The exterior is a light green area containing red circles with plus signs (+) and blue circles with minus signs (-). The membrane itself is a thin layer separating these two regions. Three horizontal lines with arrows indicate potential distributions: the top line is labeled 'Zeta-potential', the middle line is labeled 'Stern-potential', and the bottom line is labeled 'Surface-potential'.

A teoria explica que a interação das partículas depende de dois tipos de energias: repulsão e atração e que o comportamento de duas partículas é determinado pela força resultante que deriva da interação dessas duas energias (Netz, P.A.; González-Ortega, G, 2002). A figura 9 ilustra graficamente essa interação.

Diagrama de energia potencial ( $E$ ) versus distância ( $r$ ) para a interação entre duas moléculas. O eixo vertical representa a energia ( $E$ ) com sinais positivos (+) e negativos (-). O eixo horizontal representa a distância ( $r$ ). A curva 'Repulsão' é positiva e decrescente. A curva 'Atração' é negativa e crescente. A curva 'Resultante' é a soma das duas, mostrando um 'Máximo primário de repulsão' e um 'Mínimo secundário de atração'. O ponto de equilíbrio está no zero da energia, marcado como 'A' e '0'.

37

### 6.3 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DAS FORMULAÇÕES

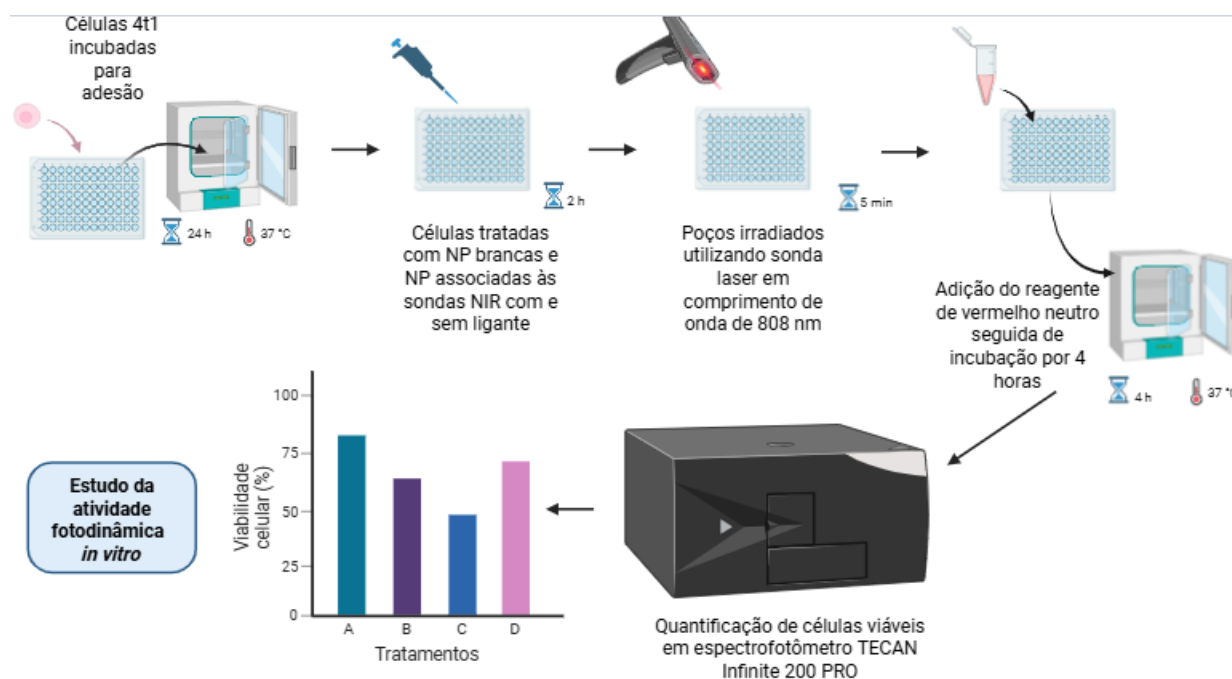
Foram avaliados ao longo de 90 dias o tamanho e potencial zeta das formulações, a fim de verificar alterações destes parâmetros em função do tempo. As leituras foram realizadas no equipamento Zetasizer Nanoseries Nano-ZS (Malvern Instrument, UK) e as formulações armazenadas em geladeira a uma temperatura de  $4,0 \pm 0,5$  °C.

### 6.4 ESTUDO DA CITOTOXICIDADE E FOTOTOXICIDADE DO IR-PLA ASSOCIADO ÀS NANOCÁPSULAS FUNCIONALIZADAS FRENTE ÀS CÉLULAS DE TUMOR DE MAMA MURINO 4T1

Células 4T1 ( $6,0 \times 10^3$  /poço) foram semeadas em placas de 96 poços e incubadas a 37°C em uma atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> para fixação. Após 24 horas, o meio foi removido e as células tratadas com 200 µL de cada tratamento, previamente diluído em meio de cultivo DMEM sem vermelho de fenol, pelo período de 4 horas: meio (controle), NC brancas, nanocápsulas contendo IR-PLA com e sem ligante. Utilizando uma sonda a laser de 808 nm (W/cm<sup>2</sup>) (Therapy EC Laser Equipment, DMC Equipment, Brasil) todos os poços foram irradiados por 4,5 minutos com laser. As concentrações utilizadas para o tratamento foram determinadas em estudo piloto. Os tratamentos foram realizados em triplicata e em dois experimentos independentes (n = 6).

Após 24 horas da irradiação, a viabilidade celular foi avaliada utilizando o método do vermelho neutro (cloreto de 2-amino-3metil-7-dimetil-amino-fenazônio), reagente que se acumula no lisossomo de células viáveis por endocitose. A espectrofotometria foi realizada no comprimento de onda de 540 nm, comprimento no qual o reagente apresenta absorção ótima. Comparando a porcentagem de células vivas após irradiação com células controle não irradiadas, que foram consideradas com 100% de viabilidade, a viabilidade após terapia fotodinâmica foi calculada. As células viáveis foram quantificadas por espectrofotômetro por varredura de múltiplos poços (Leitor de Elisa - Infinite 200 Pro TECAN, Switzerland), conforme ilustrado pela figura 10.

**Figura 10:** Fluxograma das etapas realizadas na Terapia Fotodinâmica.



Fonte: BioRender

## 6.5 ANÁLISE DE DADOS

Os cálculos e as análises estatísticas foram realizados com auxílio do Microsoft Excel® 2010 e GraphPad Prism® versão 6.0.

## 7 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 7.1 PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS

As NC foram caracterizadas de acordo com o tamanho, índice de polidispersão e potencial zeta. Uma vez realizada a leitura desses três parâmetros em triplicata, os dados obtidos foram adicionados ao software Excel e tratados em termos de média aritmética e desvio padrão relativo, gerando os resultados da tabela 4.

**Tabela 4:** Caracterização físico-química das nanocápsulas poliméricas.

| Nanocápsula                    | NC Branca | NC IR-PLA | NC IR-PLA-LIG 1X | NC IR-PLA-LIG 3X | NC IR-PLA-LIG 5X |
|--------------------------------|-----------|-----------|------------------|------------------|------------------|
| <b>D<sub>h</sub> (nm) ± DP</b> | 134,6±0,7 | 130,2±0,7 | 137,0±0,9        | 131,6±0,6        | 133±1,2          |
| <b>Dispersão (Đ)</b>           | 0,162     | 0,148     | 0,144            | 0,147            | 0,153            |
| <b>ζ (mV) ± DP</b>             | -36,1±0,4 | -37,5±2,5 | -33,8±0,7        | -33,4±1,7        | -33,8±0,7        |

Dh: Diâmetro hidrodinâmico; ζ: Potencial Zeta; DP: desvio padrão (n=3).

Para o tamanho, representado pelo diâmetro hidrodinâmico médio, as NC variaram entre 130,2 e 137,0 nm, faixa de cerca de 7 nm entre a menor e a maior medição. Apresentaram índice de polidispersão em torno de 0,150 e potencial zeta variando entre -37,5 mV e -33,4 mV, com desvio padrão consideravelmente baixo para todas as medidas. A representação gráfica das distribuições dessas medições é apresentada na figura 11.

Os dados revelam uma homogeneidade considerável entre NC de uma mesma formulação e entre NC das diferentes formulações quando comparadas. Tratando os dados de modo a englobar todas as formulações em um único cálculo de média e desvio padrão para esses parâmetros, essa homogeneidade fica mais evidente.

**Tabela 5:** Média e desvio padrão englobando todas medições de Dh e  $\zeta$ .

| <b>Nanocápsula</b>                                 | <b>Todas formulações</b> |
|----------------------------------------------------|--------------------------|
| <b>D<sub>h</sub> (nm) <math>\pm</math> DP</b>      | 133,3 $\pm$ 2,6          |
| <b>Dispersão (<math>\Theta</math>)</b>             | 0,151                    |
| <b><math>\zeta</math> (mV) <math>\pm</math> DP</b> | -34,9 $\pm$ 2,1          |

A faixa de tamanho das formulações é adequada para a aplicação proposta, visto que nanopartículas entre 100 nm e 200 nm tendem a interagir com o ambiente tumoral de forma mais expressiva (Alves et al., 2018). Em um estudo com camundongos, após administração intravenosa o tempo de circulação sanguínea entre duas formulações de NC foram comparadas: uma de abordagem convencional, sem recobrimento por PEG, denominada PCL-NC com tamanho médio de 259 nm e outra denominada PLA-PEG-NC, com tamanho médio de 159 nm. A formulação PLA-PEG-NC apresentou uma exposição corporal do ativo encapsulado 16 vezes maior. A presença do PEG e o tamanho das NC são fatores determinantes desse comportamento (Branquinho et al., 2020).

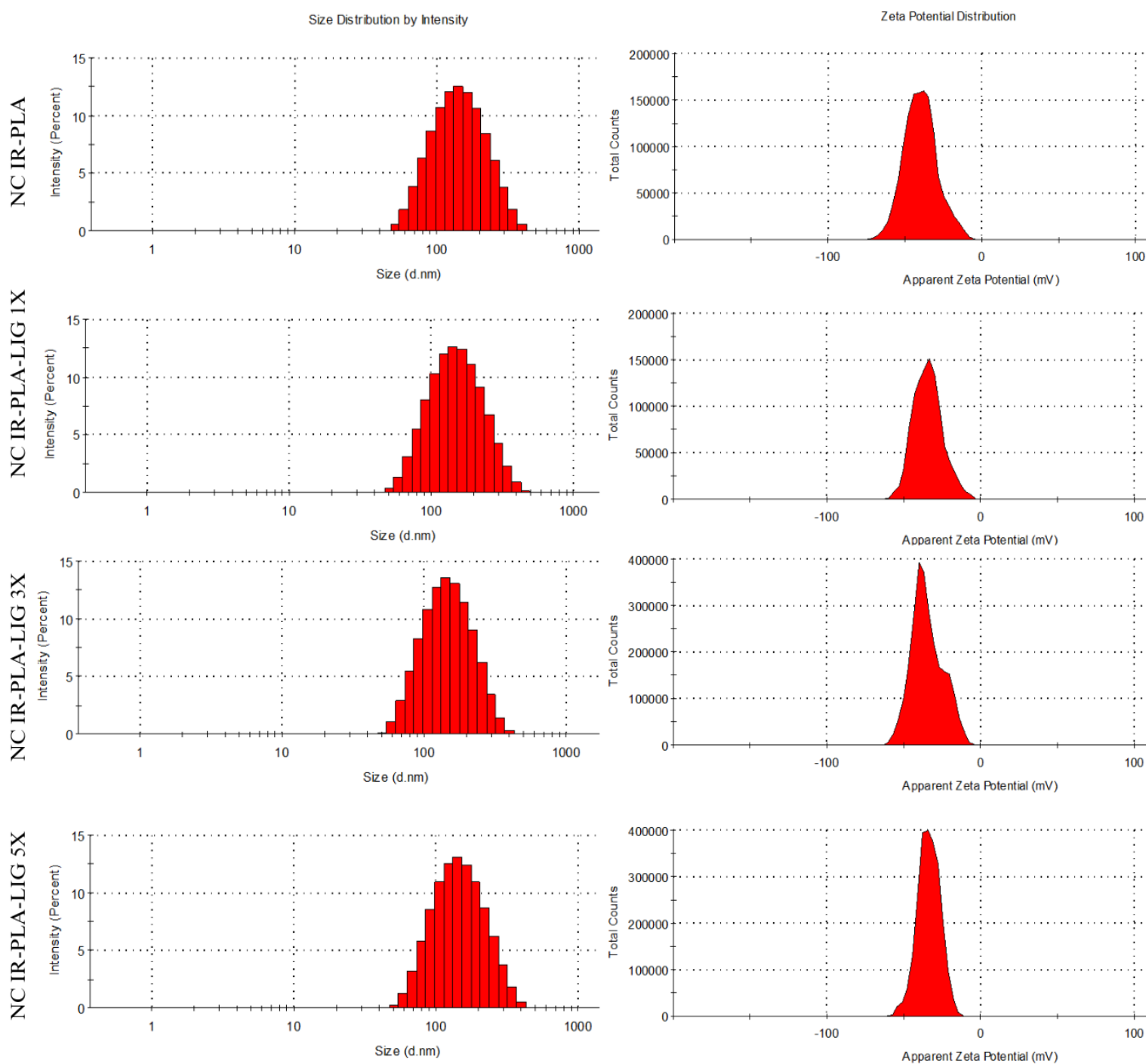
Em relação ao potencial zeta, é descrito na literatura que formulações com valores de potencial superiores a 30 mV em módulo apresentam estabilidade física e que partículas com carga efetiva negativa possuem repulsão entre si, promovendo estabilidade coloidal para o sistema (Dos Santos et al., 2012). Além disso, NC compostas por PLA-PEG são estabilizadas simultaneamente por efeitos estéricos e eletrostáticos (Oliveira et al., 2017).

Os valores de potencial zeta negativo obtidos neste estudo são tipicamente observados em sistemas coloidais contendo PLA e lecitina, sobretudo outros componentes da formulação influenciam na carga efetiva observada, em maior ou menor grau. A lecitina de soja incorpora na formulação moléculas de ácido fosfatídico, derivado de fosfolípidos, cujos grupamentos aniônicos se encontram negativamente carregados à superfície das partículas. Esse componente está presente em todas as formulações visto que faz parte da composição do reagente Lipoid®S75 (Mosqueira et al., 2001). A coroa formada pelas cadeias de PEG reduzem o potencial zeta em módulo, mas não mascaram por completo as cargas negativas dos componentes principais (Oliveira et al., 2017).

No geral, os dados sobre a caracterização das NC sugerem que sua síntese foi realizada de forma adequada, seguindo as etapas de preparação com rigor e reprodutibilidade entre as

formulações. É importante observar que o aumento da proporção de ligante carboidrato na formulação não alterou significativamente os parâmetros físico-químicos avaliados.

**Figura 15:** Representação gráfica das distribuições de Tamanho e Potencial Zeta das formulações



Fonte: Zetasizer Nanoseries Nano-ZS Software (Malvern Instrument, UK)

## 7.2 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DAS FORMULAÇÕES

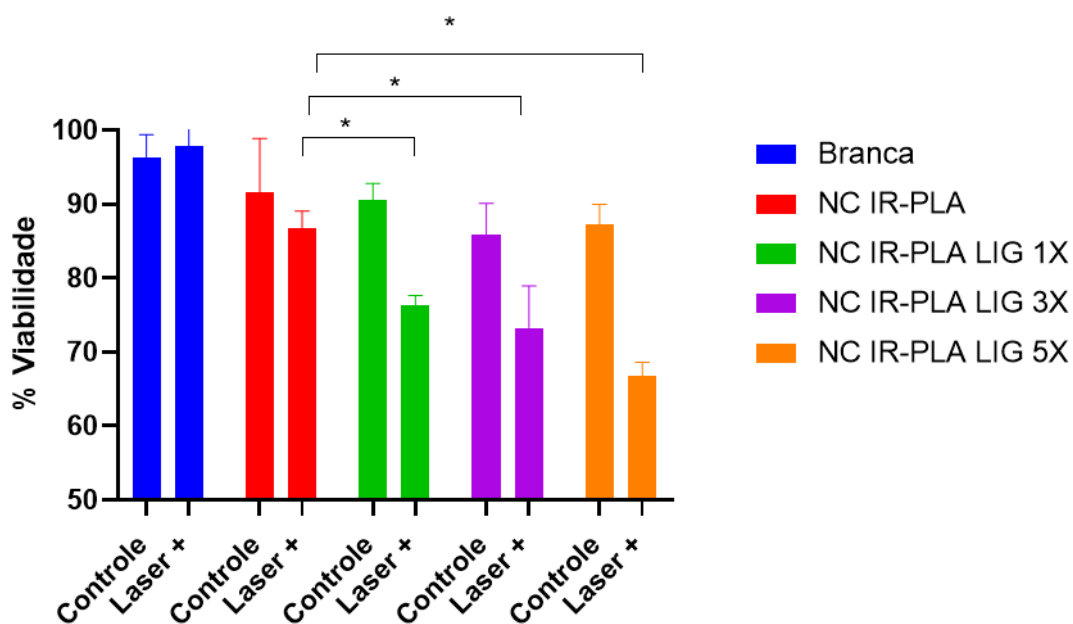
A estabilidade das NC branca e com ligante de superfície foi avaliada durante 90 dias em estudo prévio do nosso grupo, não apresentando variações estatísticas significativas de tamanho e potencial zeta nesse período (Fialho, 2023).

## 7.3 ESTUDO DA CITOTOXICIDADE E FOTOTOXICIDADE DO IR-PLA ASSOCIADO ÀS NANOCÁPSULAS FUNCIONALIZADAS FRENTE ÀS CÉLULAS DE TUMOR DE MAMA MURINO 4T1

O estudo da citotoxicidade promovida pela terapia fotodinâmica foi realizado com base na porcentagem de células viáveis nos poços tratados em comparação com poços não tratados, chamados poços controles. O reagente vermelho neutro é internalizado e tinge os vacúolos das células vivas que o incorporam. À medida que as células morrem tendem a perder essa capacidade de incorporação do corante, sendo assim possível associar a quantidade de luz absorvida, que é proporcional ao total de corante internalizado, à quantidade de células vivas em cultura (Repetto; Del Peso; Zurita, 2008).

Nesse experimento, para além de constatar a citotoxicidade e fototoxicidade das NC, buscou-se observar como as diferentes proporções ou densidades de ligante de superfície influenciam na redução de viabilidade celular. As formulações foram preparadas de modo que a massa do polímero PLA-LIG aumentasse linearmente, obtendo-se densidades de 1X (2,5 mg de PLA-LIG), 3X (7,5 mg de PLA-LIG) e 5X (12,5 mg de PLA-LIG), de onde convencionou-se o nome de cada formulação, enquanto a massa de IR-PLA foi a mesma para todas formulações. Desse modo, diferenças nas viabilidades podem ser atribuídas apenas à proporção de ligante carboidrato. Foi realizada a comparação entre as viabilidades de células tratadas com as formulações sem irradiação e com irradiação de laser, conforme representado no gráfico da figura 12. Os asteriscos indicam diferença estatisticamente significativa entre os resultados.

**Figura 16:** Gráfico comparativo da viabilidade celular de células 4T1 resultante de cada tratamento, sem laser (Controle) e com laser (Laser +).



As diferenças estatísticas foram determinadas comparando os dados por meio do teste estatístico ANOVA;  $p < 0,05$  para as comparações marcadas com asterisco (\*).

Fonte: GraphPad Prism® versão 6.0

A partir deste gráfico pode-se observar que todas as formulações exerceram alguma citotoxicidade frente as células 4T1. Para NC Branca a redução da viabilidade celular foi mínima, não podendo afirmar sua real capacidade citotóxica devido ao desvio padrão englobar o valor de 100% de viabilidade para o tratamento com laser e muito próximo disso para o tratamento sem laser. Para NC IR-PLA nota-se uma redução considerável após irradiação do laser, chegando próximo de 86% de viabilidade celular nesse caso. Para as três formulações com ligante na composição, houve redução estatisticamente significativa da viabilidade celular, com valores variando de 85% a 90% para os tratamentos sem irradiação. Ao comparar células irradiadas e não irradiadas tratadas com a mesma formulação IR-PLA-LIG, nota-se diminuição expressiva da viabilidade após laser, com reduções que variam entre 15% a 25%. A viabilidade celular mínima obtida no experimento foi observada em células tratadas com a formulação com maior densidade de ligante (NC-IR-PLA 5X) combinada com a PDT. Nesse caso a viabilidade foi 65%, com desvio padrão baixo.

Ao avaliar os dados de forma global, observa-se um comportamento interessante: há uma tendência de diminuição da viabilidade celular conforme se aumenta a proporção de ligante e realiza-se a terapia fotodinâmica. Outro ponto relevante é a potencialização da citotoxicidade

promovida pela ativação do fotossensibilizador com o laser. Pode-se inferir que a presença do ligante de superfície potencializa a fotocitotoxicidade por possibilitar o aumento da carga intracelular de IR-PLA no momento da irradiação com o laser.

A inferência da maior internalização das NC é fruto dos resultados de viabilidade celular obtidos. Sobretudo não é possível afirmar essa interação, nem mesmo a forma como as partículas adentraram as células, visto que os testes realizados se concentraram em determinar a capacidade citotóxica das formulações e a efetividade da terapia fotodinâmica em ampliar essa capacidade. Estudos mecanísticos para esclarecer essas questões são necessários. O entendimento da interação ligante-receptor, a nível conformacional, e dos mecanismos de internalização é fundamental para desenvolvimento e otimização de sistemas nanoteranósticos. Para esse fim, técnicas *in silico* como o *docking* molecular e técnicas ópticas como a citometria de fluxo podem agregar aos resultados aqui obtidos. O advento da inteligência artificial/*machine learning* combinados com essas e outras metodologias permitirão a produção e tratamento de enormes quantidades de dados, de modo a consolidar o conhecimento a respeito das interações na interface nano-biológica.

Um fator central para o sucesso da PDT é a presença de oxigênio dissolvido no meio intracelular, visto que essa molécula é um dos intermediários na cascata de transferência de energia iniciada pela fotoativação do polímero-sonda. Com isso, supõe-se que para células em condição de hipóxia a efetividade da terapia pode diminuir drasticamente, de modo que a viabilidade celular se mantenha em valores similares aos apresentados antes da irradiação. A utilização de cultura de células aderentes, cultivadas e estudadas na forma de monocamadas, é excepcional para estudos toxicológicos, determinação de viabilidade celular e concentração inibitória mínima, por exemplo. Sobretudo, para compreender o modo como a hipóxia de determinados grupos celulares pode afetar a PDT, modelos baseados em culturas de células 3D, também chamados esferoides, se mostram mais adequados. Neles há maior semelhança com tecidos tumorais *in vivo*. Além de apresentarem um gradiente de concentração de oxigênio da superfície para o interior, permitem avaliar a capacidade das NC em se infiltrar nas camadas de células mais profundas dos aglomerados celulares.

Outros estudos se basearam no IR-780 como agente indutor de fototoxicidade por geração de calor, ROS e estresse oxidativo. As abordagens e combinações de materiais utilizados para preparação das nanoestruturas são diversas, sobretudo é possível perceber algumas similaridades e convergências como ilustra a tabela 6.

**Tabela 6:** Outros estudos que utilizaram IR-780

| Tipo de nanoestrutura    | Nome das nanoestruturas | Atuação do IR-780                                                                                                                     | Outros componentes citotóxicos | Resultados                                                                                                                                                                                                                                                                 | Ref.                 |
|--------------------------|-------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------|
| Nanomicela polimérica    | (IR780/DOX)@P TK        | Efeito fotodinâmico e fototérmico;<br>Promoção de rompimento da nanomicela via geração de ROS;<br>Biodistribuição <i>in vivo</i> ;    | Doxorrubicina                  | (IR780/DOX)@PTK exibiu toxicidade sistêmica desprezível; Acúmulo no tumor comprovado por fluorescência; Houveram efeitos fotodinâmicos e fototérmicos, geração de ROS e rompimento da nanoestrutura; Viabilidade celular de 17% em células 4T1, após irradiação com laser. | (Wang et al., 2019)  |
| Nanopartícula polimérica | IR-HPN e IR/DOX-HPN     | Avaliar capacidade de distribuição das partículas em culturas de células 3D; Agente fototerapêutico em culturas 2D e 3D (esferoides). | Doxorrubicina                  | IR-HPN não induziu citotoxicidade em esferoides; IR/DOX-HPN reduziu viabilidade celular em esferoides para 54%; IR/DOX-HPN combinado com irradiação de laser levou a 34% de viabilidade.                                                                                   | (Alves et al., 2019) |
| Nanopartícula polimérica | IR780/PTX/FH SV         | Performance fototérmica;<br>Performance fotodinâmica;<br>Direcionamento à mitocôndrias;<br>Biodistribuição <i>in vivo</i> ;           | Paclitaxel                     | Houve aumento na temperatura provocada por IR780/PTX/FHSV após laser de maneira concentração-dependente, chegando a 25,8°C de aumento; Afinidade por mitocôndrias foi confirmada; Houve geração de ROS após irradiação;                                                    | (Yang et al., 2021)  |

Para esses três estudos, observa-se que a capacidade fototerapêutica da sonda normalmente é o fator central para sua escolha em estudos para o câncer. Ainda assim, outras propriedades como fluorescência, afinidade por mitocôndrias e promoção de perturbação do ambiente químico também podem corroborar para sua aplicação, levando à citotoxicidade por mecanismos diversos e tornando a terapêutica mais robusta. Outro ponto a observar é a compatibilidade com polímeros distintos, o que traz versatilidade e torna possível testar combinações para formulações inovadoras.

Se tratando da perturbação do ambiente intracelular, diferentes mecanismos de morte celular podem ser induzidos nesse processo, como apoptose, necrose e piroptose. Piroptose trata-se de uma via bioquímica de resposta inflamatória e ativação do sistema imune contra a célula-alvo, levando a inchaço celular e formação de poros na membrana que culminam em sua eliminação. Esse fenômeno pode ser induzido pelo IR-780 após fotoativação, conforme demonstrado por Yang e colaboradores (Yang et al., 2023). Neste mesmo estudo foi constatada a afinidade da sonda por mitocôndrias e a promoção de ROS intracelular. Em cultura de células 4T1, a citotoxicidade da nanopartícula IR780-ZnS@HSA levou a viabilidade de aproximadamente 30% quando combinada com laser.

Com estes exemplos nota-se a vasta possibilidade de aplicações do IR-780, bem como do polímero-sonda IR-PLA, cujas propriedades, em grande parte, derivam do fluoróforo. Ainda que o foco do trabalho seja a indução de citotoxicidade por um mecanismo específico, a terapia fotodinâmica, é possível e provável que interações secundárias ocorram simultaneamente e integrem as múltiplas vias bioquímicas que resultaram nas porcentagens de viabilidade celular obtidas. Reitera-se que para estudar essas interações são necessários novos estudos, com abordagens metodológicas voltadas para os mecanismos e fenômenos ainda não esclarecidos.

As formulações desenvolvidas neste trabalho partem da capacidade fotossensível e citotóxica do IR-PLA para promover a redução de viabilidade celular observada. De modo a potencializar o efeito buscado, trabalhos futuros poderão combinar fármacos antineoplásicos à plataforma nanoteranóstica apresentada, a exemplo da estratégia adotada nos estudos citados na tabela 6. Fármacos que potencializem a geração de ROS suprindo o ambiente com moléculas de oxigênio ou estruturas oxigenadas também podem ser testados em combinação com a PDT.

## 8 CONCLUSÃO

Foram desenvolvidas formulações de nanocápsulas poliméricas, pelo método de nanoprecipitação, compostas por PLA-PEG, conjugadas covalentemente com marcador fluorescente e ligante carboidrato. As nanoestruturas apresentaram tamanho na faixa de 130,2 nm a 137 nm, potencial zeta em torno de -35 mV e índice de polidispersão inferior a 0,3, indicando homogeneidade na distribuição de tamanhos. Esses resultados refletem estabilidade físico-química e reprodutibilidade no processo de produção das partículas.

O estudo de viabilidade celular em linhagem 4T1 foi conduzido e mostrou a capacidade citotóxica das formulações IR-PLA, IR-PLA-LIG 1X, IR-PLA-LIG 3X, IR-PLA-LIG 5X, principalmente após realização da terapia fotodinâmica. As porcentagens de viabilidade após tratamento variaram de 90% a 65% entre as formulações, sendo que a redução mais expressiva foi alcançada nas células tratadas com a formulação de maior densidade de ligante, IR-PLA-LIG 5X, após irradiação com laser. Há indícios de uma correlação entre aumento da densidade de ligantes e diminuição da viabilidade celular.

A comparação entre células não irradiadas e células irradiadas por laser torna evidente a capacidade da terapia fotodinâmica em intensificar a citotoxicidade, levando a uma viabilidade celular até 25% menor em relação ao grupo da mesma formulação, mas sem laser.

Dessa forma, este estudo atingiu os objetivos propostos e seus resultados corroboram o uso de nanocápsulas poliméricas para aplicações nanoteranósticas. O direcionamento ativo promovido por ligante carboidrato é uma ferramenta promissora nessas aplicações, bem como o polímero-sonda IR-PLA, que permite um aprisionamento do fotossensibilizador no sistema polimérico com manutenção da capacidade fotocitotóxica do mesmo.

## 9 REFERÊNCIAS

ALVES, Cátia G. *et al.* **IR780 based nanomaterials for cancer imaging and photothermal, photodynamic and combinatorial therapies.** *International Journal of Pharmaceutics* Elsevier B.V., , 5 maio 2018.

BAYLY, Simon R. *et al.* Carbohydrate conjugates for molecular imaging and radiotherapy: <sup>99m</sup>Tc(I) and <sup>186</sup>Re(I) tricarbonyl complexes of N-(2'-hydrobenzyl)-2-amino-2-deoxy-D-glucose. *Bioconjugate Chemistry*, v. 15, n. 4, p. 923–926, 2004.

BORENFREUND, Ellen; PUERNER, James A. A simple quantitative procedure using monolayer cultures for cytotoxicity assays (HTD/NR-90). *Journal of Tissue Culture Methods*, v. 9, n. 1, p. 7–9, mar. 1985.

BRANQUINHO, Renata Tupinambá *et al.* Lychnopholide in poly(D,L-lactide)-block-polyethylene glycol nanocapsules cures infection with a drug-resistant *Trypanosoma cruzi* strain at acute and chronic phases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 64, n. 4, 2020.

CARVALHO, Patrícia M. *et al.* Application of light scattering techniques to nanoparticle characterization and development. *Frontiers in Chemistry*, v. 6, p. 386753, 1 jun. 2018.

CHEN, Chen *et al.* Effect of the structure of ginsenosides on the in vivo fate of their liposomes. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 17, n. 2, p. 219–229, 1 mar. 2022.

CHEN, Yue *et al.* Synthesis and evaluation of a technetium-99m-labeled diethylenetriaminepentaacetate–deoxyglucose complex ([<sup>99m</sup>Tc]–DTPA–DG) as a potential imaging modality for tumors. *Applied Radiation and Isotopes*, v. 64, n. 3, p. 342–347, 1 mar. 2006.

CRUZ, Izadora Lima da *et al.* Câncer de Mama em mulheres no Brasil: epidemiologia, fisiopatologia, diagnóstico e tratamento: uma revisão narrativa. *Brazilian Journal of Development*, v. 9, n. 2, p. 7579–7589, 15 fev. 2023.

DE OLIVEIRA, Maria Alice; ARAÚJO, Raquel Silva; MOSQUEIRA, Vanessa Carla Furtado. PEGylated and functionalized polylactide-based nanocapsules: An overview. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 636, 5 abr. 2023.

DEHARIYA, Dheeraj *et al.* Gold nanocages co-assembled with *Spinacia oleracea* extract combined photothermal/photodynamic therapy in 4T1 breast cancer cell line. *Biomedical Materials*, v. 20, n. 2, p. 025014, 1 mar. 2025.

DOS SANTOS, Guilherme Soares *et al.* Desenvolvimento e caracterização de nanopartículas lipídicas destinadas à aplicação tópica de dapsona. **Química Nova**, v. 35, n. 7, p. 1388–1394, 2012.

DWARAKARNATH, B. S.; JAIN, Viney. Targeting glucose metabolism with 2-deoxy-D-glucose for improving cancer therapy. **Future Oncology**, v. 5, n. 5, p. 581–585, 2009.

ERTL, Carolin *et al.* The side effect registry immuno-oncology (SERIO) – A tool for systematic analysis of immunotherapy-induced side effects. **European Journal of Cancer**, v. 199, p. 113505, 1 mar. 2024.

FERREIRA, Cara L. *et al.* Glucosamine conjugates of tricarbonylcyclopentadienyl rhenium(I) and technetium(I) cores. **Inorganic Chemistry**, v. 45, n. 17, p. 6979–6987, 21 ago. 2006.

FIALHO, Márcia Célia Pacheco *et al.* IR780-Based Nanotheranostics and In Vivo Effects: A Review. **Journal of Nanotheranostics 2025, Vol. 6, Page 8**, v. 6, n. 1, p. 8, 7 mar. 2025.

GABIZON, Alberto A.; DE ROSALES, Rafael T. M.; LA-BECK, Ninh M. **Translational considerations in nanomedicine: The oncology perspective. Advanced Drug Delivery Reviews** Elsevier B.V., , 1 jan. 2020.

GILLESSEN, Silke *et al.* Management of Patients with Advanced Prostate Cancer. Part I: Intermediate-/High-risk and Locally Advanced Disease, Biochemical Relapse, and Side Effects of Hormonal Treatment: Report of the Advanced Prostate Cancer Consensus Conference 2022. **European Urology**, v. 83, n. 3, p. 267–293, 1 mar. 2023.

GUPTA, Deepshikha *et al.* Recent nanotheranostic approaches in cancer research. **Clinical and Experimental Medicine 2024 24:1**, v. 24, n. 1, p. 1–30, 19 jan. 2024.

HACK, C. C. *et al.* Local and Systemic Therapies for Breast Cancer Patients: Reducing Short-term Symptoms with the Methods of Integrative Medicine. **Geburtshilfe und Frauenheilkunde**, v. 75, n. 7, p. 675–682, 1 jul. 2015.

HEUSCH, Rudolf. Emulsions. **Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry**, 15 jun. 2000.

JACOB, Tamar *et al.* Risk Reduction Recommendations for Upper Quadrant Side Effects After Breast Cancer Surgery and Treatments: A Delphi Survey to Evaluate Consensus Among Expert Physical Therapists and Alignment With Current Evidence. **Rehabilitation Oncology**, v. 39, n. 4, p. E106–E118, out. 2021.

JOSE, Caroline; BELLANCE, Nadège; ROSSIGNOL, Rodrigue. Choosing between glycolysis and oxidative phosphorylation: A tumor's dilemma? **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics**, v. 1807, n. 6, p. 552–561, 1 jun. 2011.

KLEIN, Ifat *et al.* A pilot study evaluating the effect of early physical therapy on pain and disabilities after breast cancer surgery: Prospective randomized control trail. **Breast**, v. 59, p. 286–293, 1 out. 2021.

KUMAR, Sandeep *et al.* **Nanotechnology as Emerging Tool for Enhancing Solubility of Poorly Water-Soluble Drugs**. **BioNanoScience**, nov. 2012.

KWIATKOWSKI, Stanisław *et al.* **Photodynamic therapy – mechanisms, photosensitizers and combinations**. **Biomedicine and Pharmacotherapy** Elsevier Masson SAS, , 1 out. 2018.

LONG, Feng *et al.* The role of lncRNA NEAT1 in human cancer chemoresistance. **Cancer Cell International**, v. 24, n. 1, p. 1–13, 1 dez. 2024.

LU, Ziyao *et al.* Dual-Activated Nano-Prodrug for Chemo-Photodynamic Combination Therapy of Breast Cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 24, p. 15656, 1 dez. 2022.

MACHADO, Marina Guimarães Carvalho *et al.* Photodynamic therapy with the dual-mode association of IR780 to PEG-PLA nanocapsules and the effects on human breast cancer cells. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 145, 1 jan. 2022.

MATSUMURA, Y.; MAEDA, H. A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumorotropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. **Cancer Research**, 1986.

MISRA, Ranjita; ACHARYA, Sarbari; SAHOO, Sanjeeb K. **Cancer nanotechnology: Application of nanotechnology in cancer therapy**. **Drug Discovery Today**, out. 2010.

MITCHELL, Michael J. *et al.* **Engineering precision nanoparticles for drug delivery**. **Nature Reviews Drug Discovery** Nature Research, , 1 fev. 2021.

MOHAMMADPOUR, Hemn; FEKRAZAD, Reza. Antitumor effect of combined Dkk-3 and 5-ALA mediated photodynamic therapy in breast cancer cell's colony. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 14, p. 200–203, 1 jun. 2016.

MOSQUEIRA, Vanessa Carla Furtado *et al.* **Biodistribution of Long-Circulating PEG-Grafted Nanocapsules in Mice: Effects of PEG Chain Length and Density**. [S.l.: S.n.].

OLIVEIRA, Lílíam Teixeira *et al.* Impact of dose and surface features on plasmatic and liver concentrations of biodegradable polymeric nanocapsules. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 105, p. 19–32, 15 jul. 2017.

- PALAO-SUAY, Raquel *et al.* Photothermal and photodynamic activity of polymeric nanoparticles based on  $\alpha$ -tocopheryl succinate-RAFT block copolymers conjugated to IR-780. **Acta Biomaterialia**, v. 57, p. 70–84, 15 jul. 2017.
- PENG, Yan *et al.* Terahertz Imaging and Spectroscopy in Cancer Diagnostics: A Technical Review. **BME Frontiers**, v. 2020, 25 set. 2020.
- PULASKI, Beth A.; OSTRAND-ROSENBERG, Suzanne. Mouse 4T1 Breast Tumor Model. **Current Protocols in Immunology**, v. 39, n. 1, p. 20.2.1-20.2.16, 1 out. 2000.
- REPETTO, Guillermo; DEL PESO, Ana; ZURITA, Jorge L. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/ cytotoxicity. **Nature Protocols**, v. 3, n. 7, p. 1125–1131, 12 jun. 2008.
- SALATA, Camila *et al.* Preliminary pre-clinical studies on the side effects of breast cancer treatment. **International Journal of Radiation Biology**, v. 97, n. 7, p. 877–887, 2021.
- SCHAFFAZICK, Scheila Rezende *et al.* Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 726–737, 2003.
- SHAN, Xiaoting *et al.* Current approaches of nanomedicines in the market and various stage of clinical translation. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 12, n. 7, p. 3028–3048, 1 jul. 2022.
- SILVA, Vera L. *et al.* Selection of Novel Peptides Homing the 4T1 CELL Line: Exploring Alternative Targets for Triple Negative Breast Cancer. **PLOS ONE**, v. 11, n. 8, p. e0161290, 1 ago. 2016.
- SIMÕES, Rui V. *et al.* Metabolic Plasticity of Metastatic Breast Cancer Cells: Adaptation to Changes in the Microenvironment. **Neoplasia**, v. 17, n. 8, p. 671–684, 1 ago. 2015.
- SOGBEIN, Oyebola O. *et al.* Synthesis of ortho- and meta-Re(I)-metallo-carboranes in water. **Inorganic Chemistry**, v. 44, n. 25, p. 9574–9584, 12 dez. 2005.
- TAO, Kai *et al.* Imagable 4T1 model for the study of late stage breast cancer. **BMC Cancer**, v. 8, n. 1, p. 1–19, 9 ago. 2008.
- TEKADE, Rakesh K.; SUN, Xiankai. **The Warburg effect and glucose-derived cancer theranostics. Drug Discovery Today** Elsevier Ltd, , 1 nov. 2017.

VELOSO, A. B. *et al.* SERS Investigation of Cancer Cells Treated with PDT: Quantification of Cell Survival and Follow-up. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–12, 1 dez. 2017.

WANG, Chao *et al.* NIR-Triggered Multifunctional and Degradable Nanoplatfrom Based on an ROS-Sensitive Block Copolymer for Imaging-Guided Chemo-Phototherapy. **Biomacromolecules**, v. 20, n. 11, p. 4218–4229, 11 nov. 2019.

WANG, Kaikai *et al.* Self-assembled IR780-loaded transferrin nanoparticles as an imaging, targeting and PDT/PTT agent for cancer therapy. **Scientific Reports** 2016 6:1, v. 6, n. 1, p. 27421-, 6 jun. 2016.

WANG, Yong *et al.* Mitochondria-targeted nanospheres with deep tumor penetration for photo/starvation therapy. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 8, n. 34, p. 7740–7754, 2 set. 2020.

**What is the Polydispersity Index (PDI) in Dynamic Light Scattering (DLS)? | Malvern Panalytical.** Disponível em: <<https://www.malvernpanalytical.com/en/learn/knowledge-center/insights/dynamic-mine-column-in-dls-what-is-polyvariance-index-pdi>>. Acesso em: 16 ago. 2025.

YANG, Jianquan *et al.* Self-assembled albumin nanoparticles induce pyroptosis for photodynamic/photothermal/immuno synergistic therapies in triple-negative breast cancer. **Frontiers in Immunology**, v. 14, p. 1173487, 26 maio 2023.

YANG, Yue *et al.* Self-assembled multifunctional polymeric micelles for tumor-specific bioimaging and synergistic chemo-phototherapy of cancer. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 602, p. 120651, 1 jun. 2021.

## 10 ANEXO A – Trabalhos publicados em anais de congressos e seminários

SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA do ENCONTRO DE SABERES – UFOP, 30., 2022, Ouro Preto – MG, **Anais**, Título: Internalização de nanopartículas poliméricas e mecanismo de morte em células de tumor de mama com uso de citometria de fluxo e sondas fluorescentes.

SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA do ENCONTRO DE SABERES – UFOP, 31., 2023, Ouro Preto – MG, **Anais**, Título: Nanopartículas poliméricas e estudo dos mecanismos de morte em modelo *in vitro* de tumor de mama por citometria de fluxo e uso de sondas fluorescentes.

INTERNATIONAL SYMPOSIUM OF PHARMACEUTICAL SCIENCES GRADUATE PROGRAM (CIPHARMA), 3., 2023, Ouro Preto – MG, **Anais**, Título: In vitro photodynamic activity of theranostic nanostructure functionalized with ligand for active targeting to breast cancer cells.

SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA do ENCONTRO DE SABERES – UFOP, 32., 2024, Ouro Preto – MG, **Anais**, Título: Estudo da atividade fotodinâmica de nanopartículas poliméricas funcionalizadas frente ao modelo *in vitro* de tumor de mama murinho.