



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA E MORFOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

Victor Carlos Mello da Silva

**Desenvolvimento e aplicação biológica de nanossistemas contendo novos
fotossensibilizantes derivados do benzo[a]fenoxazínio**

Dissertação de Mestrado

Brasília
2019

Victor Carlos Mello da Silva

Desenvolvimento e aplicação biológica de nanossistemas contendo novos fotossensibilizantes derivados do benzo[a]fenoxazínio

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

Orientador: Luis Alexandre Muehlmann

**Brasília
2019**

Agradecimentos

Oi gente ;)

Nesses últimos meses ando mais reflexivo do que o normal. Então peço desculpas se isso ficar mais meloso do que deveria.

Me considero tão privilegiado, por existir pessoas em quem pude me apoiar durante o mestrado, mesmo que em tão pouco tempo. Então só tenho que agradecer todo mundo que fez parte disso.

Primeiramente, gostaria de agradecer o meu orientador Luis Alexandre por ter me acolhido em seu grupo de pesquisa por quase 6 anos. E ter proporcionado um ambiente onde eu aprimorasse minha prática em laboratório, aprendesse novas técnicas e conhecesse ótimas pessoas. Assim, pude crescer não só como profissional, mas também como pessoa. Você me inspira professor!

Agradeço todo o suporte, conversas, orientações, risadas, passeios e tantos momentos que tive com o pessoal do Laboratório: Raquel, Luiza, Maria, Amanda, Athayde, Fernanda Altino, Marcela, Ingridzinha, Marcinha, Jaqueline Vaz, Victor Hugo. E ainda um obrigado especial para a equipe IMUNO NANO. Obrigado Mosar, Ray, Athayde, Kissia, Camila, Katy e Giulia <3

Nos últimos meses descobri que adoro tirar intervalos dos experimentos com a Karen Py. Obrigado por me apoiar nas ideias de projetos mais loucas e por abrir um espacinho na sua mesa para mim.

No mestrado também aprendi a valorizar cada brainstorm que acontecia entre um experimento e outro. E para isso, ninguém melhor do que Profa Patrícia e Profa Jaque. Obrigado meninas!

Não posso esquecer das melhores estagiárias: Leticia, Dafne e Maiza. Gente, vocês me ajudaram muito! Espero que vocês estejam aproveitando o estágio da melhor forma e que eu tenha conseguido passar algo para vocês. E desculpa se as vezes sou meio chato e exigente, tento melhorar todos os dias. PS: Dafne para de surtar, você é incrível de todas as formas!

Alguns professores foram muito importantes nesse meu tempo de pesquisa, e me motivam a melhorar como pesquisador e cientista. Um grande obrigado aos professores: Ricardo Bentes, Mônica Garcia, João Paulo Longo, Mariana Castro, Graziella Joanitti, Izabel Rodrigues e Marcelo Henrique Sousa.

Outros professores a gente leva no coração como bons amigos, obrigado pelas ótimas conversas Eliana Gris e obrigado pelo pleno apoio Eduardo Antônio.

Também gostaria de agradecer todos os profissionais da UnB que tanto estive-

ram presentes nos meus dias durante o mestrado. Sou muito grato às guardinhas que me ajudavam quando meu carro pifava, e nas inúmeras vezes que deixava a janela aberta. E um especial obrigado para a Luciana, secretária da pós-graduação, menina, você arrasa muito. Se todos os servidores da UnB fossem como você, a Universidade seria um lugar muito mais agradável!

Nessa reta final conheci a professora Mariana Castro. Sabe essas pessoas de alma boa? No início sempre me perguntava “Por que ela está me ajudando assim? “. E agora descobri que adoro ir na sala dela nas segundas pela manhã só para dar um “Oi”. Profa, você me ajudou tanto, obrigado bem lá no fundinho do coração!

E o apoio dos amigos foi mais que essencial nesse período. Gratidão ao Gabs, Walbs, Ellen, Victor Hugo, Marcus, Ketlen, Iarla, Rayane e Camila Oliveira.

Marininha Radicchi, acho que a pessoa que mais conviveu comigo nesses últimos anos. Presente em todos os tipos de rolês, experimentos, noites no laboratório, discussões de experimentos, artigos, dates, furadas, e tantas e tantas e tantas risadas. Obrigado pela companhia, paciência e todo o suporte. Obrigado pela grande ajuda nos experimentos. Obrigado também por me ajudar a “orientar” Dafne, Leti e Mai. Amo você menino.

Lucas Campos, boy, serei eternamente grato pelo companheirismo durante todo esse tempo, cheio de aprendizados e momentos dos quais sempre vou lembrar. Obrigado por todo trabalho na Spectrum, você foi imprescindível no crescimento dela. Desculpa pela quantidade de brigas e dramas desnecessários, o Victor de hoje faria algumas coisas de formas diferentes. E não inventa de voltar para Natal depois do mestrado, você vai fazer muita falta.

Ivan, garotinho, que falta você fez. Obrigado por ser essa pessoa tão incrível. Sempre sorridente, e com uma energia inexplicavelmente aconchegante. Amo você baby.

Um dos maiores privilégios de vida que tive foi pertencer a uma família repleta de amor. Obrigado Vovó e Papai pelo apoio, suporte, criação, preocupações, orientações e discussões. Obrigado pelas risadas, principalmente nas madrugadas, quando eu ia na cama de vocês para conversar da vida ou falar das ideias mais loucas possíveis. Sinto tanta saudade desses momentos. . . Amo Vocês!

Agradeço a MAMÃE de todo o coração, que nos seus 16 anos de idade, já teve que mudar sua rotina, prioridades e sonhos. Que teve que dar seus pulos para conseguir me dar o melhor que ela poderia. Sabemos que ser mãe solteira não é tão fácil assim. Obrigado por estar sempre presente e ser esse mulherão, que tanto me ensina todos os dias e já me chama para ir nas manifestações. Ai que orgulho! Te amo mais que demais mamãe.

E por fim não poderia deixar de agradecer as fontes de fomento CAPES, CNPQ e FAP-DF pelo auxílio financeiro nos projetos que participei.

Resumo

O presente trabalho teve como proposta desenvolver dois nanossistemas contendo fotossensibilizantes (FS) sintéticos do tipo benzo[a]fenoxazínio para serem utilizados em terapia fotodinâmica. Foram desenvolvidos um lipossoma e um nanocarreador lipídico nanoestruturado. Em seguida, foram associados a eles diferentes fotossensibilizantes conjugados com moléculas biológicas para direcionamento do fotossensibilizante ao tumor. O presente trabalho apresenta o desenvolvimento de nanossistemas de fabricação simples, com componentes já estabelecidos como pouco tóxicos, permitindo assim maior facilidade de produção e aplicabilidade na TFD. O trabalho analisou a atividade biológica dos sistemas desenvolvidos em diferentes tipos de linhagens celulares. Os lipossomas foram desenvolvidos pela técnica de hidratação de filme lipídico e os nanocarreadores lipídicos nanoestruturados pelo método de temperatura de inversão de fases. Os ensaios biológicos, *in vitro*, foram feitos pelo método 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT). Ao avaliar os nanossistemas desenvolvidos como possíveis fotossensibilizantes, notou-se que eles apresentaram boas características para ser utilizados em TFD. Possuem características fotofísicas que o habilitam como FS, além de apresentar capacidade de gerar ERO, baixa toxicidade no escuro e capacidade de reduzir a viabilidade de células tumorais *in vitro*, quando irradiado.

Palavras-chave: Terapia fotodinâmica. Carreador lipídico nanoestruturado. Lipossomas.

Abstract

The present work had as proposal to develop two nanosystems containing synthetic benzo [a] phenoxazinium photosensitizers (FS) to be used in photodynamic therapy. A liposome and a nanostructured lipid nanocarrier have been developed. Subsequently, different photosensitizers conjugated with biological molecules were associated with them to direct the photosensitizer to the tumor. The present work presents the development of simple manufacturing nanosystems, with components already established as little toxic, thus allowing greater ease of production and applicability in PDT. The work analyzed the biological activity of the systems developed in different types of cell lines. Liposomes were developed by the lipid film hydration technique and nanostructured lipid nanocarriers by the phase inversion temperature method. Biological assays, in vitro, were done by the method 3, (4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT). When evaluating the nanosystems developed as possible photosensitizers, it was observed that they presented good characteristics to be used in PDT. They have photophysical characteristics that enable it as FS, besides being able to generate ERO, low toxicity in the dark and ability to reduce the viability of tumor cells in vitro, when irradiated.

Keywords: Photodynamic therapy. Nanostructured lipid carriers. Liposome.

Lista de ilustrações

Figura 1 – Ilustração de principais componentes envolvidos em vias de internalização de partículas pelas células.	22
Figura 2 – Mecanismo de ação da terapia fotodinâmica (TFD)	26
Figura 3 – Estruturas de cloretos de benzo [a] fenoxazínio	29
Figura 4 – Esquema geral do trabalho	32
Figura 5 – Simplified scheme showing the treatments used in cell viability tests.	35
Figura 6 – Treatment layout	38
Figura 7 – Liposome-cell interaction	40
Figura 8 – Macroscopic aspect of Lipossomes	41
Figura 9 – Absorption spectrum of PS1-Liposome (LIPS1), PS2-Liposome (LIPS2), PS1 and PS2 diluted in water (PS concentration is 10 μ M).	42
Figura 10 – Fluorescence spectrum of PS1-Liposome (LIPS1), PS2-Liposome (LIPS2), PS1 and PS2 diluted in water (PS concentration is 10 μ M).	43
Figura 11 – Photoactivated production of ROS by PS1-Liposome (LIPS1), PS2-Liposome (LIPS2), PS1 and PS2 diluted in water diluted in water (PS concentration is 30 μ M)	43
Figura 12 – Cytotoxicity against A459 cells	44
Figura 13 – Cytotoxicity against NIH-3T3 cells	45
Figura 14 – Cytotoxicity against HeLa cells	45
Figura 15 – Cytotoxicity against 4T1 cells	45
Figura 16 – Cytotoxicity against MCF-7 cells	46
Figura 17 – Simplified scheme showing the treatments used in cell viability tests.	50
Figura 18 – Macroscopic aspect of nanostructured lipid carriers	55
Figura 19 – TEM micrography of LIP under 25000 magnification	56
Figura 20 – Frequency distribution of sizes measured from TEM micrographs	56
Figura 21 – Stability Profile. Polydispersion index (PDI) of NLS stored for 30 days.	56
Figura 22 – Stability Profile. Hydrodynamic diameter of NLS stored for 30 days.	57
Figura 23 – Absorption spectra of PS1 (Photosensitizer without Biotin); PS2 (photosensitizer with Biotin); NLS1 (NLS containing photosensitizer PS1); NLS2 (NLS containing photosensitizer PS2) dispersed in water.	57
Figura 24 – Fluorescence, excitation at λ 600 nm	58
Figura 25 – Photoactivated production of ROS by PS1, PS2, NLS1 and NLS2	58
Figura 26 – Cytotoxicity against NIH/3T3 cells	59
Figura 27 – Cytotoxicity against HCT 116 cells	59
Figura 28 – Cytotoxicity against HeLa cells	60
Figura 29 – Cytotoxicity against CT26 cells	60
Figura 30 – Cytotoxicity against 4T1 cells	60

Lista de tabelas

Tabela 1 – Physicochemical characteristics of liposomes. PS = particle size (diameter), Pdl = polydispersity and ZP = zeta potential.	42
Tabela 2 – Physicochemical characteristics of nanostructured lipid carriers. PS = particle size, Pdl = polydispersity and ZP = zeta potential.	55

Lista de abreviaturas e siglas

AFM	Microscopia de força atômica
ANOVA	Análise de Variância
°C	Graus Célsius
CD8	Grupamento de Diferenciação 8
CO ₂	Dióxido de Carbono
CVD	Deposição química de vapor catalisada
DH	Diâmetro Hidrodinâmico
DLS	Dispersão de luz dinâmica
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDS	Espectrometria de Energia Dispersiva de Raios-X
ERO	Espécie reativa de oxigênio
FDA	Food and Drug Administration
FS	fotossensibilizador
IAN	Índice de Acidez Naftênica
INCA	Instituto Nacional do Câncer
ISO	International Organization for Standardization, ou Organização Internacional para Padronização, em português
LAI	Lei de Acesso à Informação
LED	Light Emitting Diode
LIP	Lipossoma
LLC	Leucemia Linfocítica Crônica
MCI	Morte Celular Imunogênica
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão

MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MO	Micro-ondas
MTT	Ensaio de captação do corante Tetrazoliun (atividade metabólica mitocondrial)
PBS	Solução tampão fosfato-salina
PDI	Índice de Polidispersão
PDT	Terapia fotodinâmica
PEG	Poli Etileno Glicol
PIT	Temperatura de inversão de Fases
PS1	Fotossensibilizante 1
PS2	Fotossensibilizante 2
PS3	Fotossensibilizante 3
PS4	Fotossensibilizante 4
RE	Retículo endoplasmático
ROS	Reactive Oxygen Species
RPM	ROTAÇÃO POR MINUTO
RPMI	Meio de cultura Roswell Park Memorial Institute
SFB	Soro Fetal Bovino
SLN	Nanopartículas Lipídicas Sólida
TEM	Microscopia eletrônica de transmissão
TFD	terapia fotodinâmica
UK	Reino Unido (United Kingdom)
USA	Estados Unidos da América
UV	Ultra Violeta
ZP	Potencial zeta

Sumário

1	Introdução	11
2	Revisão da Literatura	12
2.1	Nanomedicina e nanossistemas	12
2.1.1	Lipossomas	13
2.1.2	Nanopartículas Lipídicas Sólidas	13
2.1.3	Nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro	14
2.1.4	Dendrimeros	14
2.1.5	Nanotubos de carbono	16
2.1.6	Nanopartículas de ouro	16
2.2	Técnicas de caracterização de nanoestruturas	17
2.2.1	Análise morfológica	17
2.2.2	Diâmetro Hidrodinâmico	18
2.2.3	Potencial Zeta	19
2.2.4	Taxa de incorporação do fármaco	19
2.2.5	Grau de Cristalinidade	20
2.3	Interação entre nanomateriais e células	20
2.4	Vias de internalização de nanopartículas em células	21
2.4.1	Endocitose	21
2.4.2	Fagocitose	22
2.4.3	Pinocitose	22
2.4.4	Endocitose mediada por Clatrina	23
2.4.5	Endocitose mediada por Caveolina	23
2.4.6	Endocitose independente de Clatrina e Caveolina	23
2.4.7	Macropinocitose	24
2.5	Terapia fotodinâmica	24
2.5.1	Fonte de Luz	27
2.6	Conjugação de biomoléculas em nanossistemas	27
2.6.1	Fotossensibilizantes do tipo benzo[a]fenoxazínio	27
3	JUSTIFICATIVA	30
4	OBJETIVOS	31
4.1	Objetivo Geral	31
4.2	Objetivos Específicos	31
4.2.1	Capítulo 1	31
4.2.2	Capítulo 2	31

	Preparation, characterization and biological activity evaluation of liposomes containing benzo[a]phenoxazinium photosensitizers associated with pregnenolone	33
	Preparation, characterization and biological activity evaluation of nanostructured lipid carriers containing benzo[a]phenoxazinium photosensitizers associated with biotin	48
5	Conclusões Gerais	62
	Referências	63
	ANEXO A – Produções Bibliográficas relacionadas ao trabalho	71

1 Introdução

Há um interesse crescente dentro da indústria farmacêutica de desenvolver novos fármacos para superar a resistência de tumores a fármacos e tratar doenças complexas. No entanto, esses fármacos muitas vezes são inadequados para uso por possuírem características físico-químicas e/ou biológicas que dificultam sua utilização (CAMPOS et al., 2019). Grande parte dos fármacos anticâncer utilizados nas quimioterapias convencionais possuem ação não específica, com janela terapêutica bastante estreita, comprometendo a qualidade de vida do paciente. A nanotecnologia pode superar esta dificuldade, direcionando o fármaco ao local de ação e melhorando a sua farmacocinética (GHARPURE et al., 2015).

A combinação da remoção cirúrgica com quimioterapia, ou radioterapia é a estratégia comumente indicada para o tratamento da maioria dos cânceres. Entretanto, a taxa de morbidade e mortalidade associada a essas terapias é bastante significativa, fato decorrente principalmente de sua baixa seletividade pelo tecido tumoral. O aumento da segurança do tratamento está associado à capacidade de atingir seletivamente o tecido tumoral (STEICHEN; CALDORERA-MOORE; PEPPAS, 2013).

Outra alternativa segura e eficaz para a tratamento oncológico é a terapia fotodinâmica (TFD). A TFD tem ação ao ser combinada com substâncias de propriedades fotossensibilizantes, que ao receberem luz aplicada com o comprimento de onda adequado, são excitadas para seu estado singleto. Ao decair para o estado tripleto, o fotossensibilizante (FS) poderá transferir energia para o oxigênio molecular, ou envolver-se em um processo de transferência de elétrons que levará à formação de radicais, e consequentemente espécies reativas de oxigênio (EROs), que possuem efeitos citotóxicos (HACKBARTH et al., 1998). Sua eficácia decorre da indução direta de morte das células neoplásicas por estresse oxidativo, da destruição da microvasculatura tumoral e do reforço/ativação da imunidade antitumoral (GARG; AGOSTINIS, 2014).

O atual trabalho teve como proposta desenvolver dois sistemas contendo fotossensibilizantes sintéticos do tipo benzo[a]fenoxazínio para serem utilizados em terapia fotodinâmica. Foram desenvolvidos um lipossoma e um nanocarreador lipídico. Em seguida, foram associados a eles diferentes fotossensibilizantes. Para os lipossomas foram incorporados o PS1 e o PS2, temos assim: LIPS1 (lipossoma contendo PS1) e LIPS2 (lipossoma contendo PS2). Já nos Nanocarreadores lipídicos foram incorporados o PS1 e PS3, assim temos: NLPS1 (Nanocarreador lipídico contendo PS1) e NLPS3 (Nanocarreador Lipídico contendo PS3).

2 Revisão da Literatura

A nanotecnologia foi definida pela ISO 2007 como “Percepção e controle da matéria e processos em nanoescala geralmente, porém não unicamente, abaixo de 100 nanômetros em uma ou mais dimensões, no qual o aparecimento de fenômenos que dependem do tamanho, geralmente permita novas aplicações”.

Em função da sua dimensão, a nanotecnologia permite o desenvolvimento, descrição, alteração e utilização destes materiais que apresentam características físicas e químicas distintas das observadas no momento em que estes estão em escalas macroscópicas. Dentro da nanotecnologia temos a nanobiotecnologia, que estuda materiais nanoestruturados e sua influência em sistemas biológicos. (GUPTA; GUPTA, 2005; ALEXIS et al., 2008)

A utilização da nanobiotecnologia tem despertado grande interesse de Pesquisadores no mundo todo. Sabe-se que a nanotecnologia, no futuro, especificamente em associação com outras áreas do conhecimento pode promover avanços revolucionários, desde tecnologias de prevenção, detecção e tratamento de doenças; Até no desenvolvimento de produtos que não estão diretamente envolvidos com saúde como: fabricação de trajes que protegem contra toxinas e patógenos, sistemas de memória de alta densidade e a evolução da robótica (SARGENT JR., 2013), entre várias outras possíveis aplicações.

2.1 Nanomedicina e nanossistemas

A ascensão da nanotecnologia e sua integração nas áreas de saúde e da medicina conduziram ao surgimento da área mais conhecida como Nanomedicina. Com a nanotecnologia na medicina, surgiram numerosos avanços no tratamento de inúmeras doenças. No câncer por exemplo é possível a aplicação direta do quimioterápico em tumores, atingindo unicamente a região do tecido tumoral diminuindo o dano ao tecido saudável circundante. Os principais benefícios das aplicações biomédicas da utilização de nanomateriais são: nanoestruturas derivadas de biomoléculas são capazes de ser direcionados para organelas específicas; nanoestruturas constantemente solucionam complicações de solubilidade de fármacos; são capazes de harmonizar formulações tradicionais especialmente à base de biomoléculas por meio da modificação da superfície do sistema; pela sua diminuta dimensão, nanossistemas apresentam uma alta área de superfície e dessa maneira, podem entregar uma grande capacidade de encapsulamento; algumas estruturas apresentam novas características físicas quando estão em grandeza nanométrica, tais como propriedades ópticas; várias nanoestruturas como quantum dots e nanopartículas a base de ferro são capazes de ser utilizadas como ferramentas para bioimageamento; nanossistemas, a partir de direcionamento passivo

ou ativo, são capazes de liberar fármacos de maneira controlada, reduzindo a toxicidade e os efeitos nocivos em comparação com formulações tradicionais (NOORLANDER, 2015; SARGENT JR., 2013).

Dentre os vários nanossistemas na atualidade sendo estudados para uso em tratamentos, podemos classificá-las em 2 grandes categorias: nanopartículas orgânicas e inorgânicas. Dentre as inorgânicas podemos citar: Nanotubos de carbono, nanopartículas de sílica, nanopartículas de ouro, nanopartículas magnéticas e quantum dots. Dentre as orgânicas, pode-se citar nanopartículas lipídicas e as poliméricas, dentre as lipídicas pode-se nomear dois importantes nanossistemas, os Lipossomas e as Nanopartículas Lipídicas Sólidas (ANDREA et al., 2011)

2.1.1 Lipossomas

Lipossomas são vesículas esféricas constituídas de uma ou mais bicamada lipídica que isolam um ou mais compartimento aquoso interno do meio externo. São formados por fosfolipídios anfifílicos como a fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina e o fosfatidilglicerol, que se organizam em uma bicamada lipídica com um interior aquoso (MARCIELLO et al., 2016). 2016). Foram descritos pela primeira vez por Bangham e Horne (1964). Os lipossomas possuem a possibilidade de conter tanto moléculas hidrofílicas quanto hidrofóbicas por apresentar natureza anfótera, já que são constituídos por uma fase externa envolvendo um conjunto de membranas fosfolipídicas e uma fase interna constituída por um meio aquoso. Sendo possível encapsular uma grande diversidade de moléculas dentro desses espaços. Na terapia, já são utilizadas formulações de lipossomas, contendo antraciclina para o tratamento do câncer de mama e sarcoma de Kaposi (BANGHAM; HORNE, 1964). Nos dias de hoje, o lipossoma é um dos nanocarreadores mais promissores na terapia anticâncer. (DESHPANDE; BISWAS; TORCHILIN, 2013)

2.1.2 Nanopartículas Lipídicas Sólidas

As nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) são partículas com diâmetros médios mais baixos que 1000 nm. São constituídas por uma matriz lipídica sólida – composta frequentemente de glicerídeos, ácidos graxos ou ceras –, estabilizada por tensoativos fisiologicamente compatíveis. Introduzidas por volta de 1990, as NLS estão a frente quando se trata de sistemas de liberação para a entrega de fármacos. Vieram como uma alternativa segura e eficiente para sistemas já existentes – nanopartículas poliméricas, nanoemulsões e lipossomas –. Estão uma geração acima das emulsões lipídicas, nas quais os lipídeos líquidos (óleos) são substituídos por lipídeos sólidos à

temperatura ambiente. Em virtude da estrutura sólida, é concedida uma menor mutabilidade aos ativos nela incorporados, conseqüentemente, é possível sustentar ou mesmo moderar a liberação dessas substâncias (PARDESHI et al., 2012; CORRIAS; LAI, 2011). De acordo com a composição da NLS, ou estrutura do fármaco incorporado, o ativo pode ser detectado disperso na matriz lipídica, na parede lipídica ou mesmo aderido à superfície do sistema. É possível listar consideráveis benefícios deste sistema de liberação. Elas contêm uma alta estabilidade, o sistema é pouco tóxico, é dispensável a utilização de solventes orgânicos tóxicos em seu desenvolvimento, e possui perspectiva de fabricação em escala industrial (RUKTANONCHAI et al., 2009).

2.1.3 Nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro

As nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro (SPION) são excelentes ferramentas no campo biomédico, pois o SPION pode ser funcionalizado para várias aplicações e guiado por uma fonte externa magnética. Estes compostos consistem de um núcleo de óxido de ferro cristalino, que é revestido por uma casca, para evitar a aglomeração de SPIONs não revestidos. (LU; SALABAS; SCHUTH, 2007)

Vários compostos são usados para revestir o SPION, como o dextrano, o amido ou o poli etileno-glicol (PEG). O revestimento mais utilizado é o dextrano de baixo peso molecular, devido à alta biocompatibilidade e às longas propriedades de circulação. (MOORE et al., 2000). SPION revestidos com dextrano já são aprovados para uso clínico pela Food and Drug Administration (FDA) dos EUA. Em geral, os SPION são classificados como biocompatíveis, não apresentando efeitos tóxicos severos *in vitro* ou *in vivo*. (MULLER et al., 2007)

Já existem vários estudos que avaliam a biocompatibilidade de SPIONs. Como Siglienti et al. (2006) que expuseram macrófagos peritoneais primários de ratos e camundongos a SPIONs revestido com dextrano, demonstrando secreção aumentada de citocinas antiinflamatórias e produção reduzida de citocinas pró-inflamatórias. (SIGLIENTI et al., 2006) Em contraste, um aumento nas citocinas pró-inflamatórias em uma linhagem de macrófagos murinos foi observado, acompanhado por uma diminuição na função fagocítica dessas células após exposição a SPION revestido com dextrano. (HSIAO et al., 2008). Também há relatos que o SPION não causa alteração na função hepática quando administrado em ratos. (RAYNAL et al., 2004)

2.1.4 Dendrímeros

Os dendrímeros, descritos pela primeira vez em 1985 (TOMALIA et al., 1985), são macromoléculas bem definidas, altamente ramificadas, na escala nanométrica, com estruturas químicas precisamente controladas. Eles consistem de um núcleo central

cercado por camadas concêntricas, representando as gerações dos dendrímeros, ou seja, o número de camadas irá predizer a geração do dendrímero. Os dendrímeros fornecem uma série de excelentes vertentes para o planejamento de novos carreadores de fármacos, genes e agentes para bioimagem. Existem várias classes de dendrímeros, como poliamidoamina (PAMAM), poli (propilenemina) (PPI) ou poli-L-lisina (PLL). Atualmente dendrímeros PAMAM são os mais intensivamente investigados do ponto de vista tecnológico e toxicológico. (ANDREA et al., 2011)

Os dendrímeros exibem uma toxicidade dependente da geração, sendo os dendrímeros de maior geração os mais tóxicos (ROBERTS; BHALGAT; ZERA, 1996) A extensão da citotoxicidade induzida pelos dendrímeros também depende da carga superficial, em que os dendrímeros catiônicos são mais tóxicos que os dendrímeros aniônicos. Uma diminuição acentuada na citotoxicidade também pode ser alcançada quando a superfície é modificada com PEG (JEVPRASESPHANT et al., 2003). Dendrímeros catiônicos induzem formação de poros em membranas (LEROUEIL et al., 2008). Eles também podem induzir a apoptose causada por disfunção mitocondrial. (LEE et al., 2009)

Os dendrímeros catiônicos podem causar mudanças substanciais na morfologia e hemólise das hemácias de maneira dependente da geração, enquanto os dendrímeros aniônicos não têm esse efeito. (MALIK et al., 2000) Dendrímeros catiônicos mostraram induzir apoptose dependente de caspases e influenciar negativamente a proliferação em linhagem celular de macrófagos murinos (KUO; JAN; CHIU, 2005). Esses efeitos não puderam ser observados em outras linhagens de células murinas, destacando a importância das diferenças específicas do tipo de célula. Dendrímeros PAMAM da geração 3.5 mostraram afetar o potencial de membrana mitocondrial em mitocôndrias isoladas de fígado de rato (LABIENIEC; GABRYELAK, 2008)

A citotoxicidade *in vitro* causada pelos dendrímeros parece ser influenciada principalmente pelas propriedades químicas da superfície dos dendrímeros (PLANK et al., 1996). Alguns pesquisadores sugerem que dendrímeros poderiam ser utilizados para prevenir a formação de tecido cicatricial. O perfil transcricional de monócitos expostos a dendrímeros fosforilados revelou superexpressão de genes envolvidos em respostas anti-inflamatórias (FRUCHON et al., 2009). Efeitos antiinflamatórios também foram relatados *in vivo* quando dendrímeros PAMAM modificados simples foram injetados em ratos. Efeitos antiinflamatórios também foram relatados *in vivo* quando dendrímeros PAMAM modificados simples foram injetados em ratos. No entanto, os mecanismos detalhados ainda são desconhecidos (CHAUHAN et al., 2009).

2.1.5 Nanotubos de carbono

Os nanotubos de carbono (CNT) exibem uma estrutura oca unidimensional única e extraordinárias propriedades mecânicas, elétricas, térmicas e ópticas que os tornam um dos nanomateriais projetados mais promissores para uma série de aplicações técnicas e biomédicas. CNT consiste puramente de átomos de carbono dispostos em uma rede hexagonal que é enrolada em um único cilindro de dimensões em nanoescala (CNT de parede única, SWCNT) ou um nanotubo de múltiplas camadas de grafeno concêntrico (CNT de parede múltipla, MWCNT) (ALLEN et al., 2008)

Ambos os tipos de CNT podem ser produzidos por descarga elétrica, ablação a laser ou técnicas de deposição de vapor químico (CVD), permitindo a síntese em grande escala e a baixo custo desses materiais, um pré-requisito para sua ampla aplicação. Embora o CNT produzido em CVD tenha impurezas com baixo teor de carbono e distribuições de tamanho e comprimento mais homogêneas, ainda permanece um desafio obter material bem definido reproduzível devido a dificuldades em controlar todos os parâmetros. Embora tenha sido demonstrado que o CNT pode, em princípio, ser biodegradado através de catálise enzimática (ALLEN et al., 2009). Alguns CNTs injetados em ratos por via intravenosa demonstraram persistir por pelo menos 3 meses (CHOU et al., 2008) levantando preocupações de potenciais efeitos negativos para a saúde. Essas preocupações foram ainda mais estimuladas pela comparação da toxicidade do CNT com outras fibras fibrosas reativas, como o amianto (POLAND et al., 2008) que são conhecidos por apresentar efeitos deletérios como a indução de mesotelioma alguns anos após a exposição inicial.

2.1.6 Nanopartículas de ouro

O ouro tem uma longa história de uso medicinal, da medicina chinesa antiga à medicina moderna (EDWARDS; THOMAS, 2007). Sais de ouro (por exemplo, auranofina) são usados para tratar a artrite reumatóide, embora o exato mecanismo de ação ainda seja uma questão de debate. Hoje, há intensa pesquisa para aproveitar as propriedades únicas das partículas de ouro nanométricas, incluindo aplicações para terapia anticâncer, imagens e diagnósticos médicos. Entender as toxicidades potenciais da administração de nanopartículas de ouro é parte integrante desse esforço. Citotoxicidade dependente do tamanho das nanopartículas tem sido relatada para nanopartículas de ouro. Assim, estudos *in vitro* demonstraram que nanopartículas de ouro muito pequenas (1,4 nm) causam morte celular (necrose) através da indução de estresse oxidativo e dano mitocondrial (PAN et al., 2009), enquanto partículas um pouco maiores (3.7 nm) não eram tóxicas, embora tenham penetrado no núcleo das células (GU et al., 2009). Um efeito dose dependente também foi mostrado por Yen,

Hsu e Tsai (2009).

Doses baixas (1 ppm) de nanopartículas de ouro com tamanhos de 2-4 nm, 5-7 nm e 20-40 nm não são tóxicas para algumas linhagens celulares específicas, enquanto que doses de 10 ppm mostram induzir apoptose e aumentar atividade anti-inflamatória. Observa-se também que o método de produção das nanopartículas também interfere em sua toxicidade. Uma vez que as partículas que são produzidas através de um método físico que não deixa íons residuais ou estabilizadores que podem ser potencialmente tóxicos, tem sua toxicidade reduzida. Assim métodos de produção que não geram remanescentes do processo de síntese ou outros contaminantes são de grande importância quando se discute a biocompatibilidade de nanopartículas, e os efeitos citotóxicos podem ser evitados através de síntese controlada ou revestimento de partículas (MURPHY et al., 2008; ALKILANY et al., 2009).

2.2 Técnicas de caracterização de nanoestruturas

Compreender nanossistemas é uma etapa vital para garantir a melhor aplicação destes. Dessa maneira, entender características físico-químicas dos nanossistemas torna-se primordial para o sucesso no desenvolvimento desse sistema de liberação. A caracterização de nanoestruturas reúne: A análise morfológica da partícula, caracterização de potencial zeta e diâmetro hidrodinâmico, determinação da quantidade de fármaco incorporados às partículas, a cinética de liberação do fármaco e o acompanhamento dos parâmetros citados em função do tempo e temperatura de armazenamento (TAVEIRA, 2009; AKBARI; TAVANDASHTI; ZANDRAHIMI, 2011; HALL; MCNEIL, 2007)

2.2.1 Análise morfológica

Os microscópios eletrônicos são instrumentos extremamente versáteis para análise das caracterizações da morfologia e composição química de microestruturas. Desde a descoberta de que os elétrons podem ser desviados pelo campo magnético em numerosos experimentos na década de 1890, a microscopia eletrônica foi desenvolvida substituindo a fonte de luz pelo feixe de elétrons de alta energia. Para a análise morfológica utilizam-se especificamente as microscopias eletrônicas de varredura (MEV) e transmissão (MET) ou mesmo microscopia de força atômica (CHAUDHURI; PARIA, 2012).

A análise microscópica é a técnica mais comum e confiável para a visualização direta dos diferentes tipos de nanopartículas. A microscopia eletrônica de varredura (MEV) é a técnica microscópica mais comumente utilizada para análise de tamanho e forma de nanopartículas. No entanto, é difícil distinguir a diferença entre os materiais do núcleo e do invólucro, uma vez que o MEV gera apenas uma imagem de

superfície. Mas quando o MEV está conectada à espectroscopia de dispersão de energia por raios X (EDX), ela pode ser usada para a análise elementar da superfície da casca. Mais recentemente FESEM (emissão de campo SEM), pode ir para uma ampliação muito maior do que o SEM normalmente utilizada, assim se torna muito útil para nanopartículas menores. Imagens de alta ampliação do FESEM podem fornecer informações sobre a superfície da partícula, fornece dados que mostram se a superfície é lisa ou áspera, por exemplo (GARUD; SINGH; GARUD, 2012).

A microscopia eletrônica de transmissão (MET) fornece informações muito importantes, como: confirmação da formação de núcleo e superfície através da diferença de contraste, tamanho total de partícula, tamanho do núcleo, espessura da superfície, revestimento de superfície uniforme ou não uniforme, e outros. O tamanho e a morfologia das partículas podem ser facilmente medidos. Para uma ampliação muito maior, é usado HR-TEM (TEM de alta resolução). As imagens fornecem informações sobre cristalinidade, e mesmo o espaçamento dos materiais do núcleo / superfície. A microscopia eletrônica de transmissão de varredura (STEM) acoplada à espectroscopia de perda de energia de elétrons (EELS) ou com espectroscopia de dispersão de raios X (EDS) é usada para fornecer informações mais valiosas sobre a estrutura (PARHI; SURESH, 2012).

Também é utilizada a microscopia de força atômica (AFM) que utiliza força atuando entre uma superfície e uma ponteira, resultando em uma resolução espacial de até 0,01 nm para geração de imagens. Uma das vantagens marcantes da AFM é a simplicidade da preparação da amostra, já que não é necessário vácuo durante a operação e a amostra não precisa ser condutora. Portanto, tem o potencial para a análise direta das amostras originalmente hidratadas contendo solvente (DRAKE et al., 1989). No entanto, as partículas submicrométricas não podem ser avaliadas sem etapas preparatórias, como remoção de solvente, o que pode causar mudanças substanciais na estrutura molecular das partículas (KIRBY; GUNNING; MORRIS, 1995).

2.2.2 Diâmetro Hidrodinâmico

O DLS (também conhecido como espalhamento dinâmico de luz) mede a flutuação da intensidade da luz difusa causada pelo movimento das partículas. Este método abrange uma faixa de tamanho de alguns nanômetros a cerca de 3 microns. Isso significa que o DLS é uma boa ferramenta para caracterizar nanopartículas, mas não é capaz de detectar micropartículas maiores. Este método é baseado na dependência do ângulo de difração no raio da partícula (espectros Fraunhofer). Partículas menores causam dispersão mais intensa em ângulos altos em comparação com as maiores. O DLS não mede o tamanho das partículas. Em vez disso, ele detecta os efeitos de dispersão de luz que são usados para calcular o tamanho das partículas. (GARTI;

SATO, 1988) A avaliação do diâmetro hidrodinâmico é constantemente usada para caracterização de nanopartículas em geral. Para formulações adequadas, são aceitos tamanhos menores que 1000 nm e baixo índice de polidispersão (PDI), esse índice reforça o nível de homogeneidade de uma amostra: quanto menor o seu valor, mais homogêneos serão os diâmetros da amostra. São considerados valores abaixo de 0.35 como índices aceitáveis (HERRERA; SAKULCHAICHAROEN, 2009). O diâmetro e PDI de um nanossistema pode ser influenciado por alguns parâmetros, os principais são: a composição da matriz lipídica e os princípios de desenvolvimento. Pode-se ter como exemplo a quantidade de surfactante utilizada, uma vez que ao aumentar a sua quantidade, as nanopartículas tendem a ficar menores (CHU; LIU, 2000; TAVEIRA, 2009)

2.2.3 Potencial Zeta

Quase todas as partículas em contato com um líquido adquirem uma carga elétrica em sua superfície. O potencial elétrico no plano de cisalhamento é chamado de potencial zeta. O plano de cisalhamento é uma superfície que separa a fina camada de líquido (camada líquida constituída de contra-íons) ligada à superfície sólida em movimento. O potencial zeta é um indicador importante e útil da carga superficial da partícula que pode ser usada para prever e controlar a estabilidade de suspensões ou emulsões coloidais. A medição do potencial zeta é frequentemente a chave para entender os processos de dispersão e agregação. (PARHI; SURESH, 2012)

O potencial zeta (PZ) indica o potencial de superfície das partículas, influenciado por modificações na interface da nanoestrutura com o meio dispersante. Esse parâmetro permite pressupor a estabilidade da formulação, visto que, é comum que a agregação das partículas seja menor se houver repulsão eletrostática entre elas. E também é possível antecipar possíveis interações com o fármaco adicionado (AKBARI; TAVANDASHTI; ZANDRAHIMI, 2011; TAVEIRA, 2009).

2.2.4 Taxa de incorporação do fármaco

A estrutura cristalina lipídica relacionada à natureza química do lipídio é um fator chave para determinar se uma droga seria expelida ou incorporada firmemente aos sistemas de transporte. Na estrutura das nanopartículas, o lipídio formando um estado altamente cristalino com uma rede perfeita levaria à expulsão das drogas. Por outro lado, a imperfeição da estrutura lipídica poderia oferecer espaço para acomodar as drogas. Como resultado, a estrutura de arranjo menos ordenado nas nanopartículas seria benéfica para a capacidade de carga do fármaco. A eficiência de aprisionamento (EE) é determinada pelo método espectrofotométrico após a centrifugação da dispersão

aquosa. Resumidamente, a quantidade de droga livre será detectada no sobrenadante e a quantidade de droga incorporada será determinada como resultado do fármaco inicial menos o fármaco livre (HOW et al., 2003).

2.2.5 Grau de Cristalinidade

O polimorfismo é definido como a capacidade de revelar diferentes estruturas em cristais, originando-se de uma variedade de conformações moleculares e empacotamento molecular (GARTI; SATO, 1988). É uma das rotas importantes de degradação física que afeta a estabilidade das formas das nanoestruturas, apesar de serem quimicamente idênticos, os polimorfos geralmente têm propriedades termodinâmicas diferentes, como ponto de fusão, padrão de difração de raios X e solubilidade (MARTIN et al., 1983). A caracterização do grau de cristalinidade e a modificação do lipídio são parâmetros muito importantes, pois correlacionam-se fortemente com a incorporação de fármaco e taxa de liberação (MULLER et al., 2008).

2.3 Interação entre nanomateriais e células

A era atual da nanomedicina utiliza dispositivos de tamanho nanométrico para atender às necessidades de diagnóstico e otimização de inúmeras patologias. Micelas poliméricas, lipossomas, conjugados polímero-fármaco, dendrímeros, nanopartículas biodegradáveis, nanopartículas de sílica, etc. são alguns exemplos de nanomateriais pesquisados em laboratórios ao redor do mundo. Alguns destes estão em estudos pré-clínicos e outros já utilizados na clínica. (KABANOV; ALAKHOV, 2002; DUNCAN, 2003; FAROKHZAD; LANGER, 2006; PEER et al., 2007)

Esses nanomateriais, podem levar fármacos, compostos químicos e DNAs recombinantes para áreas focais de diversas patologias, inclusive tumores, para maximizar o benefício clínico, diminuindo assim efeitos colaterais. Esses nanomedicamentos também podem atuar melhorando o diagnóstico precoce de enfermidades através de técnicas de imageamento. Uma característica excelente da utilização destas modalidades é a sua capacidade de “drug delivery” específico ao alvo, não apenas para o órgão desejado, mas também para compartimentos sub-celulares. Portanto, um novo paradigma para o fornecimento de medicamentos e a nanomedicina requer que os nanomateriais interajam de formas diferentes com a superfície de suas células-alvo. (RAJENDRAN; KNOLKER; SIMONS, 2010)

Uma nanopartícula quando está no meio externo de uma célula pode interagir com o exterior da membrana plasmática, o que pode levar a essa entrada desse nanossistema no interior da célula através de um processo denominado “endocitose”. A endocitose envolve múltiplos estágios. Primeiro, o nanossistema é englobada em

invaginações de membrana que são comprimidas para formar uma vesícula, também conhecidas como endossomas (ou fagossomas em caso de fagocitose). As células contêm populações heterogêneas de endossomas, cada um equipado com maquinarias endocíticas distintas, que se originam em diferentes locais da membrana celular. O próximo passo será a entrega do conteúdo dessas vesículas para estruturas vesiculares especializadas. Geralmente, a endocitose pode ser dividida em duas grandes categorias - fagocitose (captação de partículas grandes) e pinocitose (captação de fluidos e solutos) (GERMAIN, 2004).

2.4 Vias de internalização de nanopartículas em células

2.4.1 Endocitose

Nas células eucarióticas, em geral, o essencial mecanismo de internalização de partículas, incluindo nanomateriais, é a endocitose. Ela ocorre com o dinâmico rearranjo da bicamada, dos microtúbulos, dos filamentos de actina e filamentos intermediários que são componentes do citoesqueleto da maior parte das células eucarióticas (T et al., 2012; PY-DANIEL, 2017).

Geralmente as células utilizam-se da endocitose para internalizar nutrientes, modular transdução de sinais, reutilizar componentes da membrana plasmática e para diversas outras funcionalidades. Durante a endocitose, uma parte da membrana plasmática é invaginada de forma que uma bolha lipoproteica é formada no interior da célula, com destino ao citoplasma. Essa bolha, é constituída principalmente de lipídeos de membrana e outros constituintes do meio extracelular. Assim, a endocitose pode ser dividida em fagocitose e pinocitose (Fig. 1) (TREUEL; JIANG; NIENHAUS, 2013; T et al., 2012)

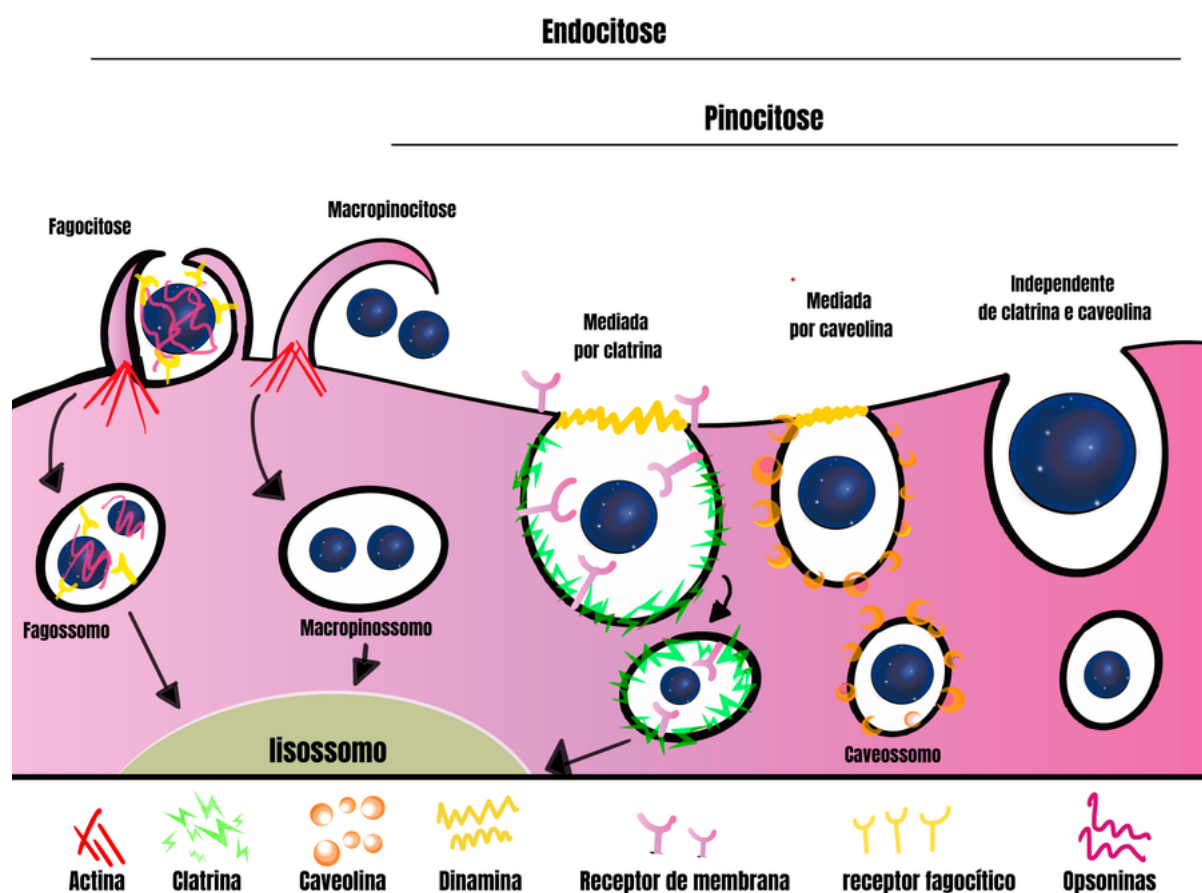


Figura 1 – Ilustração das principais vias de internalização de partículas pelas células.

Adaptado de PY-DANIEL, 2017

2.4.2 Fagocitose

A fagocitose é desempenhada, principalmente, por células do sistema imunitário, especialmente por macrófagos, monócitos e células dendríticas. As partículas endocitadas por essa via precisam inicialmente ser opsonizadas por moléculas como imunoglobulinas, proteínas do complemento e outras. Por isso, as nanopartículas opsonizadas se ligam à superfície da célula e interagem com o receptor de membrana, induzindo a membrana celular a emitir prolongamentos. A nanoestrutura ao ser totalmente englobada é internalizada formando dessa maneira o fagossomo. O fagossomo se desloca dentro da célula para se fundir com os lisossomos (XIANG et al., 2012).

2.4.3 Pinocitose

Já na pinocitose a vesícula endocitada é fundida ao endossomo e essa via é presente em virtualmente todos os tipos celulares. A pinocitose pode ser dividida em: Endocitose mediada por clatrina, endocitose mediada por caveolina, macropinocitose ou endocitose independente de clatrina-caveolina. Diversos aspectos são essenciais

para distinguir a internalização de um nanomaterial, como seu tamanho, formato, superfície etc. Assim, a via de internalização depende de uma série de elementos e características físico-químicas dos nanomateriais. (KOU et al., 2013)

2.4.4 Endocitose mediada por Clatrina

Na endocitose mediada por clatrina, a nanopartícula irá interagir com receptores da membrana plasmática, então, uma proteína citosólica nomeada clatrina-1 polimeriza-se sobre a invaginação no local em que a nanopartícula será internalizada. A vesícula será formada também a partir da membrana celular por meio da ativação da proteína dinamina, formando vesículas revestidas com clatrina (VRC). Outro fator fundamental no processo é a polimerização de actina e miosina para proporcionar a formação adequada da invaginação da membrana plasmática. A Endocitose mediada por Clatrina (EMC) pode culminar na deterioração lisossômica de nanomateriais. Portanto, a maneira pela qual a nanopartícula é endocitada pode causar a degradação da nanopartícula pelas enzimas lisossomais. Estudos de novas técnicas de escape dessa via, e conseqüentemente o escape da degradação lisossomal, pode promover a chegada do nanossistema ao alvo de interesse (KOU et al., 2013; PY-DANIEL, 2017).

2.4.5 Endocitose mediada por Caveolina

É a via mais comum de incorporação de nanopartículas nas células. Essa via pode resultar na não interação com lisossomos, assim, é a via estimada de desenvolvedores de nanossistemas. Ao ligar-se aos receptores na membrana celular, as nanopartículas são capazes de atuar mutuamente com os receptores para provocar a formação de vesículas, a partir da membrana lipídica, que é pinçada pela dinamina. A caveolina é encontrada nas invaginações da membrana plasmática denominada cavéola. As cavéolas são especialmente abundantes em células endoteliais (KOU et al., 2013; PY-DANIEL, 2017).

2.4.6 Endocitose independente de Clatrina e Caveolina

A endocitose independente de clatrina e caveolina é uma via diferenciada por depender do colesterol e exigir composições específicas de lipídeos para que ela ocorra. As dinaminas desempenham um papel especial nesta via, porém ela ainda é pouco compreendida. Atualmente as vias de endocitose independentes de clatrina e caveolina vêm sendo frequentemente estudadas (KOU et al., 2013; PY-DANIEL, 2017)

2.4.7 Macropinocitose

A macropinocitose é usualmente definida como uma via transiente, independente de clatrina e caveolina. Pode ser definida como a internalização de grandes quantidades de material extracelular, é caracterizada pela movimentação da membrana plasmática induzida pela ativação do citoesqueleto. Projeções citoplasmáticas se fundem a membrana como ondas ficando em grandes vacúolos endocíticos chamados macropinosomos (KOU et al., 2013; PY-DANIEL, 2017).

Em macrófagos, após a separação da membrana celular, macropinosomas movem-se no citosol e se fundem com os lisossomos. Em dessemelhança, em algumas células de câncer humano os macropinosomas se deslocam para a superfície da célula e liberam o conteúdo para o meio extracelular. Dessa forma, o destino dessas vesículas vai depender da célula alvo. Ainda que a manifestação de macropinocitose possa fornecer a impressão de ser um processamento incerto, trata-se na verdade de um processo bastante complexo e bem coordenado (KOU et al., 2013; PY-DANIEL, 2017).

Na maioria das vezes, as nanopartículas são internalizadas por mais de uma via, o que pode reverter em respostas biológicas distintas, uma vez que uma via pode provocar uma deterioração mais efetiva. (KOU et al., 2013; PY-DANIEL, 2017)

2.5 Terapia fotodinâmica

A luz tem sido utilizada como terapia há mais de três mil anos por civilizações dos quatro cantos do mundo. Povos antigos utilizavam a luz para tratar várias doenças, incluindo psoríase, raquitismo, vitiligo e câncer de pele. Há cerca de 100 anos pesquisadores observaram que combinar luz e produtos químicos específicos poderiam induzir a morte celular. Experimentos para testar combinações de reagentes e luz levaram à terapia que conhecemos hoje como Terapia fotodinâmica (TFD)(HILL, 1991). A TFD envolve dois componentes individualmente não tóxicos que são combinados para induzir efeitos, celulares e teciduais, de uma maneira dependente do oxigênio. O primeiro componente da TFD é o fotossensibilizante (FS) - molécula fotoativa que se localiza em uma célula e/ou tecido alvo. O segundo componente é a administração de luz de comprimento de onda específico que ativa o fotossensibilizante. O fotossensibilizante transfere energia da luz para o oxigênio molecular, para gerar espécies reativas de oxigênio (EROs).(HILL, 1991; GARG; AGOSTINIS, 2014).

Quando o fotossensibilizante recebe luz aplicada com o comprimento de onda adequado, este é excitado para seu estado singleto. Ao decair para o estado tripleto, o fotossensibilizante poderá transferir energia para o oxigênio molecular ou envolver-se em um processo de transferência de elétrons que levará à formação de radicais e

consequentemente, espécies reativas de oxigênio (EROs), que possuem efeitos citotóxicos. (WAINWRIGHT, 1998) Sua eficácia decorre da indução direta de morte das células neoplásicas por estresse oxidativo, da destruição da microvasculatura tumoral e do reforço/ativação da imunidade antitumoral (Fig. 2) (GARG et al., 2014).

A ativação do sistema imunitário pela TFD tem sido objeto de estudo em diferentes grupos de pesquisa nos últimos anos, pois, se induzida de maneira adequada, pode não apenas levar à destruição do tumor primário, mas também de focos metastáticos, estabelecendo uma proteção imunitária sistêmica de longa duração contra possíveis recidivas. O evento é explicado pelo estresse oxidativo desencadeado no retículo endoplasmático rugoso (RER) que além de promover morte celular por apoptose, pode desencadear a morte celular imunogênica (MCI). (GARG et al., 2014; GARG; AGOSTINIS, 2014)

Isso acontece porque um programa de sinalização intracelular envolvendo chaperonas, conhecido como resposta de proteínas mal dobradas, é disparado em resposta a estresse no RER, o qual pode reduzir o estresse ou induzir MCI. Na MCI, a célula sofre apoptose e libera padrões moleculares associados a dano (DAMP). Fora das células esses DAMPs são capazes de ativar vários receptores de células do sistema imunitário, eventualmente levando à maturação e à ativação de células apresentadoras de antígenos, tais como as células dendríticas e macrófagos, que por fim ativam células T (CD8+), criando uma imunidade antitumoral (KORBELIK et al., 2015; GARG et al., 2014; GARG; AGOSTINIS, 2014; GARG et al., 2016)

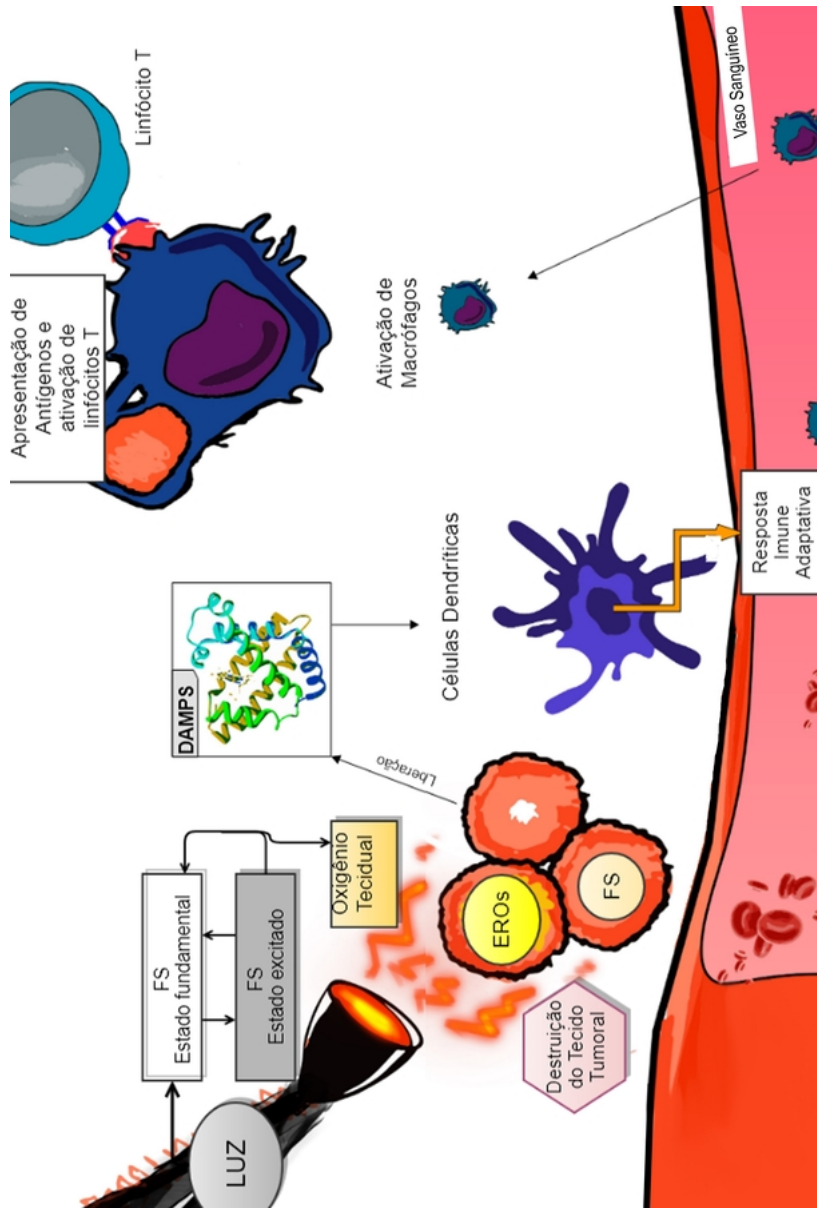


Figura 2 – A TFD requer três elementos: luz, fotossensibilizante e oxigênio. Quando o fotossensibilizante é exposto a uma fonte luminosa, de comprimento de onda específico, ele vai do estado fundamental ao estado excitado. Ao retornar ao estado fundamental ele libera energia que é transferida ao oxigênio, gerando espécies reativas de oxigênio (EROs), e radicais livres que possuem efeitos citotóxicos. Durante a morte de células neoplásicas, estas podem liberar padrões associados a dano (DAMPs) que irão ativar células do sistema imunitário levando ao reforço/ativação da imunidade antitumoral.

2.5.1 Fonte de Luz

Inicialmente, no advento da terapia fotodinâmica, eram utilizadas lâmpadas convencionais, porém, estas não eram tão eficazes por serem policromáticas e não congruentes. A policromaticidade apresentada por esse tipo de fonte de luz culmina no depósito de parte da energia fora da faixa de absorção do FS, levando a reações adversas, como aquecimento e diminuição da sua eficiência. Essa desvantagem foi então contornada com o surgimento dos equipamentos a laser, amplamente mais eficiente que as lâmpadas convencionais por apresentarem monocromaticidade, coerência, e direcionalidade, devido à capacidade da luz de se propagar em uma única direção. Posteriormente foram desenvolvidas novas fontes, baseadas em dispositivos de LEDs (diodos emissores de luz - Light Emitting Diode) (MACHADO, 2000). Estas apresentaram baixo custo de produção e de manutenção, e não demandam treinamentos complexos para sua utilização. Atualmente os LEDs são amplamente utilizados como fontes de luz para a terapia fotodinâmica, e assim, utilizados para ativação de inúmeros fotossensibilizantes, este, assim como o laser apresenta luz monocromática (WALSH, 2003). LEDs também apresentam a possibilidade de serem projetados para emitir luz com comprimentos de ondas específicos, promovendo um amplo leque de aplicações.

2.6 Conjugação de biomoléculas em nanossistemas

A conjugação de nanopartículas com biomoléculas, como proteínas, peptídeos, DNA e outros pode ser geralmente feita por ligação covalente direta entre a partícula e as biomoléculas (PELLEGRINO et al., 2005; VERMA; ROTELLO, 2005; ROSI; MIRKIN, 2005). Esta conjugação pode ser conseguida através do processo de adsorção química da biomolécula na superfície da partícula ou através da utilização de alguns ligantes. A quimissorção de proteínas na superfície de nanopartículas pode ser feita através de resíduos de cisteína que estão presentes na superfície da proteína (por exemplo, oligopeptídeo, albumina sérica) (NAKA et al., 2003)

As biomoléculas são frequentemente ligadas covalentemente a ligantes na superfície das nanopartículas por meio de estratégias tradicionais de acoplamento, como amidação e esterificação mediada por carbodiimida. Para aplicações biológicas, o oligo-etilenoglicol (OEG) ou o polietilenoglicol (PEG) são utilizados no ligante para aumentar a estabilidade das biomoléculas ligadas e minimizar a adsorção não específica de outros materiais (DE; GHOSH; ROTELLO, 2008).

2.6.1 Fotossensibilizantes do tipo benzo[a]fenoxazínio

Como dito anteriormente, a TFD depende também de uma substância fotossensibilizante, que pode ser considerado como o principal ativador dos processos fotofísicos

e fotodinâmicos. Os Fotossensibilizantes são na maioria das vezes compostos atóxicos no escuro, estes, em seu estado fundamental são inativos e possuem características fotofísicas que permitem a absorção da luz. Por serem capazes de absorverem luz com eficiência em determinadas faixas do espectro, muitos compostos possuem a capacidade de induzir ou de participar de mecanismos fotoquímicos (KONOPKA; GOSLINSKI, 2007; SOUSA JUNIOR, 2017).

A localização do fotossensibilizante é um fator importante que determina a eficácia da TFD. Nos últimos anos, vários fotossensibilizantes mais seletivos para tumores foram desenvolvidos. A localização do fármaco pode ser determinada pela permeabilidade vascular e difusão intersticial, que dependem do tamanho molecular, carga e propriedades hidrofílicas ou lipofílicas de um composto, bem como das propriedades fisiológicas dos vasos sanguíneos. A ligação do fármaco com vários componentes do tecido também pode influenciar o seu transporte e retenção em tumores (OSTROWSKI et al., 2015).

Dentre os fotossensibilizantes com resultados promissores na terapia fotodinâmica, os corantes benzofenoxazínicos têm recebido crescente destaque. Eles constituem uma classe de cromóforos catiônicos facilmente sintetizados que possuem propriedades químicas e físicas que o caracterizam como um fármaco fotoquimioterapêutico eficaz. Eles são estáveis em condições fisiológicas e absorvem eficientemente a luz vermelha (CINCOTTA; FOLEY; CINCOTTA, 1987). Fotossensibilizantes derivados de benzo[a]fenoxazínio se destacam por possuir uma boa fotoestabilidade, alta absorção molar, absorção de longo comprimento de onda e rendimento quântico de fluorescência relativamente baixa. Alguns grupos de pesquisa têm estudado os derivados benzo[a]fenoxazínio como potenciais fármacos antimaláricos e antifúngicos (LEITÃO et al., 2016; MIZUKAWA et al., 2014; SONG et al., 2017). O potencial de derivados de benzo[a]fenoxazínio em TFD anticâncer dos corantes de benzo[a]fenoxazínio ainda é pouco estudado.

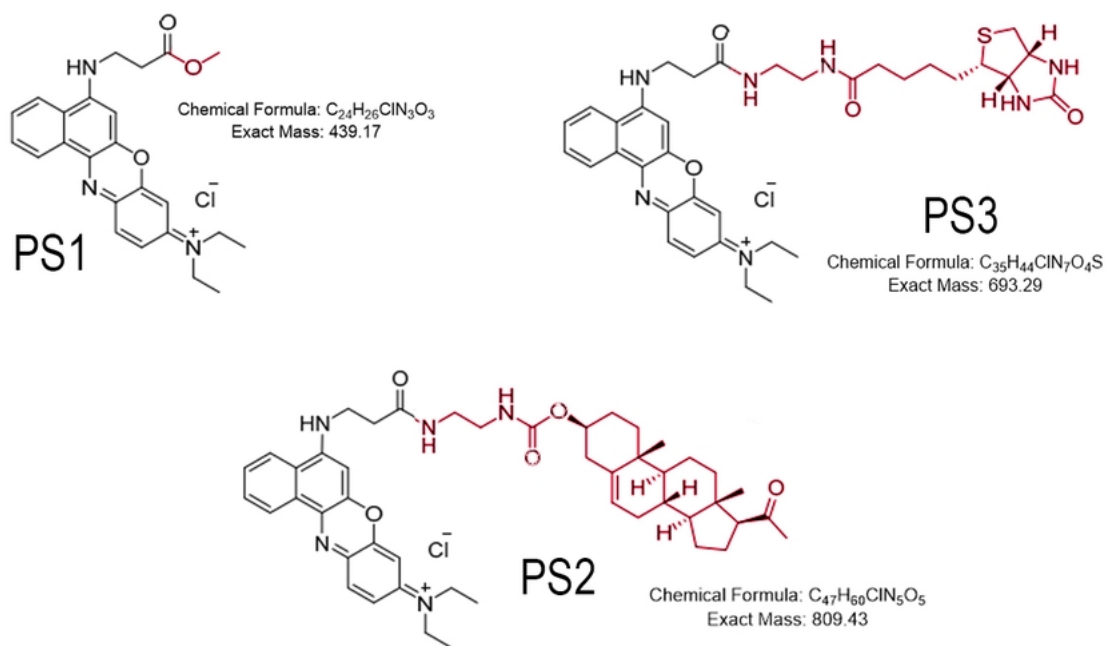


Figura 3 – Estruturas de cloretos de benzo [a] fenoxazínio utilizados no presente trabalho. Em vermelho, os grupamentos conjugados nas moléculas de benzo [a] fenoxazínio. Grupamento metoxi em PS1, Pregnenolona em PS2 e Biotina em PS3.

Adaptado de Zhang et al. 2018

3 JUSTIFICATIVA

O potencial anticâncer de fotossensibilizantes derivados de benzo[a]fenoxazínio ainda é pouco estudado. A incorporação desse tipo de FS em nanossistemas é uma grande inovação tecnológica para a aplicação em novos protocolos de terapia fotodinâmica, inovação que ainda não foi encontrada na literatura até o momento. Nesse contexto, surge a necessidade do desenvolvimento de novos fotossensibilizantes, para TFD em tratamentos anticâncer. O presente trabalho apresenta o desenvolvimento de nanossistemas de fabricação simples, com componentes já estabelecidos como pouco tóxicos, permitindo assim maior facilidade de produção e aplicabilidade na TFD. Adicionalmente, elucidar como os nanossistemas desenvolvidos se comportam quando expostos a sistemas biológicos é um passo fundamental para a compreensão de sua possível utilização clínica. No presente trabalho utilizou-se três fotossensibilizantes do tipo benzo[a]fenoxazínio. O primeiro foi ligado a um grupamento metoxi. O segundo, conjugado com biotina, que é uma molécula bem conhecida de direcionamento de tumor e tem sido usada para entrega seletiva de fotossensibilizantes para tecidos tumorais. (ZHANG et al., 2018). E por fim, o terceiro, é uma combinação de benzo[a]fenoxazínio e pregnenolona. A pregnenolona, conhecida como precursora da maioria dos hormônios, já é estudada como carreador de drogas anticâncer. Além disso, vários tipos de derivados de pregnenolona foram relatados como tendo atividade anticâncer por diversos grupos de pesquisa pelo mundo (ZHANG et al., 2018). Portanto, o presente projeto teve como foco desenvolver nanossistemas contendo fotossensibilizantes do tipo benzo[a]fenoxazínio conjugado com biotina e pregnenolona, e estudar sua atividade biológica em diferentes tipos de células tumorais ou não.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Desenvolver nanoestruturas contendo fotossensibilizantes do tipo benzo[a]fenoxazínio para uso em terapia fotodinâmica e estudar sua interação biológica *in vitro* com diferentes linhagens celulares (Fig. 4).

4.2 Objetivos Específicos

4.2.1 Capítulo 1

- Desenvolver e caracterizar lipossomas contendo fotossensibilizantes do tipo benzo[a]fenoxazínio.
- Analisar interação biológica *in vitro* de nanossistemas contendo fotossensibilizantes dopados com pregnenolona, em linhagens com diferentes expressões de receptores para pregnenolona.

4.2.2 Capítulo 2

- Desenvolver e caracterizar nanopartículas lipídicas sólidas contendo fotossensibilizantes do tipo benzo[a]fenoxazínio.
- Analisar interação biológica *in vitro* de nanossistemas contendo fotossensibilizantes dopados com biotina, em linhagens com diferentes expressões de receptores para biotina.

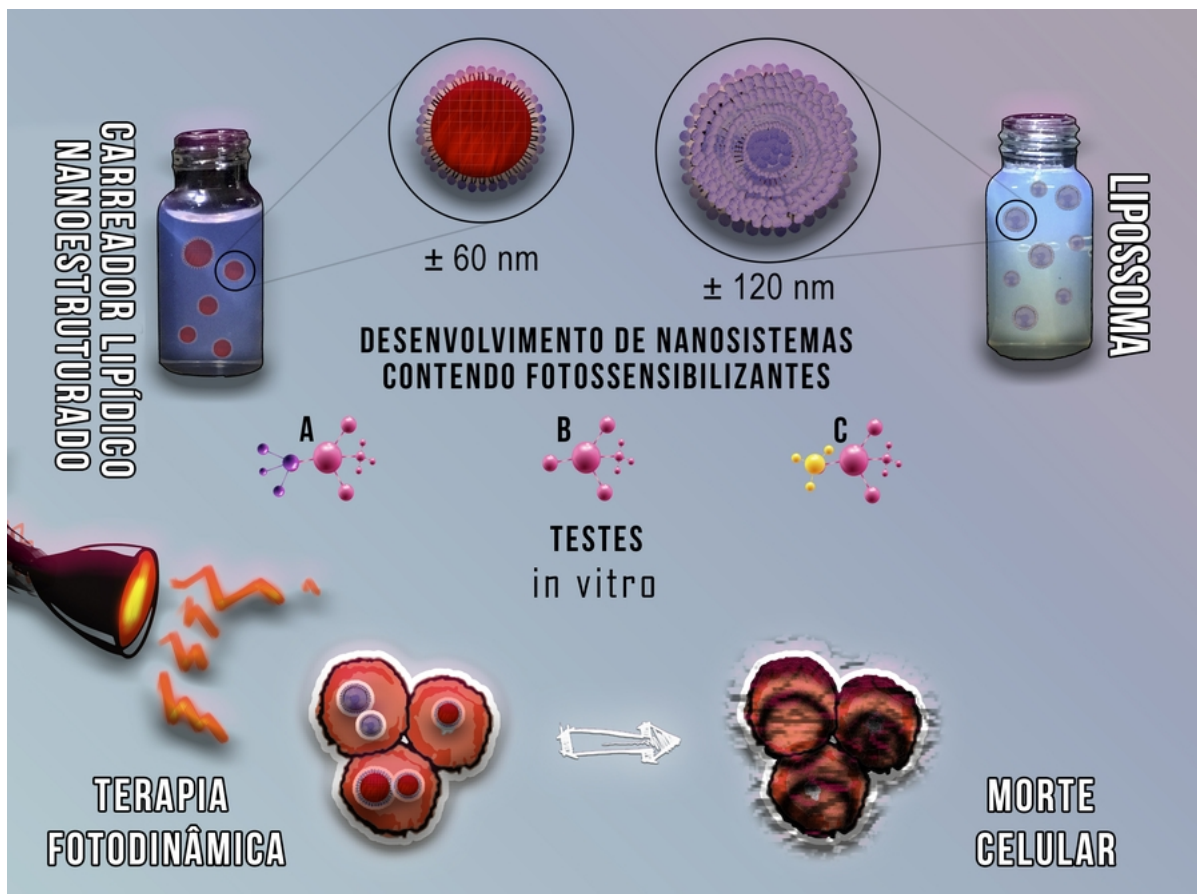


Figura 4 – Esquema geral do trabalho

Preparation, characterization and biological activity evaluation of liposomes containing benzo[a]phenoxazinium photosensitizers associated with pregnenolone

Victor Carlos Mello Silva^{1*}, Luís Alexandre Muehlmann²

¹*Institute of Biological Sciences, University of Brasília, Brasília 70910900, Brazil*

²*Faculty of Ceilandia, University of Brasília, Brasília 72220275, Brazil*

**Corresponding author: luismuehlmann88@gmail.com*

Abstract

Studies that aimed at the association of nanotechnology with photodynamic therapy (PDT) have increased significantly, since it has become a safe and less invasive option than the conventional options. The liposomes presented in this study contain photosensitizers associated with pregnenolone, a Benzo[a]phenoxazinium dye, developed by J. Zhang et al. (2018). The benzofenoxazinic dyes are a class of easily synthesized cationic chromophores that possess chemical and physical properties that characterize it as an effective photosensitizing drug. Thus, the aim of the present study is to develop liposomes containing pregnenolone associated benzo[a]phenoxazinium compounds and study its anticancer activity in vitro. Liposomes contained benzo[a]phenoxazinium derivatives PS1 e PS2 bearing different functional groups in the amino side chain (methyl propionate em LIPS1 e Pregnenolone em LIPS2) were prepared for the first time. The investigation on optical properties of LIPS1 and LIPS2 in water indicated that they are red light absorbers with low fluorescence quantum yields. Reinforcing the results presented by Zhang et al. (2018) about free photosensitizers. The ROS production study revealed that these nanosystems produced ROS in an energy-dependent fashion, with LIPS1 having the highest ROS quantum yield. In this study the anticancer PDT activities of this liposomes contained benzo[a]phenoxaziniums were evaluated. The results described in this report suggest that these new nanosystems are potential candidates as PSs for anticancer PDT.

Introduction

Conventional anticancer treatments (chemotherapy, radiotherapy, surgical removal and others), although sometimes promising, are aggressive and invasive. For this reason, studies that aimed at the association of nanotechnology with photodynamic therapy (PDT) have increased significantly, since it has become a safe and less invasive option than the conventional options. PDT uses light at a specific wavelength, molecular oxygen and a photosensitizing agent, which may have increased efficacy when carried

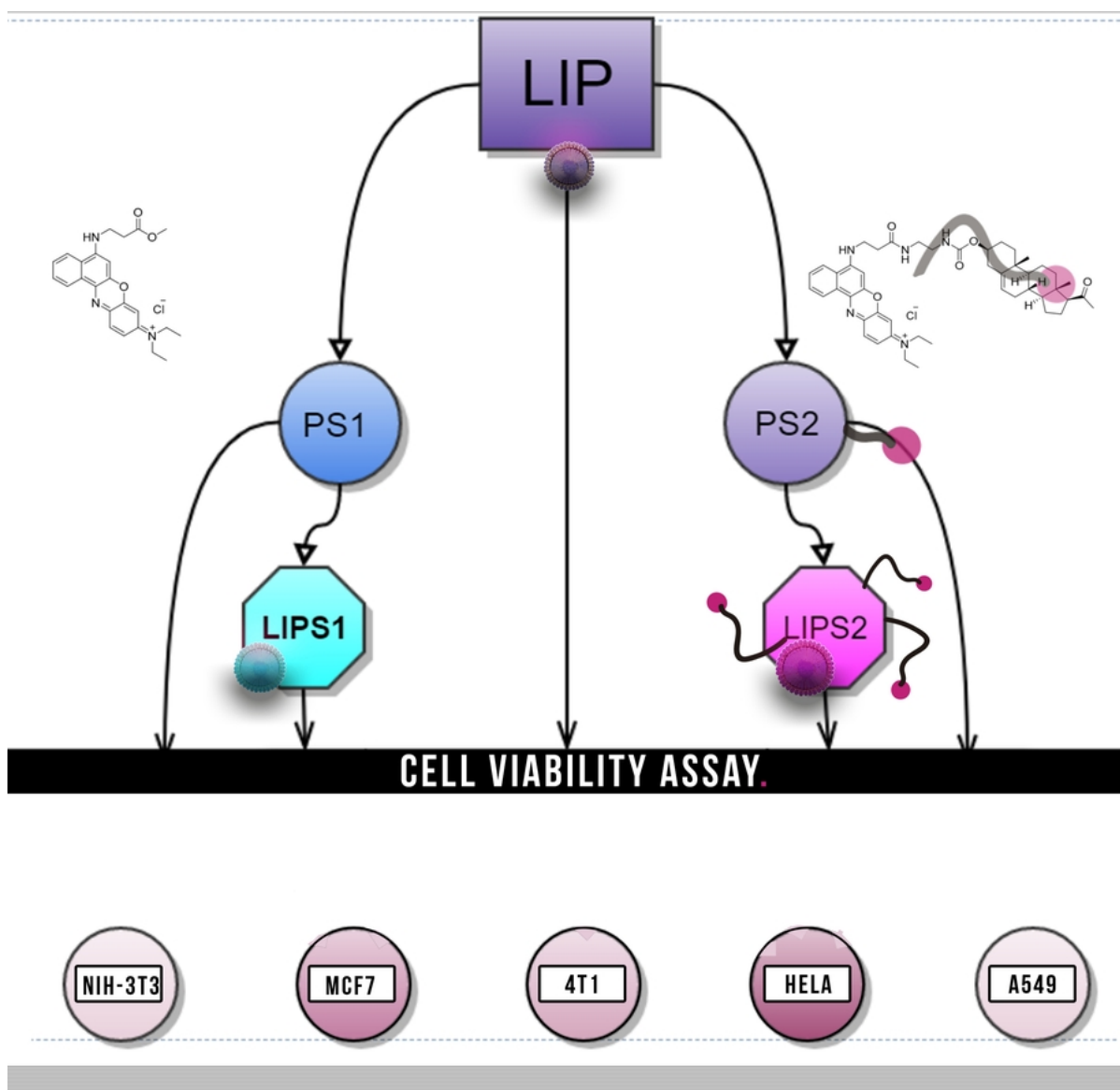
by nanostructures, when it is specifically targeted to the tumor. (RODRIGUES, 2014; GARG; AGOSTINIS, 2014)

In photodynamic therapy, nanostructures have important functions, since they have a high encapsulation capacity, and are more actively or passively directed, they direct the PS, in a controlled way. (GARG et al., 2016)

Liposomes are round vesicles consisting of one or more lipid bilayers formed by amphiphilic phospholipids (phosphatidylcholine, phosphatidylserine, phosphatidylglycerol) with an aqueous core forming lamellae, which can encapsulate hydrophilic and / or lipophilic substances. They are biodegradable, biocompatible, non-immunogenic and may reduce drug toxicity and may act to increase therapeutic efficacy, thus widely used in research (MARCIELLO et al., 2016). In addition, since liposomes are rapidly removed from circulation by macrophages, they are incorporated with gangliosides or polyethylene glycol (PEG) to increase their long life in the body and improve delivery of drugs to target tissues(GARG et al., 2014; BATISTA; CARVALHO; MAGALHÃES, 2007; FOLEY et al., 2006).

The liposomes presented in this study contain photosensitizers associated with pregnenolone, a benzo[a]phenoxazinium dye, developed by J. Zhang et al. (2018). The benzofenoxazinic dyes are a class of cationic chromophores that possess chemical and physical properties that as an effective photosensitizing drug (CINCOTTA; FOLEY; CINCOTTA, 1987). There are already studies using benzo[a]phenoxazinium derivatives as antimalarials, and used especially as photosensitizing for photodynamic therapy in antimicrobial treatments (LEITÃO et al., 2016; ZHANG et al., 2018). However, the anti-cancer potential of benzo [a] fenoxazinium dyes has been little investigated (CINCOTTA; FOLEY; CINCOTTA, 1987).

Thus, the aim of the present study is to develop liposomes containing pregnenolone associated benzo[a]phenoxazinium compounds and study their anticancer activity in vitro. (fig. 1)



CAPTION



Figure 1 – Simplified scheme showing the treatments used in cell viability tests. LIP (Liposome without photosensitizing agent); PS1 (Photosensitizer without pregnenolone); PS2 (photosensitizer with pregnenolone); LIPS1 (Liposome containing photosensitizer PS1); LIPS2 (Liposome containing photosensitizer PS2); PRX (Pregnenolone)

Materials

Dimethyl sulfoxide (DMSO), 1,3-diphenylisobenzofuran (DPBF) and Kholiphor® HS15 were obtained from Sigma, USA. Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) were obtained from Gibco, EUA. The 3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) was purchased from Invitrogen, EUA. The phosphate buffered saline (PBS) was supplied by Laborclin, Brazil. Soy phosphatidylcholine (PC) (Lipoid S 100, Lipoid GmbH, Germany), cholesterol (Chol), oleic acid (OA), cloroform and methanol were supplied by Sigma Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA). Cells derived from human mammary adenocarcinoma (MCF7 - ATCC-HTB-22TM), human lung adenocarcinoma (A549 - ATCC-CCL-185TM), murine breast cancer (4T1 – ATCC-CRL-2539), cervical cancer with human papilloma vírus (HeLa – ATCC- CCL-2TM) and murine fibroblast cells (NIH/3T3 - ATCC-CRL-1658TM) were used in the in vitro assays.

Methods

Preparation of Liposome

Liposomes were prepared by the hydration of the thin lipid film, soy phosphatidylcholine:cholesterol:oleic acid (7.2:1.8:1) were dissolved in chloroform: metanol mixture (2:1 v/v). Thin film was prepared by a rota-evaporator (rotovapor RII, Buchi) for 2 hours at 40 °C. In the next step, the lipid film was hydrated with 20 mL phosphate buffer (ph 7.4) during 1 hour at 100 rpm. The suspension was left overnight at room temperature for swelling and the next day for particle size reduction, the dispersion was sonicated using rod sonicator (Sonics) for 10 min with 20% amplitude and with 30 seconds interval every 1 minute. At the end of sonication, the suspension was centrifuged for removing the titanium residues released during the sonication process. For preparation of liposomal formulation of photosensitizers (PSs), the respective photosensitizer (PS1 (1.48 mg) and PS2 (1.65 mg) was added to the lipids to form the thin lipid film.

Evaluation of colloidal properties

The average particle size and polydispersity index (PDI) of liposome were evaluated at 25 °C by photon correlation spectroscopy and electrophoretic laser Doppler velocimetry (ZetaSizer Nano ZS®, Malvern Instruments, Malvern, UK) with the angle of 90°. Prior to measurement, samples were diluted with distilled water (1:10, v:v).

Spectroscopic analysis

The photophysical characteristics of the nanostructures were evaluated through the absorption spectra. For this test, the nanostructures and photosensitizers were dilu-

ted in a concentration of 10 μ M. After this 200 μ L of the samples were organized in 96-well plates in triplicate and its photophysical characteristics were measured in a spectrophotometer between 350 and 750 nm.

Evaluation of ROS production

The method used in this procedure employed the 1,3-diphenylisobenzofuran (DBF) to evaluate the ability of the sample to produce singlet oxygen. The absorption peak of DBF is 414 nm and it works directly with the molecule degradation. The most singlet oxygen is generated, the most the molecule is degraded and its absorbance decreases squarely to the generation of these EROs. Then, 10 μ L of a solution of DBF in ethanol (0.22 mg/mL) were added to each aliquot. At first, the sample was read without irradiation, in a spectrophotometer. Afterward, the plate was read and also irradiated at different irradiation times of the photosensitizers. The absorbance values of the pure compounds at their respective concentrations at 414 nm were used as blank. The whole experiment was carried out in the dark. Two independent experiments were performed.

Transmission electron microscopy (TEM)

For the TEM, 8 μ L of the samples at 0,1% (v/v in distilled water) were placed in a copper electron microscopy grid. For lipid staining, the grid was exposed to osmium atmosphere for 5 minutes. The micrograph was obtained under 80 kV, with a magnification of 25000 times by the JEOL JEM 1011 100 kV system.

Biological assays

In vitro treatment design.

The cytotoxicity of the compounds, encapsulated or not, were evaluated after exposure for a period of 15 minutes, followed by irradiation for 30 minutes. The concentrations used were 30.0 μ M, 15.0 μ M, 7.5 μ M and 3.8 μ M. PS1 photosensitizing agent derived from benzo[a]phenoxazinium and PS2 also derived from benzo[a]phenoxazinium, but conjugated to a pregnenolone residue, were tested. Briefly, 1 x 10⁴ cells/well of MCF7, 4T1, A549, HeLa or NiH-3T3 were plated and after 24 hours, 100 μ L of the diluted compounds in medium were added to the wells and exchanged by pure medium after 15 minutes. (fig. 2)

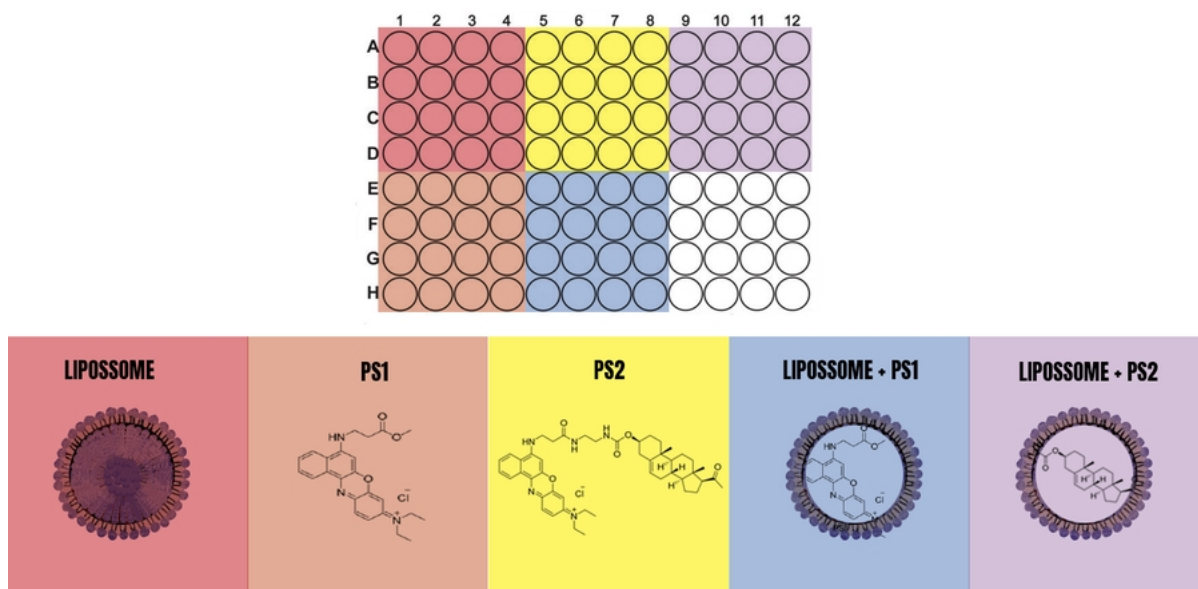


Figure 2 – Treatment layout

Cell viability assay

The cells were treated as described above, then exposed to 200 μ L of 3,(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) solution (0.5 mg/mL in culture medium), as previously described. Next, the MTT solution was removed, the cells were washed with PBS, and the formazan formed by viable cells was extracted with 200 μ L DMSO. The absorption at λ 595 nm was then measured using a spectrophotometer (SpectramaxM2; Molecular Devices LLC). This experiment was performed in quadruplicate for each treatment, and the results were expressed as percentages relative to control.

Statistical analyzes

Data were analysed with GraphPad Prism® version 6.0 software (GraphPad Software, La Jolla, CA). Significant differences between data sets were assessed by one-way or two-way ANOVA, with Tukey's or Sidak's post-tests ($\alpha= 0.05$). Quantitative results were expressed as mean \pm standard error of the mean or mean \pm standard deviation of the mean.

Results and discussion

Nanoparticles preferentially accumulate in solid tumors due to passive and active vectorization mechanisms. Passive vectorization is the accumulation of nanoparticles in solid tumors due to the abnormal architecture of the microvasculature present in solid tumors. Normally, the vascular endothelium is composed of fenestrations of size

between 5 and 10 nm. . In solid tumors, aberrant vessels have much larger fenestrations (100 to 780 nm). Thus, nanoparticles with a mean size of 200 nm can enter the broader fenestrations of solid tumor aberrant vessels but can not enter the narrow endothelial fenestrations of normal tissues. As a result, the increased accumulation of drug nanoparticles in the tumor with little or no nanoparticle in normal tissues can be seen. This mechanism is also known as enhanced permeability and retention (EPR). In some cases, this phenomenon may increase the concentration of the drug encapsulated in solid tumors by 70-fold. (HOBBS et al., 1998; LIECHTY; PEPPAS, 2012)

Active vectorization is characterized by the use of surface ligands of nanoparticles that interact specifically with tumor cells. In addition to directing the nanosystem to the tumor mass, these ligands interact with receptors on the cells surface, interfering with signal transduction, regulating the expression of protooncogenes and altering the mechanisms of cell proliferation. In brief, the nanoparticles can be used to encapsulate cytotoxic drugs and, in addition, may have linkers on their surface which will interact with specific solid tumors cells. (LIECHTY; PEPPAS, 2012; DANHIER; FERON; PRÉAT, 2010; HOBBS et al., 1998)

This lipid nanosystem was chosen because it provides adequate delivery of the photosensitizer, since the pregnenolone receptor (PRX) is a nuclear receptor. Thus, the liposome, upon fusing with the cell membrane of the tumor cell, could facilitate the delivery of the photosensitizer to the nucleus.(fig. 3) (KLIEWER; GOODWIN; WILLSON, 2002)

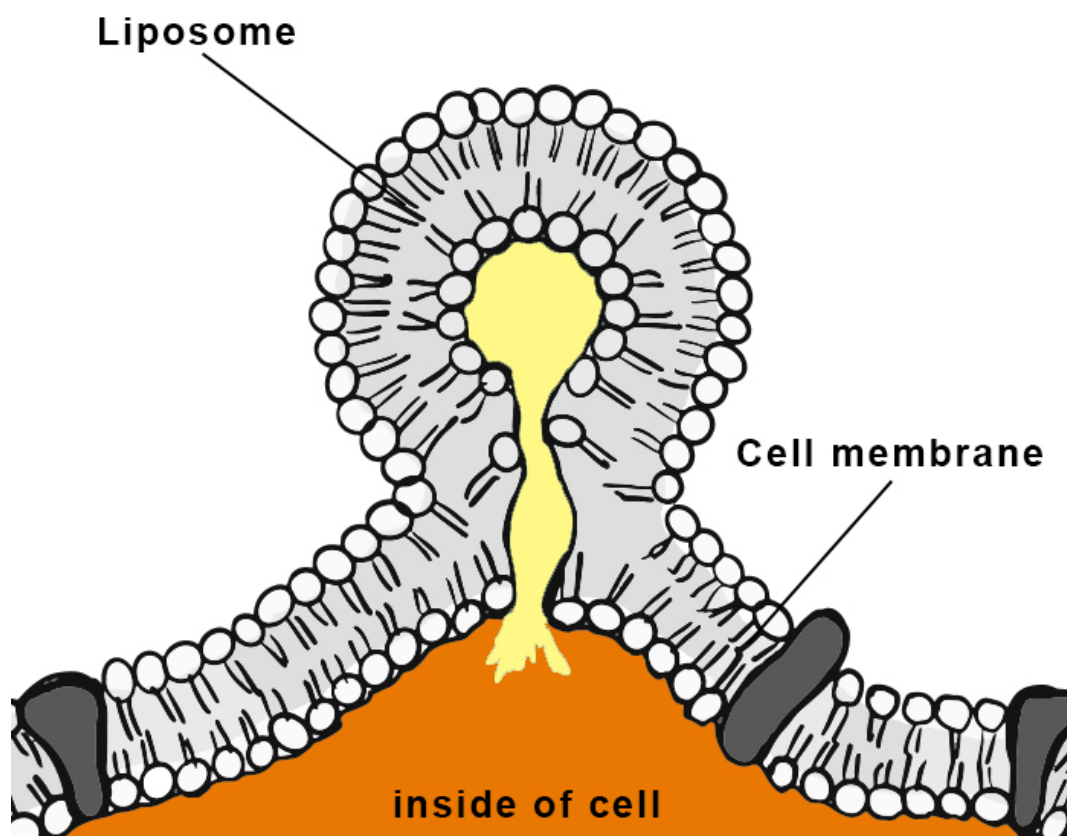


Figure 3 – Liposome-cell interaction. Liposomes can fuse with the cell membrane, and release their contents into the cell cytoplasm.

Liposome formulations were produced by the thin film hydration technique (GHANBARZADEH; VALIZADEH; ZAKERI-MILANI, 2013). The lipid film was composed of soy phosphatidylcholine (SP), cholesterol (Chol) and oleic acid (OA). For liposomal formulation containing SP:Chol:OA in the proportions 7.2:1.8:1, the best percentage of OA (10, 20 or 30%), as well as the sonication time (5, 10 and 15 minutes) were studied and assessed to be added in the formulation. The parameters hydrodynamic diameter, polydispersity index, zeta potential and visual analysis were used to evaluate the formulations obtained. The liposome containing 10% oleic acid and was homogenised for 10 minutes in the rods sonicator didn't separate phase, it remained homogeneous and translucent with a PDI value 0.135 ± 0.022 indicating monodisperse population of liposomes (SOEMA et al., 2015). The macroscopic aspect of the liposomes can be seen in figure 4.

The liposomes diameter remained similar (between 112 nm and 125 nm) for

both the free and associated liposome photosensitizers (Table 1). Zeta potential (PZ) was also determined for liposomes with and without photosensitizers (Table 1). There was no difference between the PDI of the developed liposomes. All presented excellent PDI, remaining below 0.14. It was observed that the zeta potential of the liposomes were all negative, and the PS2-containing liposome formulation obtained the most negative charge (-32.8 ± 1.31 mV) followed by the free liposome (-29.5 ± 1.31 mV), and finally the liposome containing PS1 (-20.5 ± 1.42 mV). The PZs the scientific term for the electrokinetic potential in colloidal systems, an electrokinetic value associated with the magnitude of the surface charge of the particles in a colloidal system, where this potential exists between the surface of the particle and the dispersant liquid (HONARY; ZAHIR, 2013). The literature reports that negative zeta potential values favor endocytosis by electrostatic interaction between the negative charge of the particle and positive sites present on the cell membrane (HONARY; ZAHIR, 2013). The surface charge of the nanoparticles is an important parameter involved in their cell interiorization. Negative surface nanoparticles showed resistance to protein adsorption present in fetal bovine serum, an event that favors their interiorization by lung adenocarcinoma cells (CAO et al., 2014). In addition, the carboxylate moieties of the nanocapsules could also interact by hydrogen bonding with polar molecules of the cell surface (YONCHEVA; LIZARRAGA; IRACHE, 2005).

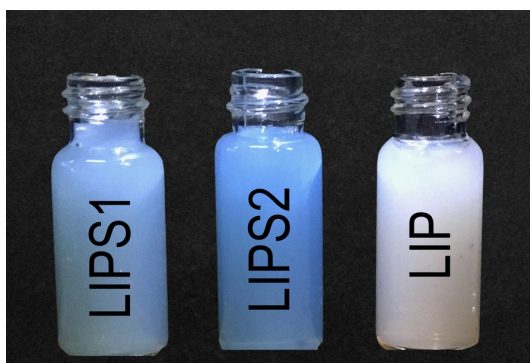


Figure 4 – Macroscopic aspect of Lipossomes

Table 1 – Physicochemical characteristics of liposomes. PS = particle size (diameter), Pdl = polydispersity and ZP = zeta potential.

Formulation	PS (nm)	PDI	ZP (mV)
Liposome (LIP)	125.1 ± 0.346	0.135 ± 0.022	- 32.8 ± 1.31
PS1-Liposome (LIPS1)	112.2 ± 1.674	0.138 ± 0.025	-20.5 ± 1.42
PS2-Liposome (LIPS2)	123.6 ± 0.416	0.139 ± 0.018	- 29.5 ± 1.31

Spectroscopic analysis.

The liposomes studied presented a wide band of light absorption, ranging from about 550 to 700 nm, as shown in Fig. 3. This is an important information of LIPS1 e LIPS2 regarding its potential application as a PS for anticancer PDT. The importance of this property derives from the optical characteristics of biological tissues. Most tissues have endogenous pigments, mainly hemoglobin, that absorb light intensely between 400 and 600 nm, interfering in the activation of PS and consequently reducing the PDT efficacy. Still, light with wavelengths above 800 nm does not have enough energy to activate PS (SIBATA et al., 2000).

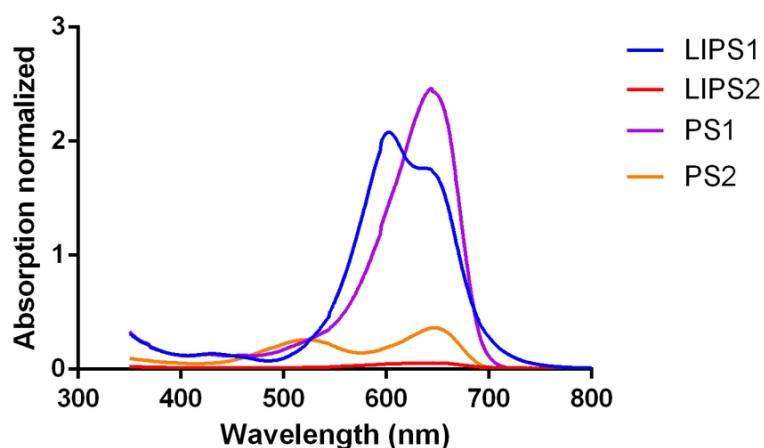


Figure 5 – Absorption spectrum of PS1-Liposome (LIPS1), PS2-Liposome (LIPS2), PS1 and PS2 diluted in water (PS concentration is 10 μM).

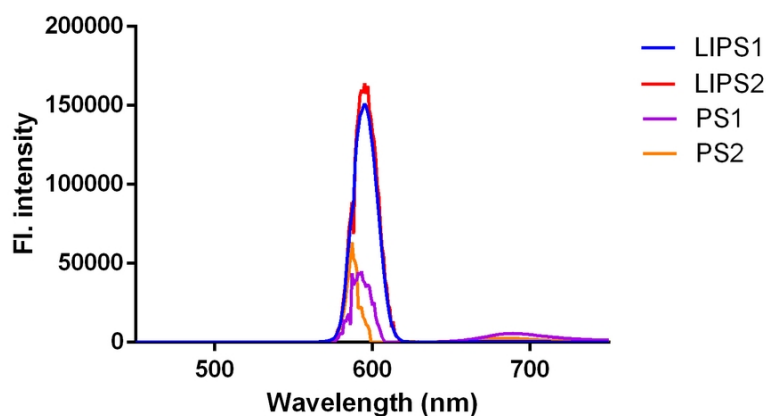


Figure 6 – Fluorescence spectrum of PS1-Liposome (LIPS1), PS2-Liposome (LIPS2), PS1 and PS2 diluted in water (PS concentration is 10 μM).

Evaluation of ROS production

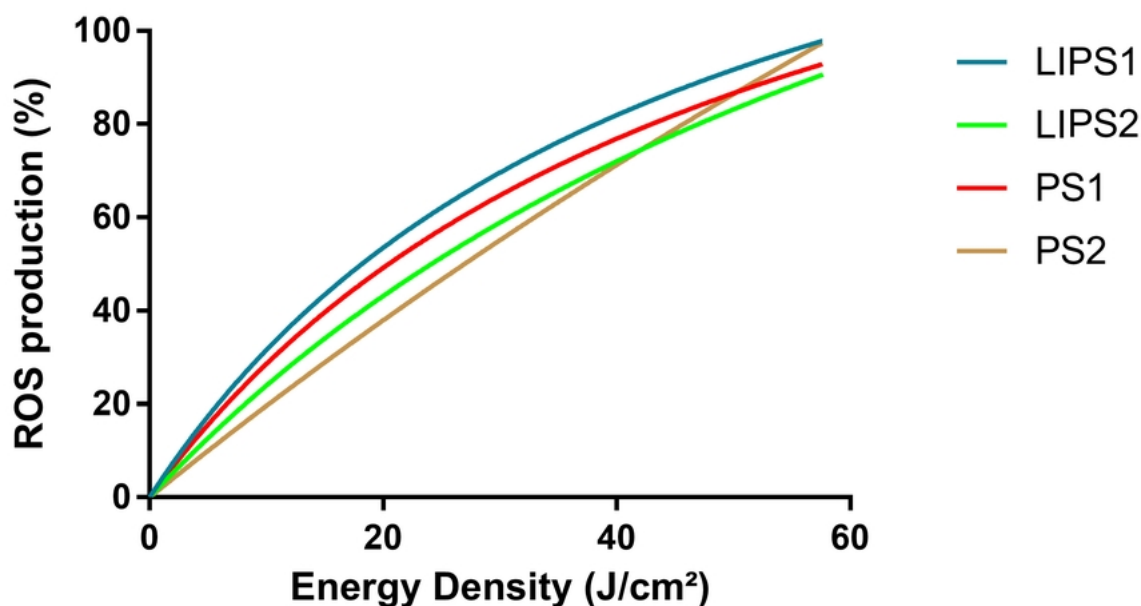


Figure 7 – Photoactivated production of ROS by PS1-Liposome (LIPS1), PS2-Liposome (LIPS2), PS1 and PS2 diluted in water (PS concentration is 30 μM)

In PDT, light excites the PS to a singlet state, which can then be converted to a triplet state (SONG et al., 2017). The reactive oxygen species (ROS) generated by photoreactions are the key factor for PDT, since they can induce cytotoxicity, causing damage to different biomolecules, including proteins, nucleic acids and lipids. Therefore,

nanostructures and photosensitizers were evaluated for their effects on ROS production by the DBF method (MUEHLMANN et al., 2015). Figure 7 shows the ROS production results when the compounds were irradiated with different energy densities. It is noted that all generate large amounts of ROS, thus are potential candidates for anti-cancer PDT. Notably, ROS production was more intense with LIPS1. In addition, similar profiles of the free and encapsulated photosensitizers indicate that the liposomes maintain their activity.

Photodynamic Activity Against Cells In Vitro

The production of ROS by activated photosensitizers in the target tissue will eventually lead to oxidative stress, which in most cases is lethal to the cells of the affected tissue. As shown below, in Figures 8, 9, 10, 11 and 12 both free and encapsulated photosensitizers were only slightly toxic in the dark, as expected, and photosensitizers generally are activated when irradiated at specific wavelengths.

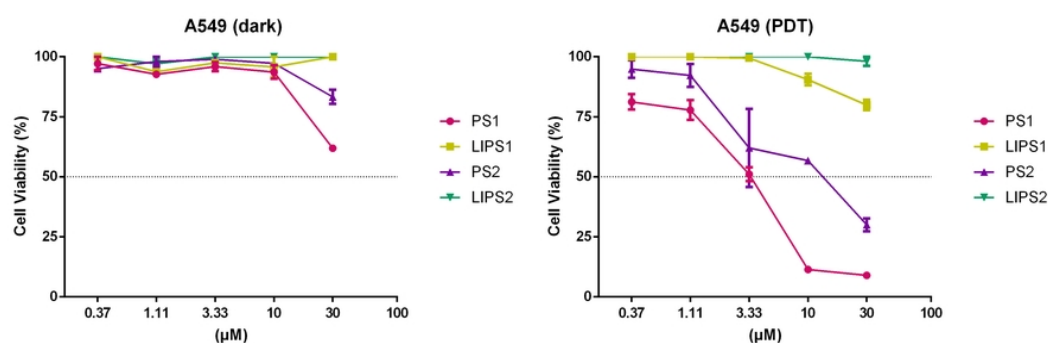


Figure 8 – Cytotoxicity of PS1-Liposome (LIPS1), PS2-Liposome (LIPS2), PS1 and PS2 at different concentrations against A549 cells treated in the dark or irradiated with red light (λ 660 nm, 25.8 J/cm²).

Above, it is observed that the A549 line (lung carcinoma), which does not express receptors for pregnenolone, was very sensitive to free photosensitizers, especially PS1 that does not have a pregnenolone residue in its structure. However, the photosensitizers into liposomes were neither toxic nor phototoxic loaded the liposomes, reduced cytotoxicity.

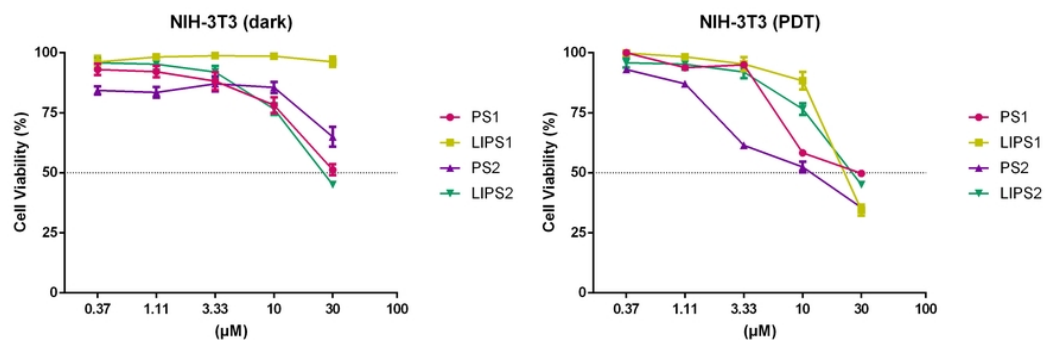


Figure 9 – Cytotoxicity of PS1-Liposome (LIPS1), PS2-Liposome (LIPS2), PS1 and PS2 at different concentrations against NIH-3T3 cells treated in the dark or irradiated with red light (λ 660 nm, 25.8 J/cm²).

In the NIH-3t3, which also does not have PRX expression, nanosystems and photosensitizers showed little difference in activity between irradiated and non-irradiated groups, except for LIPS1.

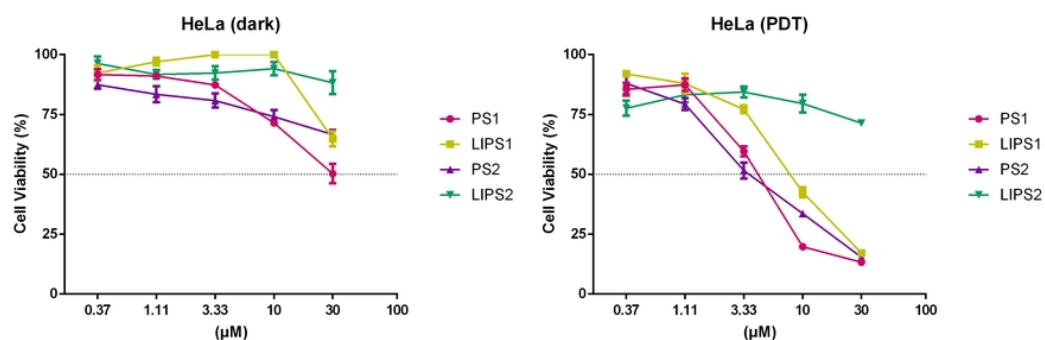


Figure 10 – Cytotoxicity of PS1-Liposome (LIPS1), PS2-Liposome (LIPS2), PS1 and PS2 at different concentrations against HeLa cells treated in the dark or irradiated with red light (λ 660 nm, 25.8 J/cm²).

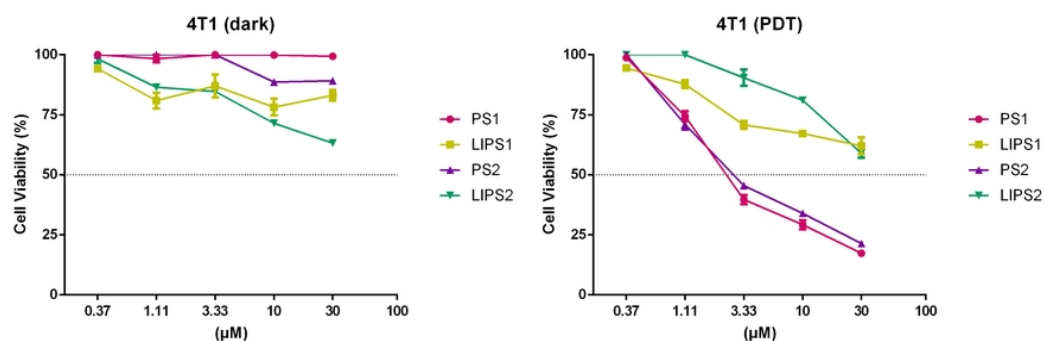


Figure 11 – Cytotoxicity of PS1-Liposome (LIPS1), PS2-Liposome (LIPS2), PS1 and PS2 at different concentrations against 4T1 cells treated in the dark or irradiated with red light (λ 660 nm, 25.8 J/cm²).

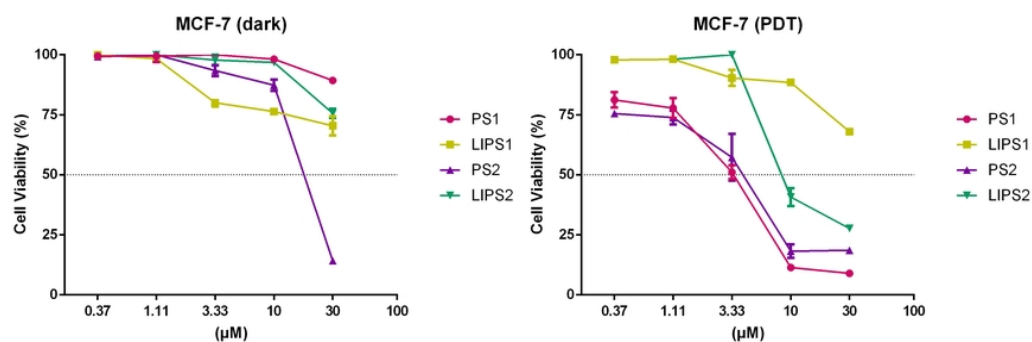


Figure 12 – Cytotoxicity of PS1-Liposome (LIPS1), PS2-Liposome (LIPS2), PS1 and PS2 at different concentrations against MCF-7 cells treated in the dark or irradiated with red light (λ 660 nm, 25.8 J/cm²).

In the HeLa (human adenocarcinoma cervix), MCF-7 (human mammary adenocarcinoma) and 4t1 (murine breast cancer) cell lines, which have PRX expression, there is little or no difference between pregnenolone-containing compounds associated or not. Furthermore, the protective factor of liposomes when irradiated is again noted.

The difference in biological activity between PDT mediated by free and nanostructured photosensitizers may be explained by its subcellular location. It is known that mechanisms of cytotoxicity of PDT depend largely on the subcellular localization of FS (GREBEŇOVÁ et al., 2003). Studies have shown that some photoactivated FSs can induce apoptosis in cancer cells, especially those that act on mitochondria (MACDONALD; DOUGHERTY, 2001). The ROS produced by PS activation provoke an oxidative stress in this organelle, causing pro-apoptotic proteins, such as cytochrome c, to be released. These proteins act by activating caspases that activate several controlled cellular processes, such as DNA fragmentation, leading to the death of the cell (USUDA et al., 2002; REINERS et al., 2002). Reactive species may also inactivate anti-apoptotic proteins, such as bcl-2, which are responsible for preventing cancer cells from entering apoptosis (XUE; CHIU; OLEINICK, 2015). Another example of mechanism depending on the subcellular localization is the potential of PDT to induce immunogenic cell death (MCI), if FS acts on the rough endoplasmic reticulum and generates stress on this organelle. Thus, activation of the immune system against tumor antigens will increase the efficiency of the treatment, elimination of the primary tumor with PDT and metastatic foci (GARG; AGOSTINIS, 2014). Therefore, it is understood that the liposome may have altered the interaction of the PS with the cell, and thus prevented FS from acting effectively on it. For the publication of the present work it is planned to confirm the hypothesis with subcellular localization experiments by fluorescence and confocal microscopy.

Conclusion

In conclusion, liposomes containing benzo[a]phenoxazinium derivatives PS1 and PS2 bearing different functional groups in the amino side chain (methyl propionate in LIPS1 and Pregnenolone in LIPS2) were prepared for the first time. The investigation on optical properties of LIPS1 and LIPS2 in water indicated that they are red light absorbers with low fluorescence quantum yields. Reinforcing the results presented by Zhang et al. (2018) about the free photosensitizers. The ROS production study revealed that these nanosystems produced ROS in an energy-dependent fashion, with LIPS1 having the highest ROS quantum yield. Finally, the anticancer PDT activities of these liposomes containing benzo[a]phenoxaziniums were evaluated. The bioassay results indicated that LIPS1 and LIPS2 showed no significant effects against cancerous cell lines (MCF-7, HeLa, 4T1 and A549) and neither in non-tumoral lineage (NIH-3T3). On the contrary, a protective factor caused by the liposome is noted, since these have reduced the toxicity caused by the free photosensitizer. In the present work, benzo [a] phenoxazinium type photosensitizers were first tested in A549, HeLa and MCF7 strains reinforcing their increasing potential for anticancer therapies even when not associated with nanotechnology.

Preparation, characterization and biological activity evaluation of nanostructured lipid carriers containing benzo[a]phenoxazinium photosensitizers associated with biotin

Victor Carlos Mello Silva^{1*}, Luís Alexandre Muehlmann²

¹*Institute of Biological Sciences, University of Brasília, Brasília 70910900, Brazil*

²*Faculty of Ceilandia, University of Brasília, Brasília 72220275, Brazil*

**Corresponding author: luismuehlmann88@gmail.com*

Abstract

Photodynamic therapy (PDT) can be defined as a process involving photochemical reactions that cause selective destruction of a tissue. It is a therapeutic technique that involves two main steps: use of a photosensitizer, either topically or systemically, followed by irradiation of the target tissue with light of length that activates photosensitizer (PS). The SLNs presented in this study contain photosensitizers associated with biotin, a Benzo[a]phenoxazinium dye, developed by J. Zhang et al. (2018). The benzophenoxazinic dyes are a class of easily synthesized cationic chromophores that possess chemical and physical properties that characterize it as an effective photosensitizing drug. Thus, the aim of the present study is to develop nanostructured lipid carriers containing biotin-associated benzo[a]phenoxazinium compounds and study its anticancer activity. For the development of these nanostructures, different proportions of Compritol® 888 ATO and MCT were tested. The nanostructured lipid carriers studied presented a wide band of light absorption, ranging from about 550 to 700 nm. This work shows for the first time the development of two nanostructured lipid carriers contained benzo[a]phenoxazinium derivatives PS1 e PS2 bearing different functional groups in the amino side chain (methyl propionate em NLS1 e Biotin em NLS2) were prepared for the first time. Moreover, the association of PS2 to a nanostructured lipid carriers increased its in vitro phototoxicity towards 4T1, CT26 and HeLa cells, cancer cells that have expression for biotin receptors used in this work. These results reported data on PS1 and PS2 suggest that this xanthene derivative is a potential theranostic agent, useful for PDT application.

Introduction

Photodynamic therapy (PDT) can be defined as a process involving photochemical reactions that cause selective destruction of a tissue. It is a therapeutic technique that involves two main steps: use of a photosensitizer, either topically or systemically, followed by irradiation of the target tissue with light of length that activates photosensiti-

zer (PS). The PS, when photoactivated, will produce a toxic effect on the target cells generating oxidative stress, causing the destruction of the tumor by three possible mechanisms: collapse of the tumor-associated microvasculature, induction of an antitumor immune response and direct cytotoxicity to tumor cells, and, eventually, metastasis. It is noted that the success of PDT treatment comes from the PS used. (KURWA; BARLOW, 1999)

Clinically, PDT is already used in the treatment of some types of cancer, such as lung, intestine, upper digestive tract, bladder, among others (MACHADO, 2000). In addition, many studies have investigated the application of PDT to control, prevention and cure of non-melanoma skin cancer (BRAATHEN et al., 2007). This treatment has been shown to be a promising clinical modality for the cancer treatment, offering the possibility of remission or even palliative action in some types of cancer, and other applications, such as in antimicrobial therapies (MACHADO, 2000).

To improve the delivery of the photosensitizer to the target, it can be associated with a nanosystem. Nanostructured lipid carriers (NLC) are nanosystems with an internal matrix composed by solid and liquid lipids. They are widely used in studies because they have high stability and low cytotoxicity because they dispense organic solvents and accumulate in tumor sites (RUKTANONCHAI et al., 2009; GHARPURE et al., 2015).

The SLNs presented in this study contain photosensitizers associated with biotin, a benzo[a]phenoxazinium dye, developed by J. Zhang et al. (2018). The benzophenoxazinic dyes are a class of easily synthesized cationic chromophores chemical and physical properties that turn them as an effective photosensitizing molecules. There are studies using benzo[a]phenoxazinium derivatives as antimalarials already (MIZUKAWA et al., 2014), and used especially as photosensitizing for photodynamic therapy in antimicrobial treatments (LEITÃO et al., 2016; ZHANG et al., 2018). However, the anti-cancer potential of benzo[a]phenoxazinium dyes has been little investigated (CINCOTTA; FOLEY; CINCOTTA, 1987).

In cancerous tissues it is common to increase the uptake of certain substances, which may be explored for the identification of several types of cancer. Biotin, an example of one of these substances, usually required in small amounts in the body, is a vitamin B complex acquired through feeding. Therefore, the use of biotin-containing molecules has been widely studied as an approach to increase the specificity of pharmacological anticancer treatments (REN, WX et al., 2015) Thus, the aim of the present study is to develop nanostructured lipid carriers containing biotin-associated benzo[a]phenoxazinium compounds and study its anticancer activity. (fig. 1)

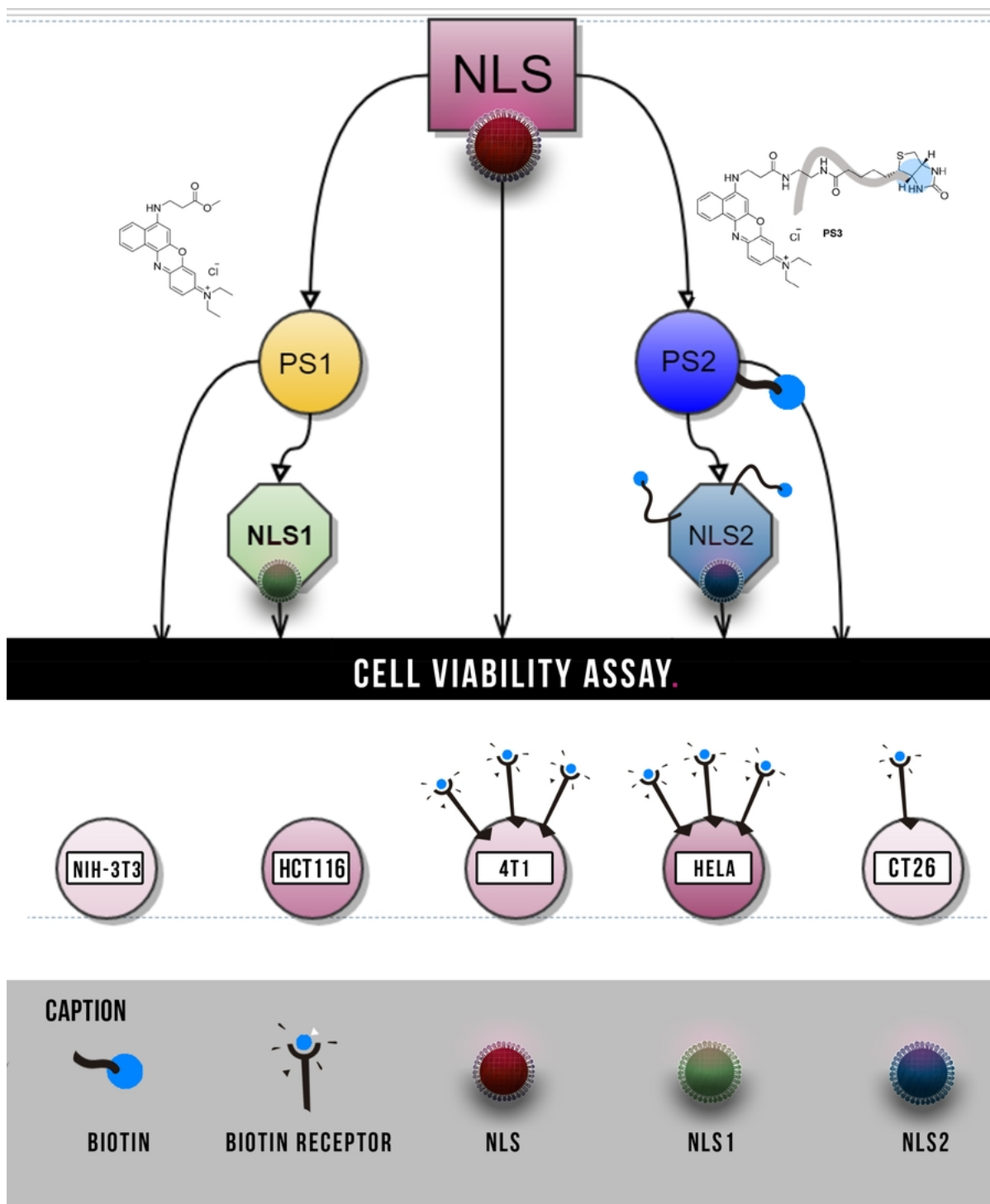


Figure 1 – Simplified scheme showing the treatments used in cell viability tests. NLS (nanostructured lipid carriers without photosensitizing agent); PS1 (Photosensitizer without Biotin); PS2 (photosensitizer with Biotin); NLS1 (NLS containing photosensitizer PS1); NLS2 (NLS containing photosensitizer PS2).

Materials and methods

Materials

Dimethyl sulfoxide (DMSO), 1,3-diphenylisobenzofuran (DPBF) and Kholiphor® HS15 were obtained from Sigma, USA. Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) were obtained from Gibco, EUA. The 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) was purchased from Invitrogen, EUA. The phosphate buffered saline (PBS) was supplied by Laborclin, Brazil. Murine fibroblast (NIH/3T3 - ATCC-CRL-1658TM), human colorectal carcinoma (HCT 116 - ATCC-CCL-247TM), murine colorectal carcinoma (CT26.CL25 - ATCC-CRL-2639) fibroblast cells uterus with human papilloma virus (HeLa-ATCC-CCL-2TM) and murine breast cancer (4T1-ATCC-CRL-2539) were used in the in vitro assays. NIH/3T3 and HeLa cells were cultured in DMEM medium, HCT 116, CT26 and 4T1 in RPMI 1640, both supplemented with 10% (v: v) fetal bovine serum (FBS) and 1% (v: v) of antibiotic solution (100 units / ml penicillin and 100 mg / ml streptomycin). Cells were incubated at 37^o C, 80% humidity and 5% CO₂. RPMI 1640, DMEM and antibiotics used were purchased from Gibco (Life Technologies, Inc., USA).

Methods

Preparation of nanostructured lipid carriers.

Different nanostructured lipid carriers were prepared by a phase inversion temperature (PIT) method, and a final formulation was chosen based on its colloidal properties. Different proportions of MCT to Compritol 888 ATO in the lipid mix, and different ratios of the surfactant Kolliphor HS15 to the lipid mix were tested. In brief, the lipid mix (MCT and Compritol®) and the Kolliphor HS15 were mixed at 60 °C, under magnetic stirring (350 RPM) for 5 minutes. Then, this mixture was diluted with water (1:10, w:v), and the coarse emulsion formed was then heated to 75 °C. The transparent emulsion obtained in this temperature was kept under magnetic stirring for 10 minutes. Next, the emulsion was left to cool at room temperature, with the nanostructured lipid carriers being formed by the solidification of lipid/surfactant droplets. The nanostructured lipid carrier containing PS1 and PS2 used in the subsequent experiments was prepared by diluting PS1 and PS2 to a concentration of 25 mg/mL in a mixture of MCT, Compritol 888 ATO and Kholiphor HS15 (1:1:2, w:w:w) at 60 °C, under magnetic stirring (350 RPM) for 5 minutes. Then, the preparation of NLS1 and NLS2 proceeded as described in the general protocol above. Blank nanostructured lipid carriers (NLS) was also prepared by

this same method, without NLS1 and NLS2.

Evaluation of colloidal properties

The average particle size and polydispersity index (PDI) of NLS were evaluated at 25 °C by photon correlation spectroscopy and electrophoretic laser Doppler velocimetry (ZetaSizer Nano ZS®, Malvern Instruments, Malvern, UK) with the angle of 90°. Prior to measurement, samples were diluted with distilled water (1:10, v:v).

Spectroscopic analysis

The PS1, PS2, NLS1 and NLS2 were diluted to 10 µM of photosensitizer in water. Then, 200 µL of the PS1, PS2, NLS1 and NLS2 solution were placed in 96-well microplate in triplicate, and its absorption spectra was recorded in a spectrophotometer (Spectramax M2, Molecular Devices, USA) between 350 and 750 nm. Blanks consisted of pure DMSO and water.)

Evaluation of ROS production

The method used in this procedure was the 1,3-diphenylisobenzofuran (DBF) due to analyzing the ability of the sample to produce singlet oxygen. The most singlet oxygen is generated, the most the molecule is degraded and its absorbance decreases squarely to the generation of these EROs. Then, 10 µL of a solution of DBF in ethanol (0.22 mg/mL) were added to each aliquot. At first, the sample was read without irradiation, in a spectrophotometer. Afterward, the plate was read and also irradiated at different irradiation times of the photosensitizers. The absorbance values of the pure compounds at their respective concentrations at 414 nm were used as blank. The whole experiment was carried out in the dark. Two independent experiments were performed.

Transmission electron microscopy (TEM)

For the TEM, 8 µL of the samples at 0,1% (v/v in distilled water) were placed in a copper electron microscopy grid. For lipid staining, the grid was exposed to osmium atmosphere for 5 minutes. The micrograph was obtained under 80 kV, with a magnification of 25000 times by the JEOL JEM 1011 100 kV system.

Biological assays

In vitro treatment design

The cytotoxicity of the compounds, encapsulated or not, were evaluated after exposure for a period of 15 minutes, followed by irradiation for 30 minutes. The concentrations used were 30 μM , 15 μM , 7.5 μM and 3.75 μM . PS1 and PS4 photosensitizing agents, both benzo[a]phenoxazinium derivatives, both in free and encapsulated form, were tested. The PS2 differs from PS1 for its biotin moiety. Briefly, 1×10^4 cells/well of NIH-3T3, 4T1, HeLa, HCT116 or CT26 were plated and, after 24 hours, 100 μL of the diluted compounds in medium were added to the wells and exchanged by pure medium after 15 minutes.

Cell viability assay

The cells were treated as described above, then exposed to 200 μL of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) solution (0.5 mg/mL in culture medium), as previously described. Next, the MTT solution was removed, the cells were washed with PBS, and the formazan formed by viable cells was extracted with 200 μL DMSO. The absorption at λ 595 nm was then measured using a spectrophotometer (SpectramaxM2; Molecular Devices LLC). This experiment was performed in quadruplicate for each treatment, and the results were expressed as percentages relative to control. Two-way ANOVA was performed with Bonferroni posttest, for comparison between treatments and concentrations at different times, the analysis of the repeatability of the data by the calculation of the Intraclass Correction Interval at 95% by means of the program GraphPad prism version 6.0.

Statistical analyzes

Data were analysed with GraphPad Prism® version 6.0 software (GraphPad Software, La Jolla, CA). Significant differences between data sets were assessed by one-way or two-way ANOVA, with Tukey's or Sidak's post-tests ($\alpha= 0.05$). Quantitative results were expressed as mean \pm standard error of the mean or mean \pm standard deviation oh the mean.

Results and discussion

The main draw backs presented by anticancer agents are the ineffectiveness against certain cells that develop mechanisms of resistance and the low therapeutic index (PARHI; MOHANTY; SAHOO, 2012). Despite growing studies to improve cancer

therapy, which have led to increased patient survival, there is still a need for improvement. In this context, nanotechnology, which can be defined as the technology that allows the control, manipulation, study and development of structures on the nanometric scale, enables the creation of new biomedical applications by being able to design devices to diagnose or treat diseases, including cancer. (SINGH; LILLARD, 2008)

Nanoparticles may accumulate into tumors by passive and active mechanisms causing their preferred accumulation in solid tumors. The passive vectorization process is primarily characterized by the atypical physiology of the vessels present in solid tumors causing the particles accumulation. These abnormal vessels have much larger fenestrations (100 to 780 nm when compared to standard vascular endothelium, with fenestrations sized between 5 and 10 nm. In this fashion, this increased vessel width of solid tumor will allow nanoparticles with a mean size of 200 nm to enter. However, entrance is not expected in narrower normal sized endothelial fenestrations. This mechanism known as enhanced permeability and retention (EPR) and will permit elevated accumulation of drug nanoparticles in the tumor with minor quantity or no amount of nanoparticles in normal tissues. This resulting phenomenon may reportedly increase drug concentration encapsulated in solid tumors by 70-fold (HOBBS et al., 1998; LIECHTY; PEPPAS, 2012).

Active vectorization is characterized by the use of surface ligands of nanoparticles that will interact specifically with tumor cells. In addition to targeting the nanosystem to the tumor mass, these ligands interact with receptors on the surface of cells, interfering with signal transduction, regulating the expression of protooncogenes, and altering the mechanisms of cell proliferation. Briefly, nanoparticles encapsulate cytotoxic drugs and, in addition, may have, on their surface, linkers, which will interact with specific cells of solid tumors (HOBBS et al., 1998; LIECHTY; PEPPAS, 2012)

Preparation of nanostructured lipid carriers.

For the development of these nanostructures, different proportions of Compritol® 888 ATO and MCT were tested. Based on previous formulations, the amount of surfactant in the lipid matrix was maintained in a ratio 1: 1 (w:w) in all formulations tested in the present study. Different lipid mixture compositions (MCT and Compritol® 888 ATO) and different proportions of lipid mixture for Kolliphor® HS were tested. All these parameters affect the physical-chemical characteristics of the formulations. Particularly, the nanoparticles obtained with lipid mixture containing MCT below 50% (w: w) had low PDI values and similar hydrodynamic diameters between 45 and 70 nm. A low index of distribution of the nanoparticles - low PDI - is important to avoid the so-called "Ostwald maturation" effect, which leads to the development of particle diameter heterogeneity, where smaller particles merge with the larger particles, increasing the

DH of the formulation over of time. (Lin et al., 2015). Thus, the MCT concentration in the lipid mixture used for the production of NLS, NLS1 and NLS2 was adjusted to 50% (w / w) and formulations containing MCT concentrations greater than 55% culminated in high PDI formulations, thus, were discarded.

Therefore, from the development of numerous pre-formulations, generating the cited results and others, the final formulation of the nanoparticles consisted of a lipid mixture containing MCT / Compritol® 888 ATO (1: 1), and an surfactant-to-lipids ratios of 1.0. The macroscopic analysis of the formulations studied revealed the Tyndall effect characteristic of colloidal suspensions. After macroscopic analysis (Fig. 2), the formulation was taken to the analysis by Dynamic light dispersion (DLS) and its colloidal characteristics can be viewed in table below.

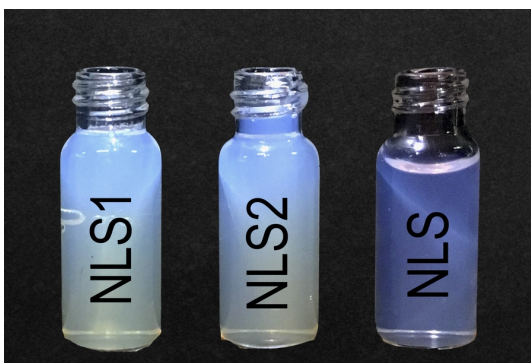


Figure 2 – Macroscopic aspect of nanostructured lipid carriers

Macroscopic aspect of solid lipid nanoparticles

Table 1– Physicochemical characteristics of nanostructured lipid carriers. PS = particle size, Pdl = polydispersity and ZP = zeta potential.

Formulation	PS (nm)	PDI	ZP (mV)
nanostructured lipid carriers (NLS)	43.00 ± 1.42	0.088 ± 0.018	- 0.53 ± 0.233
PS1-nanostructured lipid carriers (NLS1)	69.61 ± 0.440	0.148 ± 0.017	-0.49 ± 0.115
PS2-nanostructured lipid carriers (NLS2)	69.25 ± 0.310	0.124 ± 0.023	- 2.36 ± 1.31

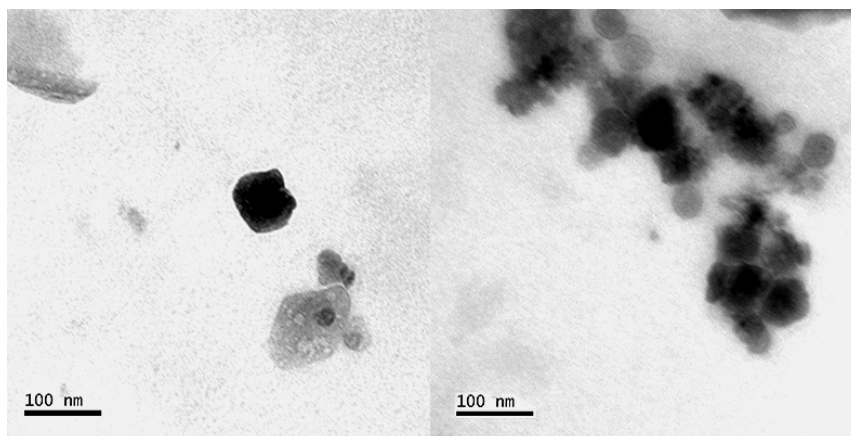


Figure 3 – TEM micrography of LIP under 25000 magnification

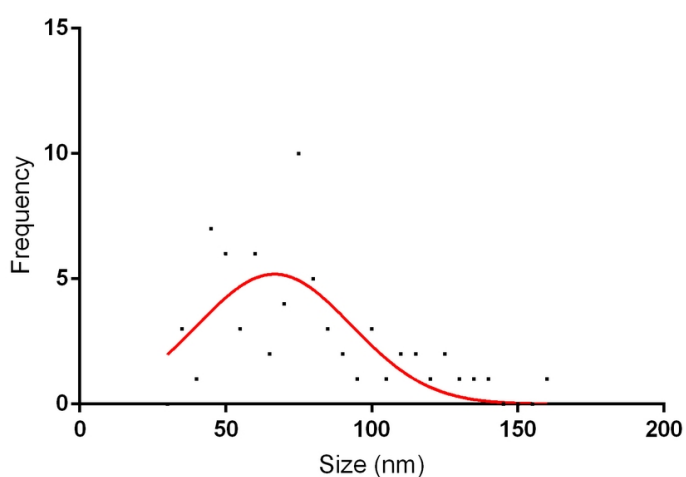


Figure 4 – Frequency distribution of sizes measured from TEM micrographs

To evaluate the storage stability of the nanostructures the mean particle size and polydispersity index (PDI) were again measured during a month of being stored in 25 °C represented in the following graphic.

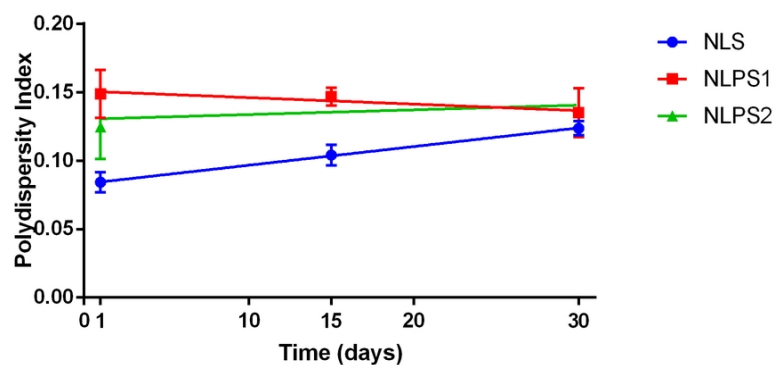


Figure 5 – Stability Profile. Polydispersion index (PDI) of NLS stored for 30 days.

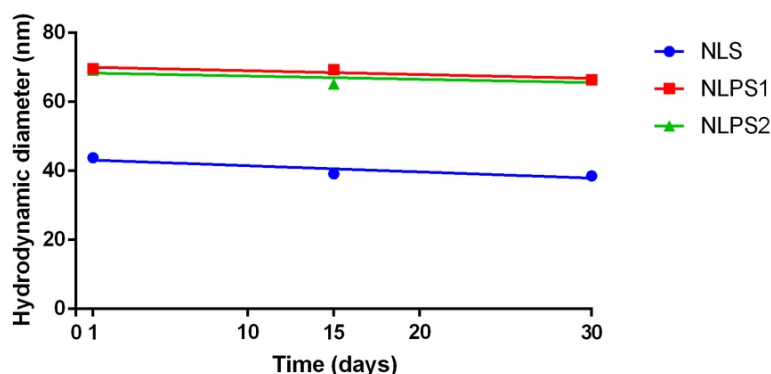


Figure 6 – Stability Profile. Hydrodynamic diameter of NLS stored for 30 days.

Spectroscopic analysis.

The nanostructured lipid carriers studied presented a wide band of light absorption, ranging from about 550 to 700 nm, as shown in Fig. 7. This is an important information of LIPS1 e LIPS2 regarding its potential application as a PS for anticancer PDT. The importance of this property derives from the optical characteristics of biological tissues. Most tissues have endogenous pigments, mainly hemoglobin, that absorb light intensely between 400 and 600 nm, interfering in the activation of PS and consequently reducing the efficacy of PDT. Moreover, light with wavelengths above 800 nm does not have enough energy to activate PS (SIBATA et al., 2000).

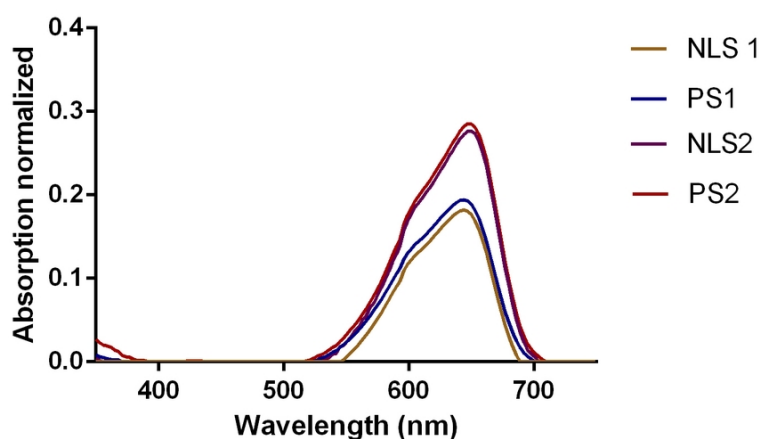


Figure 7 – Absorption spectra of PS1 (Photosensitizer without Biotin); PS2 (photosensitizer with Biotin); NLS1 (NLS containing photosensitizer PS1); NLS2 (NLS containing photosensitizer PS2) dispersed in water.

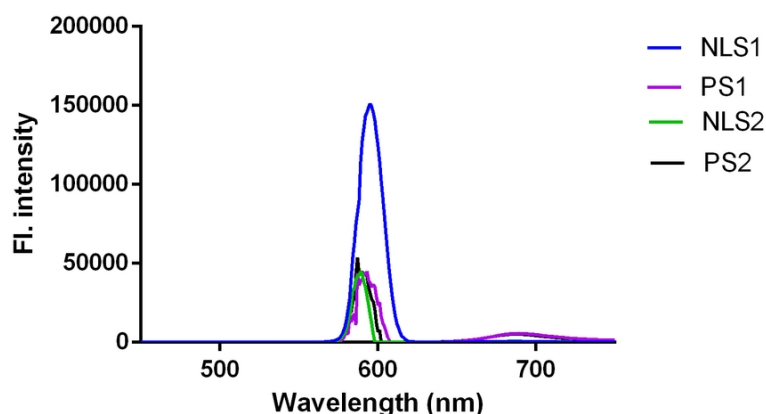


Figure 8 – Fluorescence, excitation at λ 600 nm

This result indicates that NLS1, PS1, NLS2 and PS2 may not tend to decay back to the ground state by emitting fluorescence after excitation and have a great potential of undergoing intersystem crossing to form a relatively long-lived triplet state, which is necessary for acting as desirable PDT candidates. (ZHANG et al., 2018)

Evaluation ROS production

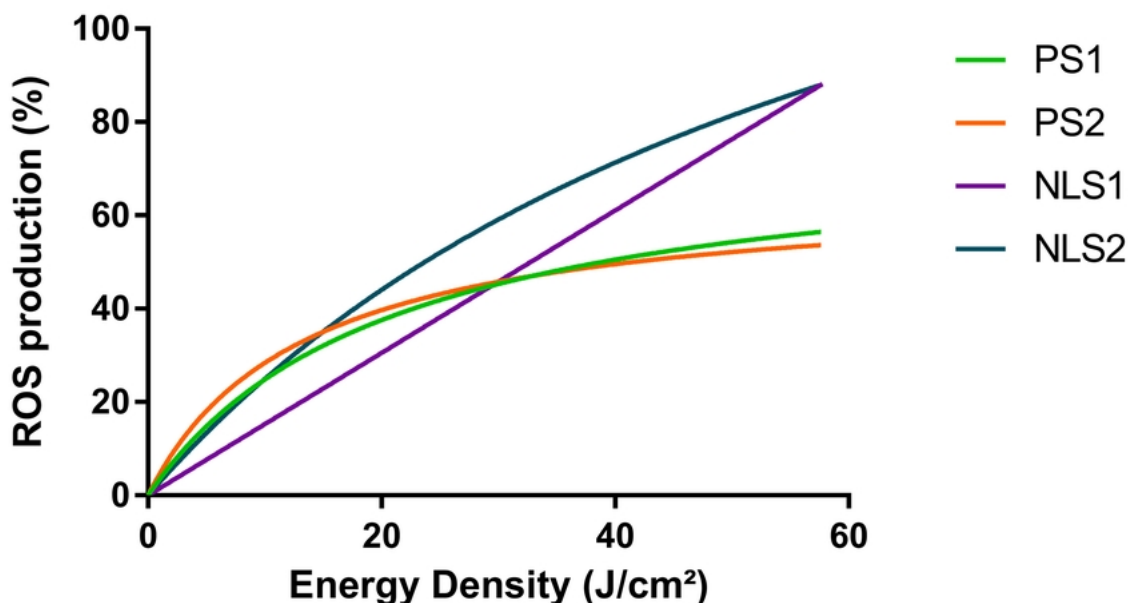


Figure 9 – Photoactivated production of ROS by PS1, PS2, NLS1 and NLS2

In PDT, light excites the PS to a singlet state, which can then be converted to a triplet state (SONG et al., 2017). The reactive oxygen species (ROS) generated in

photoreactions are the key factor for PDT, since they can induce cytotoxicity, causing damage to different biomolecules, including proteins, nucleic acids and lipids. Therefore, nanostructures and photosensitizers were evaluated for their effects on ROS production by the DBF method (MUEHLMANN et al., 2015). Figure 9 shows the ROS production results when the compounds were irradiated with different energy densities. It is noted that all generate large amounts of ROS, thus are potential candidates for anti-cancer PDT. Notably, ROS production was more intense with NLS1. In addition, similar profiles of the free and encapsulated photosensitizers indicate that the liposomes maintain their activity.

Photodynamic activity against cells *In vitro*

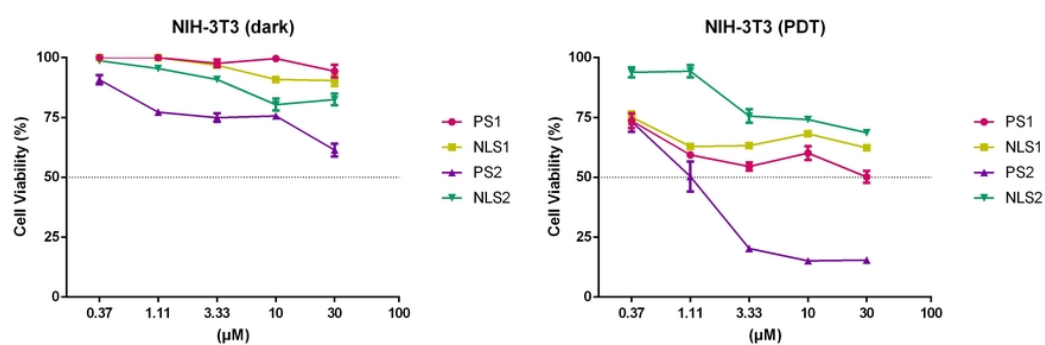


Figure 10 – Cytotoxicity of PS1, PS2, NLS1 and NLS2 at different concentrations against NIH-3T3 cells treated in the dark or irradiated with red light (λ 660 nm, 25.8 J/cm²).

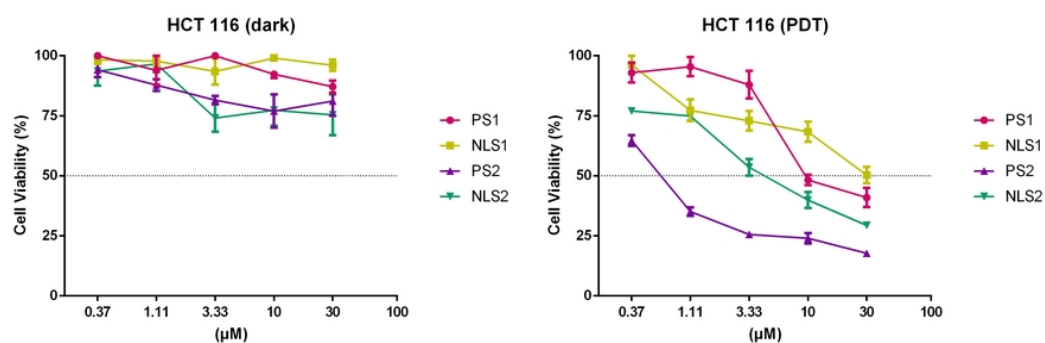


Figure 11 – Cytotoxicity of PS1, PS2, NLS1 and NLS2 at different concentrations against HCT-116 cells treated in the dark or irradiated with red light (λ 660 nm, 25.8 J/cm²).

Considering that neither the NIH-3T3 line nor the HCT116 lineage have biotin receptor expression, it was expected that none of the treatments would have very explicit

action. However, when HCT116 is irradiated a similar light activity can be observed in all treatments. And in the dark this activity is reduced, as expected. For the NIH-3T3 strain, very high activity is observed when using PS2 in PDT. However, a expressive activity is not noticed in the dark.

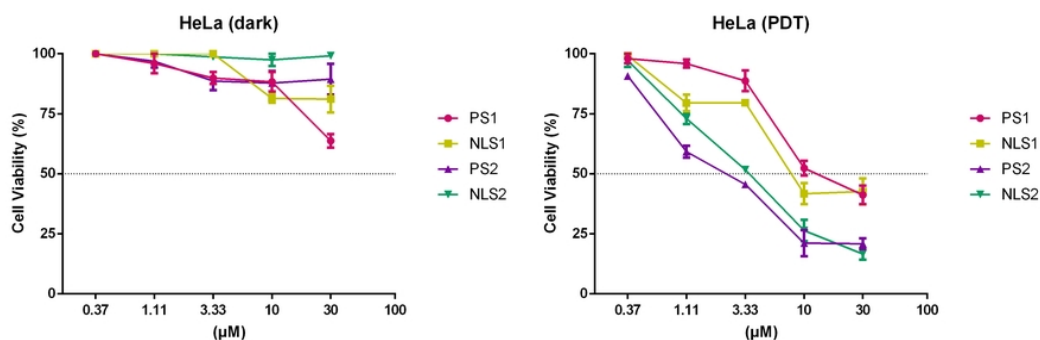


Figure 12 – Cytotoxicity of PS1, PS2, NLS1 and NLS2 at different concentrations against HeLa cells treated in the dark or irradiated with red light (λ 660 nm, 25.8 J/cm²).

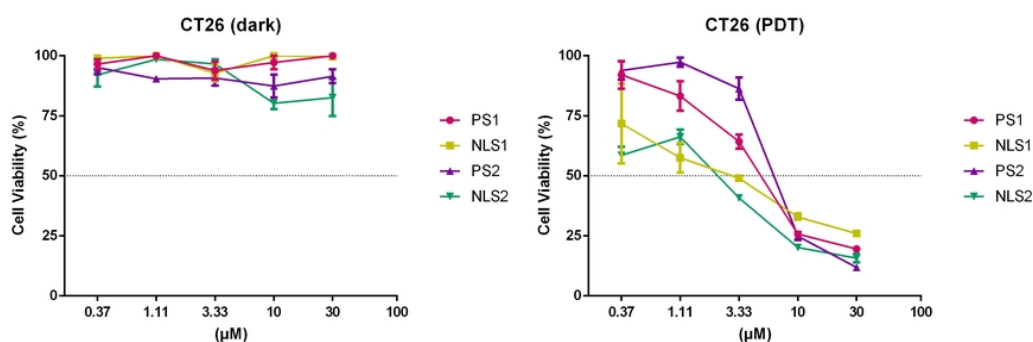


Figure 13 – Cytotoxicity of PS1, PS2, NLS1 and NLS2 at different concentrations against CT26 cells treated in the dark or irradiated with red light (λ 660 nm, 25.8 J/cm²).

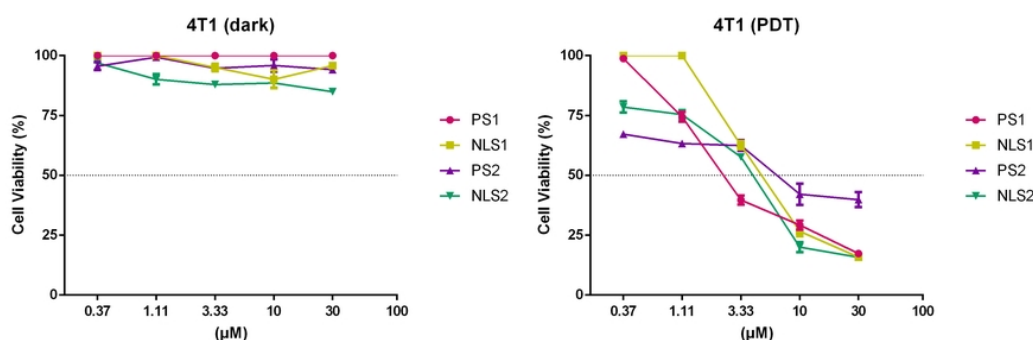


Figure 14 – Cytotoxicity of PS1, PS2, NLS1 and NLS2 at different concentrations against 4T1 cells treated in the dark or irradiated with red light (λ 660 nm, 25.8 J/cm²).

The HeLa, 4T1 and CT26 lines, which have receptors for biotin, it was expected that NLS2 and PS2 having biotin associated with molecule, demonstrate greater biological activity when compared to NLS1 and PS1 that do not have biotin. And this

scenario was observed, with the exception of photodynamic therapy in the 4T1 line, which presented similar activity in all treatments.

Conclusion

This work shows for the first time the development of two nanostructured lipid carriers contained benzo[a]phenoxazinium derivatives PS1 e PS2 bearing different functional groups in the amino side chain (methyl propionate em NLS1 e Biotin em NLS2) were prepared for the first time. Moreover, the association of PS2 to a nanostructured lipid carriers increased its in vitro phototoxicity towards 4T1, CT26 and HeLa cells, cancer cells that have expression for biotin receptors used in this work. These results reported data on PS1 and PS2 suggest that this xanthene derivative is a potential theranostic agent, useful for PDT application.

5 Conclusões Gerais

O presente estudo teve como objetivo principal desenvolver dois nanosistemas contendo fotossensibilizantes sintéticos do tipo benzo[a]phenoxazinium para serem utilizados em terapia fotodinâmica. Além disso também se avaliou a interação biológica destes. Ao avaliar os nanosistemas desenvolvidos como possíveis fotossensibilizantes, notou-se que eles apresentaram boas características para serem utilizados em TFD. Possuem características fotofísicas que o habilitam como FS, além de apresentar capacidade de gerar ERO, baixa toxicidade no escuro e capacidade de reduzir a viabilidade de células tumorais *in vitro*, quando irradiado. Para a publicação dos artigos finais planeja-se adicionar experimentos de para análises da localização subcelular, e testes para análise das vias de endocitose para assim tentar entender seu mecanismo de ação ao causar morte celular. E entender o fator protetivo causado pelo lipossoma.

Referências

- MARTIN, A; SWARBRICK, J; CAMMARATA, A; In: Lea and Febiger States of matter and phase equilibria. *Philadelphia: Physical Pharmacy*, v. 1, p. 62 – 92, 1983.
- AKBARI, B.; TAVANDASHTI, M. P.; ZANDRAHIMI, M. Particle size characterization of nanoparticles a practical approach. **Iranian Journal of Materials Science & Engineering**, v. 8, n. 2, p. 48 – 56, 2011.
- ALEXIS, F. et al. Factors Affecting the Clearance and Biodistribution of Polymeric Nanoparticles. **Molecular Pharmaceutics**, American Chemical Society, v. 5, n. 4, p. 505 – 515, 8 2008.
- ALKILANY, A. et al. Cellular uptake and cytotoxicity of gold nanorods: molecular origin of cytotoxicity and surface effects. **Small**, v. 5, p. 701 – 708, 2009.
- ALLEN, B. et al. Biodegradation of single-walled carbon nanotubes through enzymatic catalysis. **Nano Lett**, v. 8, p. 3899 – 3903, 2008.
- ALLEN, B. et al. Mechanistic investigations of horseradish peroxidase-catalyzed degradation of single-walled carbon nanotubes. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 131, p. 17194 – 17205, 2009.
- ANDREA, K. et al. Toxicology of engineered nanomaterials: Focus on biocompatibility, biodistribution and biodegradation. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1810, n. 3, p. 361 – 373, maio 2011.
- BANGHAM, A. D.; HORNE, R. W. Negative staining of phospholipids and their structural modification by surface-active agents as observed in the electron microscope. **J Mol Biol**, v. 8, n. 5, p. 660 – 668, 1964.
- BATISTA, C. M.; CARVALHO, C. M. B. de; MAGALHÃES, N. S. S. Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: estado da arte. **Rev. Bras. Cienc. Farm.**, v. 43, n. 2, p. 167 – 179, 2007.
- BRAATHEN, L. R. et al. Guidelines on the use of photodynamic therapy for nonmelanoma skin cancer: An international consensus. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 56, n. 1, p. 125 – 143, 2007.
- CAMPOS, K. R. et al. The importance of synthetic chemistry in the pharmaceutical industry. **Science**, v. 363, n. 6424, 2019.
- CAO, J. et al. Cellular internalization of doxorubicin loaded star-shaped micelles with hydrophilic zwitterionic sulfobetaine segments. **Biomaterials.**, v. 35, n. 15, p. 4517 – 4524, 2014.
- CHAUDHURI, R. G.; PARIA, S. Core/Shell Nanoparticles: Classes, Properties, Synthesis Mechanisms, Characterization, and Applications. **Chem. Rev.**, p. 2373 – 2433, 2012.
- CHAUHAN, A. et al. Unexpected in vivo antiinflammatory activity observed for simple, surface functionalized poly(amidoamine) dendrimers. **Biomacromolecules**, v. 10, p. 1195 – 1202, 2009.

CHOU, C. et al. Single-walled carbon nanotubes can induce pulmonary injury in mouse model. **Nano Lett.**, v. 8, p. 437 – 445, 2008.

CHU, B.; LIU, T. Characterization of nanoparticles by scattering techniques. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 2, n. 1, p. 29 – 41, 7 2000.

CINCOTTA, L.; FOLEY, J. W.; CINCOTTA, A. H. Novel red absorbing benzo[a]phenoxazinium and benzo[a]phenothiazinium photosensitizers: in vitro evaluation. **photochemistry and photobiology**, v. 46, n. 5, p. 751 – 758, 1987.

CORRIAS, F.; LAI, F. New Methods for Lipid Nanoparticles Preparation. **Recent Pat Drug Deliv Formul.**, v. 5, n. 3, p. 201 – 213, 2011.

DANHIER, F.; FERON, O.; PRÉAT, V. To exploit the tumor microenvironment: Passive and active tumor targeting of nanocarriers for anti-cancer drug delivery. **J Control Release.**, v. 148, n. 2, p. 135 – 146, 2010.

DE, M.; GHOSH, P. S.; ROTELLO, V. M. Applications of Nanoparticles in Biology. **Advanced Materials**, v. 20, p. 4225 – 4241, 2008.

DESHPANDE, P. P.; BISWAS, S.; TORCHILIN, V. P. Current trends in the use of liposomes for tumor targeting. **Nanomedicine**, v. 8, n. 9, p. 1509 – 1528, 8 2013.

DRAKE, B. et al. Imaging crystals polymers and processes in water with the AFM. **Science**, v. 243, p. 1586 – 1589, 1989.

DUNCAN, R. The dawning era of polymer therapeutics. **Nature Review Drug Discovery**, p. 347 – 360, 2 2003.

HOW, D. et al. The production and characteristics of solid lipid nanoparticles (SLNs). **Biomaterials**, v. 24, p. 1781 – 1785, 2003.

EDWARDS, P.; THOMAS, J. Gold in a metallic divided state—from Faraday to present-day nanoscience. **Angew. Chem. Int. Ed. Engl.**, v. 46, p. 5480 – 5486, 2007.

FAROKHZAD, O.; LANGER, R. Nanomedicine: developing smarter therapeutic and diagnostic modalities. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 58, p. 1456 – 1459, 2006.

FOLEY, J. W. et al. Synthesis and Properties of Benzo[a]phenoxazinium Chalcogen Analogues as Novel. **J. Med. Chem.**, p. 5291 – 5299, 2006.

FRUCHON, S. et al. Anti-inflammatory and immunosuppressive activation of human monocytes by a bioactive dendrimer. **J. Leukoc. Biol.**, v. 85, p. 553 – 562, 2009.

GARG, A. D.; AGOSTINIS, P. ER stress, autophagy and immunogenic cell death in photodynamic therapy-induced anti-cancer immune responses. **Photochemical and Photobiological Sciences**, v. 13, n. 3, p. 474 – 487, 2014. ISSN 14749092.

GARG, A. D. et al. Danger signalling during cancer cell death: Origins, plasticity and regulation. **Cell Death Differ.**, v. 21, n. 1, p. 26 – 38, 2014.

GARG, A. D. et al. Dendritic cell vaccines based on immunogenic cell death elicit danger signals and T cell-driven rejection of high-grade glioma. **Science Translational Medicine**, v. 8, n. 328, p. 1 – 16, 2016. ISSN 19466242.

GARTI, N.; SATO, K. Crystallization and polymorphism of fats and fatty acids. **Marcel Dekker Inc**, v. 2, p. 227 – 266, 1988.

GARUD, A.; SINGH, D.; GARUD, N. Solid Lipid Nanoparticles (SLN): Method, Characterization and Applications. **International Current Pharmaceutical Journal**, v. 1, n. 11, p. 384 – 393, 2012.

GERMAIN, R. An innately interesting decade of research in immunology. **Nature Medicine**, v. 10, p. 1307 – 1320, 2004.

GHANBARZADEH, S.; VALIZADEH, H.; ZAKERI-MILANI, P. Application of response surface methodology in development of sirolimus liposomes prepared by thin film hydration technique. **BiolImpacts**, v. 3, n. 2, p. 75 – 81, 2013.

GHARPURE, K. M. et al. Nanotechnology: Future of oncotherapy. **Clinical Cancer Research**, v. 21, n. 14, p. 3121 – 3130, 2015. ISSN 15573265.

GREBEŇOVÁ, D. et al. Mitochondrial and endoplasmic reticulum stress-induced apoptotic pathways are activated by 5-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy in HL60 leukemia cells. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 69, n. 2, p. 71 – 85, 2003. ISSN 10111344.

GU, Y. et al. Nuclear penetration of surface functionalized gold nanoparticles. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 237, p. 196 – 204, 2009.

GUPTA, A. K.; GUPTA, M. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. **Biomaterials**, v. 26, n. 18, p. 3995 – 4021, 2005.

HACKBARTH, S. et al. Singlet oxygen quantum yields of different photosensitizers in polar solvents and micellar solutions. **Journal of Porphyrins and Phthalocyanines**, v. 2, n. 2, p. 145 – 158, 1998.

HALL, J. B.; MCNEIL, S. E. Characterization of Nanoparticles for Therapeutics: Physicochemical Characterization. **Nanomedicine (Lond)**, v. 2, p. 789 – 803, 2007.

HERRERA, J.; SAKULCHAICHAROEN, N. Microscopic and spectroscopic characterization of nanoparticles, in Drug delivery nanoparticles formulation and characterization. In: PATHAK, E. Y.; THASSU, D. (Ed.). **Microscopic and spectroscopic characterization of nanoparticles, in Drug delivery nanoparticles formulation and characterization**. [S.l.]: Informa healthcare: New York, 2009. p. 231 – 259.

HILL, M. D. D. J. S. A History of Photodynamic Therapy. **Aust N Z J Surg**, v. 61, n. 5, p. 340 – 348, 1991.

HOBBS, S. K. et al. Regulation of transport pathways in tumor vessels: role of tumor type and microenvironment. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 95, n. 8, p. 4607 – 12, 1998.

HONARY, S.; ZAHIR, F. Effect of Zeta Potential on the Properties of Nano-Drug Delivery Systems - A Review (Part 2). **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 12, n. April, p. 265 – 273, 2013.

HSIAO, J. et al. Macrophage physiological function after superparamagnetic iron oxide labeling. **NMR Biomed**, p. 820 – 829, 2008.

- JEVPRASESPHANT, R. et al. The influence of surface modification on the cytotoxicity of PAMAM dendrimers. **Int. J. Pharm.**, v. 252, p. 263 – 266, 2003.
- KABANOV, A.; ALAKHOV, V. Pluronic (R) block copolymers in drug delivery: from micellar nanocontainers to biological response modifiers. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**, v. 19, p. 1 – 72, 12 2002.
- KIRBY, A.; GUNNING, A.; MORRIS, V. Imaging xanthum gum by atomic force microscopy. **Carbohydr. Res.**, n. 267, p. 161 – 166, 1995.
- KLIEWER, S. A.; GOODWIN, B.; WILLSON, T. M. The nuclear pregnane X receptor: A key regulator of xenobiotic metabolism. **Endocrine Reviews**, v. 23, n. 5, p. 687 – 702, 2002.
- KONOPKA, K.; GOSLINSKI, T. Photodynamic Therapy in Dentistry. **J Dent Res.**, v. 8, p. 694 – 707, 2007.
- KORBELIK, M. et al. Calreticulin as Cancer Treatment Adjuvant: Combination with Photodynamic Therapy and Photodynamic Therapy-Generated Vaccines. **Frontiers in Oncology**, v. 5, n. February, p. 1 – 8, 2015.
- KOU, L. et al. The endocytosis and intracellular fate of nanomedicines : Implication for rational design. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 8, n. 1, p. 1 – 10, 2013.
- KUO, J.; JAN, M.; CHIU, H. Mechanism of cell death induced by cationic dendrimers in RAW 264.7 murine macrophage-like cells. **J. Pharm. Pharmacol.**, p. 489 – 495, 2005.
- KURWA, H. A.; BARLOW, R. J. The role of photodynamic therapy in dermatology. **Clin Exp Dermatol.**, v. 24, n. 3, p. 143 – 148, 1999.
- LABIENIEC, M.; GABRYELAK, T. Preliminary biological evaluation of poli(amidoamine) (PAMAM) dendrimer G3.5 on selected parameters of rat liver mitochondria. **Mitochondrion**, p. 305 – 312, 2008.
- LEE, J. et al. Nanosized polyamidoamine (PAMAM) dendrimer-induced apoptosis mediated by mitochondrial dysfunction. **Toxicol. Lett.**, v. 190, p. 202 – 207, 2009.
- LEITÃO, M. I. P. et al. Synthesis and photophysical studies of new benzo[a]phenoxazinium chlorides as potential antifungal agents. **Tetrahedron Letters**, v. 57, n. 35, p. 3936 – 3941, 2016.
- LEROUEIL, P. et al. Wide varieties of cationic nanoparticles induce defects in supported lipid bilayers. **Nano Lett.**, v. 8, p. 420 – 424, 2008.
- LIECHTY, W.; PEPPAS, N. Expert Opinion: Responsive Polymer Nanoparticles in Cancer Therapy. **Eur J Pharm Biopharm**, v. 80, n. 2, p. 241 – 246, February 2012.
- WALSH, L.J. The current status of laser applications in dentistry. **Aust Dent J**, n. 3, p. 146 – 155, 2003.
- LU, A.; SALABAS, E.; SCHUTH, F. Magnetic nanoparticles: synthesis, protection, functionalization, and application. **Angew. Chem. Int. Ed. Engl.**, p. 1222 – 1244, 2007.

- MACDONALD, I. J.; DOUGHERTY, T. J. Basic principles of photodynamic therapy. **Journal of Porphyrins and Phthalocyanines**, p. 105 – 129, 2001.
- MACHADO, A. E. da H. Terapia fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e perspectivas. **Química Nova**, v. 23, n. 2, p. 237 – 243, 2000.
- MALIK, N. et al. Dendrimers: relationship between structure and biocompatibility in vitro, and preliminary studies on the biodistribution of ¹²⁵I-labelled polyamidoamine dendrimers in vivo. **J. Control. Release**, p. 133 – 148, 2000.
- MARCIELLO, M. et al. Recent advances in the preparation and application of multifunctional iron oxide and liposome-based nanosystems for multimodal diagnosis and therapy. **Interface Focus**, v. 6, n. 6, 2016. ISSN 20428901.
- MIZUKAWA, Y. et al. Novel synthetic route for antimalarial benzo[a]phenoxazine derivative SSJ-183 and two active metabolites. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 22, n. 14, p. 3749 – 3752, 2014.
- MOORE, A. et al. Tumoral distribution of long-circulating dextran-coated iron oxide nanoparticles in a rodent model. **Radiology**, v. 214, p. 568 – 574, 2000.
- MUEHLMANN, A. L. et al. Aluminium-phthalocyanine chloride nanoemulsions for anticancer photodynamic therapy: Development and in vitro activity against monolayers and spheroids of human mammary adenocarcinoma MCF-7 cells. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 13, n. 1, p. 1 – 11, 2015.
- MULLER, K. et al. Effect of ultrasmall superparamagnetic iron oxide nanoparticles (Ferumoxtran-10) on human monocyte-macrophages in vitro. **Biomaterials**, p. 1629 – 1642, 2007.
- MURPHY, C. et al. Gold nanoparticles in biology: beyond toxicity to cellular imaging. **Acc. Chem. Res.**, v. 41, p. 1721 – 1730, 2008.
- NAKA, K. et al. Effect of Gold Nanoparticles as a Support for the Oligomerization of L-Cysteine in an Aqueous Solution. **Langmuir**, v. 13, p. 5546 – 5549, 2003.
- NOORLANDER, C. W. et al. Horizon scan of nanomedicinal products. **Nanomedicine**, v. 10, n. 10, p. 1599 – 1618, maio 2015.
- OSTROWSKI, A. et al. Overview about the localization of nanoparticles in tissue and cellular context by different imaging techniques. **Beilstein Journal of Nanotechnology**, v. 6, n. 1, p. 263 – 280, 2015.
- PAN, Y. et al. Gold nanoparticles of diameter 1.4 nm trigger necrosis by oxidative stress and mitochondrial damage. **Small**, v. 5, p. 2067 – 2076, 2009.
- PARDESHI, C. et al. Solid lipid based nanocarriers: An overview. **Acta Pharm.**, v. 62, n. 4, p. 433 – 472, 2012.
- PARHI, R.; SURESH, P. Preparation and Characterization of Solid Lipid Nanoparticles A Review. **Current Drug Discovery Technologies**, v. 9, n. 1, p. 2 – 16, 2012.
- PEER, D. et al. Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. **Nature Nanotechnology**, v. 2, p. 751 – 760, 2007.

- PLANK, C. et al. Activation of the complement system by synthetic DNA complexes: a potential barrier for intravenous gene delivery. **Hum. Gene Ther.**, p. 1437 – 1446, 1996.
- POLAND, C. et al. Carbon nanotubes introduced into the abdominal cavity of mice show asbestos-like pathogenicity in a pilot study. **Nat. Nanotechnol.**, v. 3, p. 423 – 428, 2008.
- PY-DANIEL, K. R. **Desenvolvimento e aplicação biológica de nanossistemas contendo o fotossensibilizante cloreto de alumínio ftalocianina**. 2017. Tese (BIOLOGIA ANIMAL) — Universidade de Brasília.
- RAJENDRAN, L.; KNOLKER, H.; SIMONS, K. Subcellular targeting strategies for drug design and delivery. **Nature Review Drug Discovery**, v. 9, p. 29 – 42, 2010.
- RAYNAL, P. et al. Macrophage endocytosis of superparamagnetic iron oxide nanoparticles: mechanisms and comparison of ferumoxides and ferumoxtran-10. **Invest. Radiol.**, v. 39, p. 56 – 63, 2004.
- REINERS, J. J. et al. Release of cytochrome c and activation of pro-caspase-9 following lysosomal photodamage involves bid cleavage. **Cell Death Differ.**, v. 9, n. 9, p. 934 – 944, 2002.
- MULLER, RH. et al. Cyclosporine-loaded solid lipid nanoparticles (SLN): Drug–lipid physicochemical interactions and characterization of drug incorporation. **Eur J Pharm Biopharm**, v. 68, p. 535 – 544, 2008.
- ROBERTS, J.; BHALGAT, M.; ZERA, R. Preliminary biological evaluation of polyamidoamine (PAMAM) Starburst(TM) dendrimers. **J. Biomed. Mater. Res.**, p. 53 – 65, 1996.
- RODRIGUES, M. C. Terapia fotodinâmica mediada por extrato de cajuru e cloreto de alumínio-ftalocianina em nanoemulsões no tratamento de câncer de mama in vitro. 2014.
- ROSI, N. L.; MIRKIN, C. A. Nanostructures in Biodiagnostics. **Chem. Rev.**, v. 4, p. 1547 – 1562, 2005.
- RUKTANONCHAI, U. et al. Effect of lipid types on physicochemical characteristics, stability and antioxidant activity of gamma-oryzanol-loaded lipid nanoparticles. **J Microencapsul.**, v. 26, n. 7, p. 614 – 626, 2009.
- SARGENT JR., J. F. The National Nanotechnology Initiative: Overview, Reauthorization, and Appropriations Issues. **Con. Res. Ser.**, p. 69 – 76, 2013.
- SIBATA, C. H. et al. Photodynamic therapy: A new concept in medical treatment. **Braz J Med Biol Res.**, v. 33, n. 8, p. 869 – 880, 2000.
- SIGLIENTI, I. et al. Cytokine profile of iron-laden macrophages: implications for cellular magnetic resonance imaging. **J. Neuroimmunol.**, p. 166 – 173, 2006.
- SINGH, R.; LILLARD, J. W. Nanoparticle-based targeted drug delivery. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 86, n. 3, p. 215 – 223, December 2008.
- SOEMA, P. C. et al. Predicting the influence of liposomal lipid composition on liposome size, zeta potential and liposome-induced dendritic cell maturation using a design of experiments approach. **Eur J Pharm Biopharm.**, v. 94, p. 427 – 435, 2015.

SONG, J. L. et al. Design and synthesis of pregnenolone/2-cyanoacryloyl conjugates with dual NF- κ B inhibitory and anti-proliferative activities. **Bioorg Med Chem Lett.**, v. 27, n. 20, p. 4682 – 4686, 2017.

SOUSA JUNIOR, W. T. de. **Avaliação in vitro de potenciais novos fotossensibilizantes para terapia fotodinâmica em células de câncer de mama murino**. 2017. Monografia (Farmácia) — Universidade de Brasília.

STEICHEN, S. D.; CALDORERA-MOORE, M.; PEPPAS, N. A. A review of current nanoparticle and targeting moieties for the delivery of cancer therapeutics. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 48, n. 3, p. 416 – 427, 2013. ISSN 18790720. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2012.12.006>.

PELLEGRINO, T et al. On the development of colloidal nanoparticles towards multifunctional structures and their possible use for biological applications. **Small**, v. 1, p. 48 – 63, 2005.

TIAN, W. et al. Cellular uptake of nanoparticles by membrane penetration: a study combining confocal microscopy with FTIR spectroelectrochemistry. **ACS Nano.**, n. 2, p. 1251 – 1259, 2012.

TAVEIRA, S. F. **Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLS) como carreadores de fármacos para o tratamento tópico do câncer de pele**. 2009. Tese (Ciências Farmacêuticas) — Universidade de São Paulo.

TOMALIA, D. et al. A new class of polymers — starburst-dendritic macromolecules. **Polym. J.**, v. 17, p. 117 – 132, 1985.

TREUEL, L.; JIANG, X.; NIENHAUS, G. U. New views on cellular uptake and trafficking of manufactured nanoparticles. **J R Soc Interface.**, v. 10, n. 82, 2013.

USUDA, J. et al. Promotion of photodynamic therapy-induced apoptosis by the mitochondrial protein Smac/DIABLO: dependence on Bax. **Photochem Photobiol.**, v. 76, n. 2, p. 217 – 223, 2002.

VERMA, A.; ROTELLO, V. M. Surface recognition of biomacromolecules using nanoparticle receptors. **Chem. Commun.**, v. 3, p. 289 – 416, 2005.

XIANG, S. et al. Uptake mechanisms of non-viral gene delivery. **J Control Release.**, v. 158, n. 3, p. 371 – 378, 2012.

XUE, L.; CHIU, S.; OLEINICK, N. L. Photochemical destruction of the Bcl-2 oncoprotein during photodynamic therapy with the phthalocyanine photosensitizer Pc 4. **Oncogene**, v. 2, p. 3420 – 3427, 2015.

YEN, H.; HSU, S.; TSAI, C. Cytotoxicity and immunological response of gold and silver nanoparticles of different sizes. **Small**, p. 1553 – 1561, 2009.

YONCHEVA, K.; LIZARRAGA, E.; IRACHE, J. M. Pegylated nanoparticles based on poly(methyl vinyl ether-co-maleic anhydride): preparation and evaluation of their bioadhesive properties. **Eur J Pharm Sci.**, v. 24, p. 411 – 419, 2005.

ZHANG, J. et al. Synthesis and evaluation of new potential benzo[a]phenoxazinium photosensitizers for anticancer photodynamic therapy. **Molecules**, v. 23, n. 6, p. 1436–, 2018.

ANEXO A – Produções Bibliográficas relacionadas ao trabalho

A xanthene derivative, free or associated to nanoparticles, as a new potential agent for anticancer photodynamic therapy

Victor Carlos Mello Silva¹, Juan Zhang^{1,2}, Wellington Tavares Sousa Júnior¹, Mosar Correa Rodrigues^{1,3}, José Athayde Vasconcelos Morais^{1,3}, Cheng-Shi Jiang², João Paulo Figueiró Longo³, Ricardo Bentes Azevedo³, Luís Alexandre Muehlmann^{1*}

¹ *Faculty of Ceilandia, University of Brasilia, Brasilia 72220275, Brazil*

² *School of Biological Science and Technology, University of Jinan, Jinan 250022, China.*

³ *Institute of Biological Sciences, University of Brasilia, Brasilia 70910900, Brazil*

**Corresponding author: victor@spctm.com*