



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NANOCIÊNCIA E NANOBIOTECNOLOGIA
(PPGNANO)

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**ESTUDO *IN VITRO* DA EFICÁCIA DA TERAPIA FOTODINÂMICA MEDIADA
POR NANOCOMPÓSITOS DE OURO-PLURONIC CONJUGADOS AO CLORETO
DE ALUMÍNIO-FTALOCIANINA NO TRATAMENTO DE CÂNCER DE MAMA**

SÂMARA MARIA PINHEIRO VAINAUSKAS OLIVEIRA

BRASÍLIA - DF

2026

SÂMARA MARIA PINHEIRO VAINAUSKAS
OLIVEIRA

**ESTUDO *IN VITRO* DA EFICÁCIA DA TERAPIA FOTODINÂMICA MEDIADA
POR NANOCOMPÓSITOS DE OURO-PLURONIC CONJUGADOS AO
CLORETO DE ALUMÍNIO-FTALOCIANINA NO TRATAMENTO DE CÂNCER
DE MAMA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Nanociência e Nanobiotecnologia

Orientadora: Profa. Dra. Laise Rodrigues de Andrade

BRASÍLIA-DF

2026

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho às minhas queridas filhas Alice e Aurora, que fazem da minha vida um lugar mais doce e cheio de propósito. Ao meu companheiro de vida, Rafael, que esteve comigo me motivando durante todo o período. À minha mãe, Lourdes, cuja o cuidado e a força me inspiram, e à minha irmã, Bruna, que sempre esteve torcendo por mim. Esta conquista é nossa.

AGRADECIMENTOS

A Deus, primeiramente, agradeço pela vida, pela força e pelo cuidado em cada etapa desta jornada. Em especial, sou grata por ter me sustentado no momento em que recebi o diagnóstico de câncer de tireoide, dando-me coragem, serenidade e esperança para enfrentar essa fase e, ainda assim, seguir adiante.

Ao meu marido, Rafael, pelo amor, companheirismo, paciência e apoio incondicional, por estar ao meu lado em todos os momentos e por nunca me deixar desistir, mesmo nos dias mais difíceis; e às minhas filhas, Alice e Aurora, pela compreensão diante da minha ausência em diversos momentos ao longo dessa jornada, vocês são minha maior fonte de motivação. Amo muito vocês!

À minha mãe, Lourdes, por todo o apoio incondicional e, especialmente, por ajudar nos cuidados da Alice e Aurora durante todo o processo de desenvolvimento deste trabalho, tornando possível a concretização deste sonho. À minha irmã, Bruna, pelo incentivo, carinho e presença constante, mesmo à distância.

Aos meus avós, Jackson e Maria José, e ao meu pai Marcelo, que já não estão fisicamente entre nós, mas permanecem vivos em minha memória, em meus valores e em tudo o que sou. Este trabalho também é dedicado a vocês, que foram e continuam sendo parte fundamental da minha história.

À minha professora e orientadora, Dra. Laise Rodrigues de Andrade, expresse minha profunda gratidão por todo o cuidado, dedicação, paciência e apoio ao longo de todo o processo. Obrigada por acreditar em mim, pela orientação científica, mas também humana, e por estar presente em todos os momentos, dos mais desafiadores aos de conquista.

À banca examinadora, composta pelas professoras Deizilene de Souza Barbosa, Marcella Lemos Brettas Carneiro e Melissa Silva Monteiro de Mendonça, agradeço pela disponibilidade em participar da avaliação deste trabalho, pelas contribuições, sugestões e pelo olhar crítico que certamente enriqueceram esta pesquisa.

À professora Maria Aparecida Godoy Soler, agradeço pela gentil disponibilização do nanocompósito utilizado neste estudo, contribuição essencial para o desenvolvimento desta pesquisa, e à Aline Beatriz da Silva Santos, minha sincera gratidão pela síntese do nanocompósito, realizada com grande dedicação e colaboração, inclusive após a conclusão de seu mestrado, tornando possível a continuidade e a realização deste trabalho.

Ao professor Aisel Valle Garay, agradeço pela valiosa colaboração e auxílio na realização e interpretação das leituras de DLS, fundamentais para a caracterização das nanopartículas neste estudo.

Aos técnicos Raffael, Karen, Diogo e Igor, agradeço imensamente pela disponibilidade, atenção e auxílio nos experimentos, fundamentais para a realização deste trabalho.

Aos meus colegas de bancada Danielly, Luísa, Lara e Lohara pelo convívio diário, pelas trocas de conhecimento, pela ajuda mútua e pelos momentos de leveza em meio à rotina intensa do laboratório.

Aos meus colegas de trabalho, Lucinete, Gil, Selma, Jailton, Josy e Maria de Fátima, e à minha chefe, Deusa, agradeço pela compreensão, empatia e apoio durante os plantões, especialmente nos períodos de maior cansaço. O respeito e a solidariedade de vocês fizeram toda a diferença.

Por fim, agradeço à Universidade de Brasília (UnB), pela oportunidade, pela estrutura e pelo ambiente acadêmico que possibilitaram meu crescimento pessoal, profissional e científico ao longo desta trajetória.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a concretização deste trabalho, minha sincera gratidão.

RESUMO

A terapia fotodinâmica (TFD) no câncer de mama é limitada pela agregação e instabilidade em meio aquoso de fotossensibilizantes (FS) hidrofóbicos, como o cloreto de alumínio-ftalocianina (AlClPc), sendo a nanotecnologia uma estratégia para otimizar suas propriedades físico-químicas e biológicas. O objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia da TFD mediada por nanocompósitos de ouro-Pluronic associados ao AlClPc (AuPLU/AlClPc) contra células tumorais murinas. De acordo com o espalhamento dinâmico de luz (DLS), o AuPLU/AlClPc apresentou propriedades coloidais dependentes do meio dispersante, com DH de $200,4 \pm 70,27$ nm em água e $90,29 \pm 36,73$ nm em meio fisiológico, PDI variando de $0,49 \pm 0,09$ a $0,52 \pm 0,04$ e potencial zeta de $-19,80 \pm 13,29$ mV (água) e $-12,64 \pm 10,05$ mV (meio). A espectroscopia UV-vis revelou bandas características de LSPR entre 520-580 nm e da banda Q do AlClPc entre 670-690 nm, indicando integridade estrutural sob condições de diluição. Ensaio fotoquímico demonstraram maior geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) pelo AuPLU/AlClPc, evidenciada por redução da absorvância do DPBF 50% superior à do AlClPc livre. Após 24 h de tratamento no escuro, o AuPLU/AlClPc apresentou toxicidade dependente da concentração em células 4T1-luc, reduzindo a viabilidade em até 49,71%, enquanto o AlClPc livre reduziu cerca de 30%. Após irradiação precedida de 15 min de incubação com concentrações não tóxicas de AuPLU/AlClPc, a viabilidade de 4T1-luc foi reduzida para aproximadamente 2-3%; em condições equivalentes, o AlClPc livre resultou em ~7%, sem benefício adicional observado para tempos de incubação mais longos (30-60 min). Em fibroblastos NIH-3T3, o AuPLU/AlClPc manteve viabilidade superior a 90% no escuro, enquanto AlClPc livre reduziu a viabilidade em cerca de 24%; após a TFD com 15 min de tratamento, foram observadas viabilidades de aproximadamente 27% (AlClPc) e entre 16-24% (AuPLU/AlClPc), sugerindo seletividade moderada. Do ponto de vista mecanístico, o AuPLU/AlClPc promoveu aumento dos níveis intracelulares de EROs (36% superior ao controle negativo), associado a aproximadamente 77% de fragmentação de DNA e cerca de 94% de lesão de membrana. Em conjunto, os resultados indicam que, apesar da eficácia fotodinâmica semelhante à do FS livre, o AuPLU/AlClPc oferece vantagens como maior estabilidade coloidal, maior eficiência fotoquímica e perfil de segurança aprimorado no escuro, configurando-se como uma plataforma promissora para a otimização da TFD.

Palavras-chave: terapia fotodinâmica; nanopartículas de ouro; pluronic; cloreto de alumínio-ftalocianina; câncer de mama.

ABSTRACT

Photodynamic therapy (PDT) for breast cancer is limited by the aggregation and instability of hydrophobic photosensitizers (PS), such as aluminum phthalocyanine chloride (AlClPc), in aqueous media, and nanotechnology has emerged as a strategy to optimize their physicochemical and biological properties. The aim of this study was to evaluate the efficacy of PDT mediated by gold–Pluronic nanocomposites associated with AlClPc (AuPLU/AlClPc) against murine tumor cells. According to dynamic light scattering (DLS), AuPLU/AlClPc exhibited dispersion medium-dependent colloidal properties, with DH of 200.4 ± 70.27 nm in water and 90.29 ± 36.73 nm in physiological-like medium, PDI ranging from 0.49 ± 0.09 to 0.52 ± 0.04 , and zeta potential of -19.80 ± 13.29 mV (water) and -12.64 ± 10.05 mV (medium). UV–Vis spectroscopy revealed characteristic LSPR bands between 520–580 nm and the Q band of AlClPc between 670–690 nm, indicating structural integrity under dilution conditions. Photochemical assays demonstrated enhanced generation of reactive oxygen species (ROS) by AuPLU/AlClPc, evidenced by a 50% greater reduction in DPBF absorbance compared to free AlClPc. After 24 h of dark treatment, AuPLU/AlClPc exhibited concentration-dependent toxicity in 4T1-luc cells, reducing viability by up to 49.71%, whereas free AlClPc reduced viability by approximately 30%. Following irradiation preceded by 15 min incubation with non-toxic concentrations of AuPLU/AlClPc, 4T1-luc viability was reduced to approximately 2–3%; under equivalent conditions, free AlClPc resulted in ~7%, with no additional benefit observed for longer incubation times (30–60 min). In NIH-3T3 fibroblasts, AuPLU/AlClPc maintained viability above 90% in the dark, whereas free AlClPc reduced viability by approximately 24%; after PDT with 15 min treatment, viabilities of approximately 27% (AlClPc) and 16–24% (AuPLU/AlClPc) were observed, suggesting moderate selectivity. From a mechanistic perspective, AuPLU/AlClPc promoted increased intracellular ROS levels (36% higher than the negative control), associated with approximately 77% DNA fragmentation and about 94% membrane damage. Taken together, these results indicate that, despite exhibiting photodynamic efficacy comparable to that of the free PS, AuPLU/AlClPc offers advantages such as improved colloidal stability, enhanced photochemical efficiency, and an improved safety profile in the dark, supporting its potential as a promising platform for PDT optimization.

Keywords: photodynamic therapy; gold nanoparticles; Pluronic; aluminum phthalocyanine chloride; breast cancer.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Mecanismos de reação fotodinâmica (adaptado de Kwiatkowski et al. (2018)). 10
- Figura 2.** Avaliação da estabilidade coloidal das formulações AuPLU e AuPLU/AICIPc ao longo de 21 dias de armazenamento, a partir do primeiro ponto experimental de análise (tempo 1). Os gráficos representam: (A) diâmetro hidrodinâmico médio (DH), (B) índice de polidispersão (PDI) e (C) potencial zeta (PZ), determinados por espalhamento dinâmico de luz (DLS). Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão (quatro medidas independentes em quintuplicata cada). A significância estatística foi determinada por Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn ($p < 0,05$). Não foram observadas diferenças significativas nos parâmetros avaliados ao longo do tempo para cada formulação, dentro de uma mesma condição experimental. 26
- Figura 3.** Absorbância do 1,3-difenil-isobenzofurano (DPBF) após exposição às amostras de AuPLU/AICIPc ou AICIPc livre a 5 $\mu\text{g/ml}$, sob irradiação com luz LED. * Diferença estatisticamente significativa do grupo AuPLU/AICIPc em relação ao tempo inicial (sem irradiação; fluência 0). Os dados foram apresentados como média \pm desvio padrão de três ensaios independentes realizados em triplicata técnica ($n = 9$). A significância estatística foi determinada por teste de Friedman e pós-teste de Dunn ($p < 0,05$). ^{a,b} Diferença estatisticamente significativa entre os grupos AICIPc e AuPLU/AICIPc. 28
- Figura 4.** Espectroscopia UV-vis do nanocompósito AuPLU em diferentes concentrações associado e não-associado a AICIPc a 5 $\mu\text{g/mL}$ 30
- Figura 5.** Efeito de AuPLU/AICIPc na viabilidade de células 4T1, na ausência de irradiação, determinado pelo ensaio de MTT. As células 4T1 foram incubadas, por 24 h, com AuPLU em concentrações variando de 0,16 a 5,06 μM de Au, associado ao AICIPc na concentração fixa de 5 $\mu\text{g/mL}$. Os componentes isolados (AuPLU, AICIPc e PLU) foram avaliados de forma equivalente. Os dados foram apresentados como média \pm desvio padrão de três ensaios independentes realizados em triplicata técnica ($n = 9$). A significância estatística foi determinada por Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn ($p < 0,05$). Os asteriscos indicam diferenças significativas em relação ao controle negativo: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$ 31
- Figura 6.** Morfologia de células 4T1-luc após 24 h de exposição aos tratamentos avaliados no ensaio de MTT, incluindo AuPLU, AICIPc livre e o conjugado AuPLU/AICIPc, nas concentrações de 0,63 μM (Au) e 5 $\mu\text{g/mL}$ (AICIPc). Barras de escala: 400 μm (direita) e 200 μm (esquerda). Detritos celulares estão indicados em vermelho. 33
- Figura 7.** Terapia fotodinâmica em células tumorais 4T1. Viabilidade de células tumorais 4T1 após tratamento com AICIPc livre, AuPLU e AuPLU/AICIPc, em condições de escuro e após irradiação luminosa, avaliada pelo ensaio de MTT. As células foram tratadas por diferentes tempos (15, 30, 45 e 60 min) antes da irradiação. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão de três ensaios independentes realizados em triplicata técnica ($n = 9$). Diferenças estatisticamente significativas foram determinadas por Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn ($p < 0,05$). Hashtags (#) indicam diferenças significativas em relação ao controle irradiado; Asteriscos (*) indicam diferenças significativas entre os grupos AuPLU e AuPLU/AICIPc tratados com a mesma concentração; Letra (a) indica diferença significativa entre AuPLU/AICIPc não-irradiado e irradiado. 35
- Figura 8.** Morfologia celular de 4T1-luc após 15 min de incubação e terapia fotodinâmica (TFD), para os grupos AuPLU, AICIPc livre e AuPLU/AICIPc, nas concentrações de 0,63 μM (Au) e 5 $\mu\text{g/mL}$ (AICIPc). Barras de escala: 200 μm 37
- Figura 9.** Resposta fotodinâmica em células não tumorais NIH-3T3. Viabilidade de células NIH-3T3 após terapia fotodinâmica com AICIPc livre, AuPLU, PLU e o sistema AuPLU/AICIPc, determinada pelo ensaio de MTT. O sistema AuPLU/AICIPc e o AuPLU foram avaliados nas concentrações de 0,16, 0,32 e 0,63 μM de Au, o PLU nas concentrações de 0,24, 0,49 e 0,98 μM , e o AICIPc livre na concentração de 5 $\mu\text{g/mL}$. As barras representam a viabilidade celular após irradiação luminosa. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão de três ensaios independentes realizados em triplicata técnica ($n = 9$). Diferenças estatisticamente significativas foram determinadas por Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn ($p < 0,05$). Hashtags (#) indicam

diferenças significativas em relação ao controle irradiado; Asteriscos (*) indicam diferenças significativas entre os grupos AuPLU e AuPLU/AICIPc tratados com a mesma concentração; Letra (a) indica diferença significativa entre AuPLU/AICIPc não-irradiado e irradiado. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ 38

Figura 10. Monitoramento em tempo real da proliferação de células 4T1 submetidas a TFD mediada por AuPLU/AICIPc. A luminescência foi monitorada por 72 h (0, 24, 48 e 72 h) como indicador da atividade metabólica celular. Tempo 0 refere-se ao período imediatamente após a TFD. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão de três ensaios independentes realizados em triplicata técnica (n = 9). Diferenças estatisticamente significativas foram determinadas por Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn ($p < 0,05$). 40

Figura 11. Morfologia celular de 4T1-luc após 15 min de incubação e avaliação 72 h após a terapia fotodinâmica (TFD), nos grupos AuPLU, AICIPc livre e AuPLU/AICIPc, nas concentrações de 0,63 μ M (Au) e 5 μ g/mL (AICIPc). Barras de escala: 400 μ m. Em vermelho debris. 41

Figura 12. Detecção da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) em células 4T1 por citometria de fluxo utilizando a sonda fluorescente CellROX Green®. (A) Quantificação da mediana da intensidade de fluorescência (MIF, unidades arbitrárias) para os grupos controle, AICIPc livre, AuPLU e AuPLU/AICIPc. (B) Histogramas representativos da intensidade de fluorescência no canal FL1-A para os grupos controle, AICIPc livre, AuPLU e AuPLU/AICIPc, evidenciando o deslocamento do sinal fluorescente após os diferentes tratamentos. Os dados são apresentados como boxplot indicando mediana, intervalo interquartil e valores individuais de dois ensaios independentes realizados em triplicata técnica (n = 6). Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos analisados (Kruskal-Wallis, $p > 0,05$). 44

Figura 13. Fragmentação de DNA em células 4T1 após terapia fotodinâmica (TFD) avaliada por citometria de fluxo após coloração com IP. (A) Percentual de DNA fragmentado (%) para os grupos controle negativo, controle positivo (H_2O_2), AICIPc, AuPLU e AuPLU/AICIPc. (B) Histogramas representativos da intensidade de fluorescência do IP, canal FL1-A para os diferentes grupos, evidenciando alterações no perfil de fluorescência após os tratamentos. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão de duas replicatas técnicas (n = 2). Diferenças estatisticamente significativas foram determinadas por ANOVA one-way seguida de teste pós-hoc Dunn (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$). 45

Figura 14. Avaliação da integridade da membrana plasmática de células 4T1 imediatamente após a TFD mediada por AuPLU/AICIPc, determinada pelo ensaio de exclusão por azul de tripan. As barras representam a porcentagem de células com membrana íntegra (preto) e membrana lesionada (cinza) nos grupos controle, AICIPc livre, AuPLU e AuPLU/AICIPc. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão de dois ensaios independentes em triplicata técnica (n = 6). As letras **a** e **b** indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle e ao grupo AuPLU, respectivamente (Kruskal-Wallis, teste post-hoc de Dunn, $p < 0,05$). 46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Diâmetro hidrodinâmico (DH), índice de polidispersão (PDI) e potencial zeta (PZ) do nanocompósito de ouro-Pluronic associado ao cloreto de alumínio ftalocianina (AuPLU/AlClPc).....	24
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$^1\text{O}_2$: Oxigênio Singlete

4T1-luc: Carcinoma mamário murino com expressão de luciferase *firefly*

AlClPc: Cloreto de alumínio-ftalocianina

Au⁰: Ouro no estado de oxidação zero (ouro metálico/coloidal)

AuNPs: Nanopartículas de ouro

AuPLU/AlClPc: Nanocompósito de ouro-Pluronic F127 conjugado com cloreto de alumínio-ftalocianina

AuPLU: Nanocompósito de ouro-Pluronic F127

DH: Diâmetro hidrodinâmico

DLS: Espalhamento dinâmico de luz

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (meio de cultura de Dulbecco modificado)

DMSO: Dimetilsulfóxido

DPBF: 1,3-difenilisobenzofurano

EROs: Espécies reativas de oxigênio

FS: Fotossensibilizante

FSC: *Forward Scatter* (dispersão frontal)

H₂O₂: Peróxido de hidrogênio

HAuCl₄: Ácido cloroáurico

LSPR: *Localized Surface Plasmon Resonance* (ressonância plasmônica de superfície localizada)

MTT: Brometo de 3-(4,5 dimetiltiazol-2-il)-2-5-difenil-tetrazólio

NIH-3T3: Linhagem de fibroblastos murinos

NPs: Nanopartículas

PBS: *Phosphate-Buffered Saline* (solução salina tamponada com fosfato)

PDI: Índice de polidispersão

PLU: Copolímero tribloco Pluronic[®] F-127

PZ: Potencial zeta

RPMI 1640: meio de cultura celular RPMI 1640

SFB: Soro fetal bovino

SSC: *Side Scatter* (dispersão lateral)

TFD: Terapia fotodinâmica

UnB: Universidade de Brasília

UV-vis: Ultravioleta visível

μg: Micrograma

μM: Micromolar

mL: Mililitro

μL: Microlitro

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	1
2.	REFERENCIAL TÉORICO	3
2.1.	Câncer de mama	3
2.2.	Nanotecnologia	5
2.3.	Nanopartículas de ouro	7
2.4.	Terapia fotodinâmica	9
2.5.	Cloreto de alumínio-ftalocianina	12
3.	OBJETIVOS	16
3.1.	Objetivo geral.....	16
3.2.	Objetivos específicos	16
4.	MATERIAL E MÉTODOS	17
4.1.	Síntese e caracterização de nanocompósitos de AuPLU/AICIPc.....	17
4.1.1.	Síntese de AuPLU/AICIPc	17
4.1.2.	Caracterização físico-química de AuPLU/AICIPc.....	17
4.1.3.	Caracterização fotoquímica de AuPLU/AICIPc.....	17
4.2.	Avaliação da estabilidade de AuPLU sob condições de diluição	18
4.3.	Ensaio biológicos <i>in vitro</i>	18
4.3.1.	Cultura e manutenção de linhagens celulares	18
4.3.2.	Citotoxicidade de AuPLU/AICIPc em células 4T1-luc na ausência de irradiação ..	19
4.3.3.	Fotocitotoxicidade da TFD mediada por AuPLU/AICIPc em células 4T1-luc e NIH-3T3	19
4.3.4.	Efeito de AuPLU/AICIPc na morfologia celular.....	20
4.3.5.	Eficácia a longo prazo da TFD mediada por AuPLU/AICIPc: monitoramento da viabilidade celular em tempo real	20
4.3.6.	Análise dos mecanismos antitumorais da TFD mediada por AuPLU/AICIPc em células 4T1-luc por citometria de fluxo.....	21
4.3.6.1.	<i>Análise do estresse oxidativo</i>	22
4.3.6.2.	<i>Análise de fragmentação do DNA</i>	22
4.3.7.	Análise da integridade da membrana celular	22
4.4.	Análise estatística	23
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
5.1.	Caracterização do nanocompósito.....	24

5.2.	Caracterização fotoquímica de AuPLU/AICIPc	27
5.3.	Estabilidade da estrutura do nanocompósito de AuPLU após diluições seriadas	29
5.4.	Avaliação da citotoxicidade de AuPLU/AICIPc na ausência de irradiação em células 4T1-luc	30
5.5.	Resposta fotodinâmica do sistema AuPLU/AICIPc em células NIH-3T3 e 4T1-luc	34
5.6.	Efeito a longo prazo da TFD mediada por AuPLU/AICIPc em células 4T1-luc	40
5.7.	Mecanismos antitumorais da TFD mediada por AuPLU/AICIPc em células 4T1-luc	42
6.	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	47
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50

1. INTRODUÇÃO

O câncer de mama é uma das principais causas de morbimortalidade entre mulheres em todo o mundo, representando um desafio significativo para o desenvolvimento de terapias eficazes e seletivas. Embora avanços substanciais tenham sido alcançados em relação ao diagnóstico precoce e ao tratamento, métodos convencionais como cirurgia, radioterapia e quimioterapia ainda estão associados a efeitos colaterais importantes e, muitas vezes, à falta de especificidade para células tumorais. Nesse contexto, abordagens terapêuticas minimamente invasivas e de alta seletividade têm recebido crescente atenção, destacando-se a terapia fotodinâmica (TFD) como uma alternativa promissora (Ostańska et al., 2021; Xiong et al., 2025).

A TFD consiste na ativação de um fotossensibilizante (FS) por meio de uma fonte de luz de comprimento de onda específico, resultando na formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) capazes de induzir morte celular. Existem três mecanismos pelos quais podem ocorrer a morte de células cancerosas: (i) morte direta devido a produção de EROs; (ii) infarto tumoral, devido a dano ao sistema vascular associado ao tumor; ou (iii) ativação de uma resposta imune contra as células tumorais. Tais mecanismos não são excludentes e podem ocorrer de forma concomitante, influenciando-se mutuamente (Borzęcka et al., 2021).

Dentre os FS de segunda geração, o cloreto de alumínio-ftalocianina (AlClPc) destaca-se por sua forte absorção no espectro do infravermelho próximo, boa estabilidade fotoquímica e elevada eficiência na formação do estado tripleto, favorecendo a transferência de energia ao oxigênio e a produção de EROs, especialmente oxigênio singlete; além disso, sua fluorescência pode ser explorada em aplicações de imagem. Entretanto, por ser hidrofóbico, AlClPc possui baixa solubilidade em meio fisiológico e tende a agregar em ambientes aquosos, o que pode reduzir a eficiência fotodinâmica e comprometer a sua eficácia terapêutica (Rodrigues et al., 2020).

Nesse cenário, materiais nanoestruturados têm surgido como plataformas capazes de melhorar a entrega, estabilidade e seletividade dos FS. As nanopartículas de ouro (AuNPs), em particular, apresentam excelente biocompatibilidade, elevada capacidade de funcionalização e propriedades ópticas favoráveis, o que as torna candidatas promissoras para aplicações em TFD (Choudhary et al., 2025).

Para que as vantagens das nanopartículas metálicas se traduzam em desempenho biológico, é fundamental garantir estabilidade coloidal e adequado controle de interface em meio aquoso. Nesse sentido, o Pluronic destaca-se por ser um copolímero anfifílico do tipo

PEO-PPO-PEO (polietileno óxido (PEO) – polipropileno óxido (PPO) – polietileno óxido (PEO)), capaz de atuar como estabilizante e modulador de superfície, reduzindo agregação e favorecendo dispersão em condições biológicas. Além disso, sua organização em estruturas micelares pode criar um microambiente favorável à associação de moléculas hidrofóbicas, como FS (Py-Daniel et al., 2016).

Os nanocompósitos de ouro-pluronic (AuPLU) configuram uma plataforma com potencial teranóstico, uma vez que podem integrar funções de diagnóstico por imagem e terapia em um mesmo sistema. De acordo com Gomes et al. (2023), esse nanossistema apresentou desempenho de contraste em tomografia computadorizada semelhante ao de um contraste iodado comercial (Optiray[®] 320), reforçando sua aplicabilidade na vertente diagnóstica. Com base nessas evidências, o presente trabalho explora a vertente terapêutica do AuPLU ao avaliá-lo como nanocarreador em TFD, com o objetivo de melhorar a dispersão e o desempenho de FS hidrofóbicos, como o AICIPc, em meio biológico e, conseqüentemente, potencializar a geração de EROs e o efeito citotóxico após irradiação.

Nessa perspectiva, o AuPLU reúne as propriedades do ouro e a compatibilidade conferida pela camada polimérica; sua conjugação com o AICIPc pode potencializar a internalização celular, aumentar a eficácia fotodinâmica e reduzir efeitos adversos, ampliando o desempenho da terapia em modelos tumorais.

Considerando o potencial terapêutico desse nanocompósito e a necessidade de estratégias mais eficazes contra o câncer de mama, este estudo teve como objetivo avaliar, *in vitro*, a eficácia da TFD mediada por nanocompósitos de ouro estabilizados por Pluronic e conjugados ao AICIPc (AuPLU/AICIPc) em células de carcinoma mamário. Hipotetiza-se que a conjugação favoreça a internalização do FS pelas células tumorais, aumente a produção de EROs e, conseqüentemente, potencialize os efeitos fotodinâmicos. Assim, espera-se que o sistema AuPLU/AICIPc apresente maior citotoxicidade em células de câncer de mama quando comparado ao AICIPc e ao AuPLU isoladamente, mantendo baixa toxicidade na ausência de irradiação, além de ausência de toxicidade em células não tumorais de fibroblasto murino (NIH-3T3).

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Câncer de mama

O câncer de mama permanece como a neoplasia mais incidente entre mulheres em todo o mundo e constitui um relevante problema de saúde pública. No Brasil, segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA, 2023), a doença corresponde a aproximadamente 30,1% dos novos casos de câncer em mulheres, excluindo-se os tumores de pele não melanoma, com estimativa de 73.610 novos diagnósticos anuais no triênio 2023–2025. Em escala global, estimativas do GLOBOCAN 2022 indicam mais de 2,3 milhões de novos casos por ano, refletindo não apenas a alta incidência, mas também o impacto expressivo da doença sobre os sistemas de saúde e a qualidade de vida das pacientes (Bray et al., 2024).

O desenvolvimento do câncer de mama resulta de uma interação complexa entre fatores genéticos, hormonais, ambientais e comportamentais. Entre os principais fatores de risco destacam-se o envelhecimento, o histórico familiar de câncer de mama ou ovário, mutações em genes de predisposição, especialmente BRCA1 e BRCA2, e fatores hormonais e reprodutivos, como menarca precoce, menopausa tardia e uso prolongado de terapias hormonais. Paralelamente, hábitos de vida como sedentarismo, obesidade, tabagismo e consumo excessivo de álcool têm sido associados ao aumento da incidência da doença, particularmente em países em desenvolvimento. Do ponto de vista biológico, o câncer de mama caracteriza-se por elevada heterogeneidade tumoral, refletida em distintos subtipos moleculares com comportamentos clínicos, prognósticos e respostas terapêuticas variados, o que torna seu manejo clínico especialmente desafiador (Łukasiewicz et al., 2021).

A classificação molecular baseia-se principalmente na expressão dos receptores hormonais de estrogênio e progesterona e do receptor HER2 (*Human Epidermal Growth Factor Receptor 2*). A partir desses marcadores, os tumores são agrupados nos subtipos luminal A, luminal B, HER2-positivo e basal, cada um com características biológicas e implicações terapêuticas distintas (Xiong et al., 2025).

O subtipo luminal A apresenta alta expressão de receptores hormonais, crescimento mais lento e melhor prognóstico, respondendo bem à hormonioterapia. Já o luminal B, embora também expresse receptores hormonais, caracteriza-se por maior taxa proliferativa e comportamento mais agressivo, frequentemente demandando quimioterapia associada à terapia hormonal. Os tumores HER2-positivos correspondem a cerca de 15% dos casos e apresentam superexpressão do receptor HER2, envolvido em vias de sinalização que

estimulam a proliferação celular e inibem a apoptose. Embora historicamente associados a pior prognóstico, o desenvolvimento de terapias alvo-dirigidas tem melhorado significativamente os desfechos clínicos desses pacientes. Por sua vez, o subtipo basal engloba tumores biologicamente mais agressivos, dentre os quais a maioria apresenta perfil triplo-negativo(Maqbool et al., 2022; H. Shao & Varamini, 2022).

Embora frequentemente utilizados como sinônimos, os termos “basal” e “triplo-negativo” não são equivalentes. Estima-se que cerca de 71% dos tumores triplo-negativos pertençam ao subtipo basal, evidenciando a heterogeneidade desse grupo. Tumores triplo-negativos podem ser subdivididos em seis diferentes categorias moleculares, como basais (BL1 e BL2), mesenquimal (M), mesenquimal com características de células-tronco (MSL), imunomodulatório (IM), luminal com receptor de andrógeno (LAR) e inespecífico (UNS), sendo caracterizados por alta agressividade, maior propensão à metástase e mortalidade elevada (Lau et al., 2022).

O tratamento do câncer de mama baseia-se, de maneira geral, na associação de diferentes abordagens terapêuticas convencionais, como cirurgia, quimioterapia, radioterapia, hormonioterapia e terapias-alvo, sendo a escolha da estratégia determinada pelo estágio da doença, subtipo molecular, presença de metástases e condições clínicas da paciente. Apesar dos avanços obtidos com essas modalidades, ainda persistem limitações importantes que comprometem tanto a eficácia quanto a segurança dos tratamentos disponíveis(Zafar et al., 2025).

Um dos principais desafios está relacionado à baixa seletividade das terapias sistêmicas. A quimioterapia e a radioterapia, por exemplo, afetam tanto células tumorais quanto tecidos saudáveis com alta taxa proliferativa, resultando em efeitos adversos significativos, como mielossupressão, toxicidade gastrointestinal, alopecia, cardiotoxicidade e fadiga. A necessidade de doses elevadas para atingir concentrações terapêuticas eficazes no tumor também pode intensificar a toxicidade sistêmica, limitando o escalonamento da dose e a adesão ao tratamento (Patel et al., 2024; Zafar et al., 2025).

Outro obstáculo significativo no manejo do câncer de mama é o desenvolvimento de resistência terapêutica o que é comum no tratamento de quaisquer subtipos do câncer de mama. As células tumorais podem ativar mecanismos adaptativos que reduzem progressivamente a resposta terapêutica, como alterações em vias de sinalização celular, aumento da expressão de proteínas de efluxo e modificações no microambiente tumoral. Esse cenário torna-se ainda mais crítico em subtipos agressivos, como o câncer de mama triplo-negativo, que não expressa receptores hormonais nem HER2, limitando as opções

terapêuticas disponíveis e reforçando a necessidade de estratégias alternativas mais seletivas e eficazes (Patel et al., 2024). Diante desse cenário, torna-se evidente a necessidade de estratégias inovadoras que ofereçam maior seletividade tumoral, reduzam efeitos adversos e superem os mecanismos de resistência, abrindo espaço para abordagens terapêuticas alternativas (Khandker et al., 2020).

2.2. Nanotecnologia

Durante muito tempo, a nanotecnologia foi descrita principalmente a partir de um critério dimensional, associada ao desenvolvimento e à aplicação de materiais na faixa de 1 a 100 nm (10^{-9} m). Essa definição histórica foi importante para delimitar um campo emergente e orientar o aprimoramento de técnicas de síntese e caracterização em escala extremamente reduzida. Entretanto, com a consolidação da área, tornou-se claro que o tamanho, embora relevante, não é suficiente para representar a complexidade científica envolvida. Conforme discutido por Grieneisen & Zhang (2011), um material nanoestruturado não se define apenas pelo tamanho pequeno, mas por apresentar propriedades físico-químicas e funcionais que emergem (ou se intensificam) quando sua dimensão é reduzida e quando sua composição e arquitetura são cuidadosamente organizadas (Ahmeda et al., 2017).

Essa perspectiva amplia o entendimento do que significa nanotecnologia na prática. Na nanoescala, o aumento expressivo da razão área de superfície/volume altera o comportamento do material, tornando a superfície um elemento central para sua reatividade e para suas interações com o meio. Como consequência, características como forma, tamanho médio, distribuição de tamanho (polidispersidade), carga superficial e natureza do revestimento passam a influenciar diretamente estabilidade, solubilidade, capacidade de adsorção e funcionalização química. Dependendo do tipo de material, podem ocorrer mudanças em propriedades ópticas e eletrônicas, como resposta à luz e comportamento de elétrons na superfície, criando possibilidades tecnológicas que não são observadas da mesma forma em estruturas macroscópicas. Assim, a nanotecnologia pode ser entendida como uma abordagem de engenharia de materiais na qual a organização em escala nanométrica permite projetar desempenho, controlar propriedades e ampliar aplicações (Joudeh & Linke, 2022).

Quando esse conjunto de conceitos é transposto para a área biomédica, surge a nanomedicina, que explora nanossistemas para diagnóstico, prevenção e tratamento de doenças. No contexto terapêutico, a proposta central é utilizar nanoplateformas para proteger

moléculas bioativas, aumentar sua estabilidade, modular sua farmacocinética e controlar sua liberação, favorecendo maior eficiência e, potencialmente, menor toxicidade. Diferentemente de uma molécula livre em solução, um agente veiculado em um nanossistema pode ter seu comportamento ajustado por parâmetros do próprio material, como composição, tamanho, superfície e arquitetura interna. Isso permite, por exemplo, melhorar a solubilidade de compostos hidrofóbicos, reduzir degradação prematura e aumentar a disponibilidade do agente no microambiente de interesse, aspectos particularmente relevantes em oncologia (Fan et al., 2023).

Entretanto, para que um nanossistema seja funcional em ambiente biológico, é necessário considerar que o organismo não é um meio inerte. Ao entrar em contato com fluidos biológicos, nanopartículas interagem rapidamente com proteínas, lipídios e outras biomoléculas, que podem se adsorver à superfície e alterar a forma como o sistema é reconhecido, transportado e internalizado. Por isso, o desempenho observado em condições simples, como água ultrapura, pode ser substancialmente diferente do observado em meios complexos, como meio de cultura suplementado com soro. Nesse sentido, estabilidade coloidal, resistência à agregação e manutenção de propriedades físico-químicas em condições fisiológicas são requisitos essenciais para garantir reprodutibilidade e confiabilidade experimental, especialmente quando o objetivo é avaliar biocompatibilidade e eficácia terapêutica de modo comparável entre diferentes formulações (Younis et al., 2022).

Em oncologia, a nanotecnologia tem ganhado destaque por oferecer ferramentas capazes de aumentar seletividade terapêutica e reduzir efeitos adversos, respondendo diretamente a limitações recorrentes das terapias convencionais. Em muitos casos, a quimioterapia e a radioterapia atingem tanto células tumorais quanto tecidos saudáveis, gerando toxicidades relevantes e limitando o escalonamento de dose. Outro desafio é que os mecanismos de resistência terapêutica podem comprometer a resposta clínica, especialmente em tumores biologicamente agressivos (B. Wang et al., 2024). Nesse cenário, sistemas nanoestruturados podem contribuir ao favorecer acúmulo relativo no tecido tumoral, modular distribuição e aumentar a concentração local de agentes terapêuticos, com potencial de reduzir exposição sistêmica e melhorar a relação entre eficácia e tolerabilidade (Patel et al., 2024). Ainda que o grau de seletividade dependa de múltiplos fatores, o princípio da nanomedicina oncológica é justamente explorar características do microambiente tumoral e do próprio nanossistema para tornar a intervenção mais direcionada.

No câncer de mama, essas aplicações se tornam particularmente relevantes devido à heterogeneidade tumoral e à diversidade de subtipos com perfis terapêuticos distintos. Em

subtipos mais agressivos e com opções terapêuticas limitadas, como o triplo-negativo, estratégias alternativas que ampliem seletividade e reduzam toxicidade têm valor ainda maior (Maqbool et al., 2022). Para além do carreamento de fármacos, a nanotecnologia pode ser empregada para otimizar terapias ativadas por estímulos, como luz, calor ou alterações do microambiente. No caso de terapias fotoativadas, por exemplo, a formulação em nanoestruturas pode melhorar dispersão e estabilidade de moléculas hidrofóbicas e favorecer sua internalização, aspectos diretamente relacionados ao desempenho de abordagens como a TFD. Assim, a nanotecnologia contribui para integrar o desenho do material com a estratégia terapêutica, abrindo caminho para sistemas mais controláveis e, potencialmente, mais eficazes (Overchuk et al., 2023).

Diversas classes de nanomateriais vêm sendo investigadas para aplicações biomédicas, incluindo sistemas lipídicos, poliméricos e materiais inorgânicos. Entre eles, as nanopartículas metálicas recebem atenção especial por combinarem estabilidade, versatilidade estrutural e propriedades físicas que podem ser exploradas tanto no diagnóstico quanto no tratamento. Esses sistemas permitem funcionalização de superfície, conjugação com moléculas bioativas e integração com plataformas de imagem, além de apresentarem propriedades ópticas e térmicas singulares que podem ampliar possibilidades terapêuticas. Dessa forma, a nanotecnologia se consolida como uma ferramenta estratégica no desenvolvimento de abordagens oncológicas mais seletivas e seguras, especialmente quando aplicada à engenharia de plataformas capazes de interagir de maneira específica com células e microambientes tumorais (B. Wang et al., 2024).

Nesse contexto, destacam-se as AuNPs como uma das plataformas mais estudadas e promissoras para aplicações em câncer de mama. Além de apresentarem elevada estabilidade e ampla possibilidade de funcionalização, as AuNPs exibem propriedades ópticas características, como a ressonância plasmônica de superfície localizada (LSPR), que favorece aplicações biomédicas e estratégias terapêuticas induzidas por luz (Khandker et al., 2020). Assim, à medida que a nanotecnologia se consolida como instrumento para aumentar seletividade e desempenho terapêutico, torna-se pertinente aprofundar a discussão sobre as AuNPs, suas propriedades e sua relevância como base para sistemas nanoestruturados utilizados no carreamento de agentes e na potencialização de terapias fotoativadas.

2.3. Nanopartículas de ouro

Entre os diversos nanomateriais investigados para aplicações biomédicas, as AuNPs ocupam posição de destaque devido à sua elevada biocompatibilidade, estabilidade química, facilidade de síntese e baixa toxicidade intrínseca. As AuNPs também apresentam ampla possibilidade de funcionalização com polímeros, fármacos, moléculas biológicas e anticorpos, o que permite a integração de funções diagnósticas e terapêuticas em um único sistema – abordagem conhecida como teranóstica, amplamente explorada no contexto do câncer de mama (Choudhary et al., 2025).

Do ponto de vista diagnóstico, o ouro possui elevado número atômico, característica que confere alta capacidade de atenuação de raios-x, tornando as AuNPs excelentes agentes de contraste para técnicas de imagem, como a tomografia computadorizada (CT) e outras modalidades baseadas em radiação ionizante. Adicionalmente, essas nanopartículas exibem LSPR, fenômeno óptico decorrente da oscilação coletiva dos elétrons livres da superfície metálica em resposta à luz incidente. Essa propriedade possibilita aplicações em imageamento óptico, espalhamento Raman intensificado por superfície (SERS) e monitoramento da distribuição das nanopartículas em tecidos biológicos (Si et al., 2021). No ambiente tumoral, tais aplicações são favorecidas pela microvasculatura desorganizada característica dos tumores sólidos, que apresenta maior permeabilidade e contribui para o acúmulo preferencial de nanopartículas no tecido neoplásico (Xiong et al., 2025).

As rotas clássicas de síntese de AuNPs, como os métodos de Turkevich et al. (1953), posteriormente investigado por Perala & Kumar (2013), geralmente envolvem múltiplas etapas reacionais, a utilização de agentes redutores e estabilizantes específicos, além de demandarem tempos de reação prolongados e resultarem na geração de resíduos químicos. Em contraste, abordagens mais recentes, como a proposta por Sakai & Alexandridis, (2005), utilizam copolímeros em meio aquoso capazes de atuar simultaneamente como agentes redutores e estabilizantes, permitindo síntese em etapa única, sob condições brandas e com menor impacto ambiental.

Entre os polímeros amplamente utilizados na formulação de nanocompósitos, destaca-se o Pluronic F127, um copolímero tribloco do tipo PEO-PPO-PEO (polietileno óxido (PEO) – polipropileno óxido (PPO) – polietileno óxido (PEO)). O Pluronic F127 apresenta caráter anfifílico, sendo capaz de se auto-organizar em estruturas micelares em meio aquoso, com um núcleo hidrofóbico e uma coroa hidrofílica. Essa característica o torna um eficiente estabilizante coloidal e um sistema eficaz para o encapsulamento de moléculas hidrofóbicas, como diversos FS utilizados em TFD, incluindo o AICIPc. Vale destacar que se trata de um polímero amplamente reconhecido por sua biocompatibilidade, baixa

toxicidade e aprovação para uso farmacêutico, o que reforça seu potencial translacional (Py-Daniel et al., 2016).

Nessa perspectiva, Gomes et al. (2023) aprimoraram essa estratégia ao empregar o copolímero Pluronic F127 associado à irradiação ultravioleta para promover a redução e estabilização do HAuCl_4 , possibilitando a formação de AuNPs em aproximadamente 10 minutos. Além da expressiva redução do tempo de síntese, o método favorece a obtenção de nanocompósitos com tamanho e morfologia mais uniformes quando comparadas às obtidas sob iluminação ambiente, representando um avanço relevante na produção rápida e controlada de nanopartículas. Ressalta-se que esse nanocompósito ouro-Pluronic sintetizado por irradiação UV corresponde à plataforma utilizada no presente estudo, previamente descrita como agente de contraste com desempenho semelhante ao do contraste iodado comercial Optiray[®] 320, além de apresentar baixa toxicidade em ensaios *in vitro* e *in vivo*, reforçando seu potencial para aplicações biomédicas.

Até o momento, não foram identificados ensaios clínicos envolvendo diretamente a plataforma baseada em AuNPs + F127, indicando que essa abordagem permanece em estágio pré-clínico de desenvolvimento (de Souza et al., 2022; Lockwood et al., 2025; Wu et al., 2024; Yang et al., 2022).

Ainda no contexto terapêutico, a literatura tem demonstrado que a conjugação de ftalocianinas a AuNPs representa uma estratégia eficaz para potencializar a TFD. Marrache et al. (2013) investigaram o efeito de um nanossistema híbrido no qual a ftalocianina de zinco (ZnPc) foi encapsulada em nanopartículas poliméricas revestidas externamente por AuNPs em células de câncer de mama murino 4T1. Os autores observaram ausência de toxicidade no escuro e aumento significativo da citotoxicidade após irradiação. O estudo evidenciou que o ouro atuou como plataforma carreadora essencial para a eficiência fotodinâmica, promovendo maior morte celular quando comparado ao FS livre.

2.4. Terapia fotodinâmica

A terapia fotodinâmica (TFD) é uma modalidade terapêutica minimamente invasiva que tem se destacado como uma alternativa promissora no tratamento do câncer de mama. Essa abordagem baseia-se na interação entre três componentes fundamentais: um fotossensibilizante (FS), uma fonte de luz com comprimento de onda apropriado para corresponder ao espectro de absorção do FS e o oxigênio molecular presente no tecido (Dai et al., 2012). Quando esses três elementos são combinados de maneira controlada, ocorre a

ativação do FS pela luz, resultando na formação de EROs, capazes de induzir dano celular localizado e seletivo(Dougherty & Marcus, 1992). A principal vantagem da TFD reside na possibilidade de direcionar a ação terapêutica ao tecido-alvo por meio da irradiação luminosa, minimizando os efeitos adversos sobre tecidos saudáveis adjacentes (Bartusik-Aebisher et al., 2025).

O mecanismo fotodinâmico é dependente de oxigênio e inicia-se com a absorção da energia luminosa pelo FS em seu estado fundamental (**Figura 1**). Esse processo promove a transição do FS para um estado singlete excitado, a partir do qual ele pode retornar ao estado basal por emissão de fluorescência ou sofrer cruzamento intersistema, alcançando o estado tripleto excitado. Esse estado apresenta maior tempo de vida, na ordem de nanossegundos a microssegundos, e é considerado essencial para a eficácia da TFD, pois a partir dele se desencadeiam as reações responsáveis pela geração das espécies citotóxicas (Kwiatkowski et al., 2018).

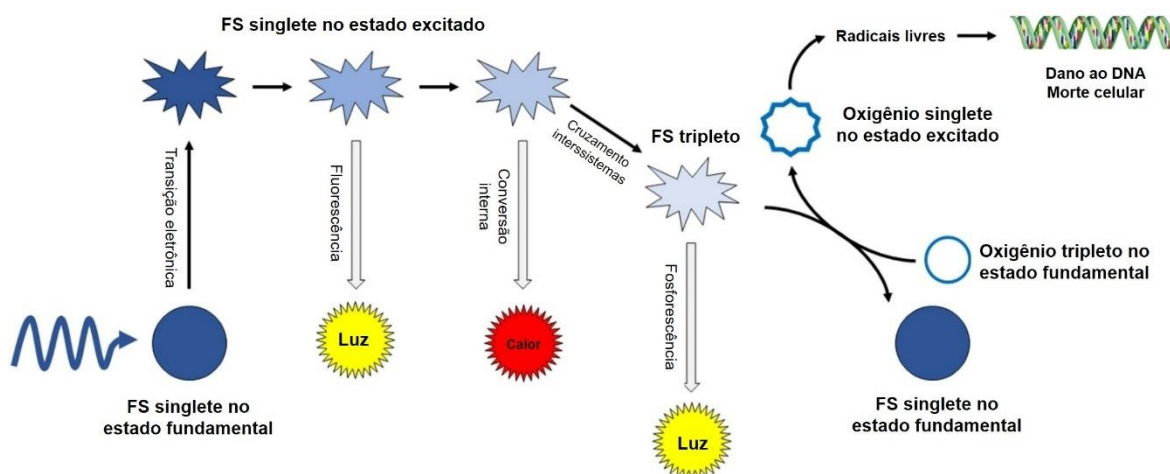


Figura 1. Mecanismos de reação fotodinâmica (adaptado de Kwiatkowski et al. (2018)).

A partir do estado tripleto excitado, dois mecanismos principais podem ser ativados. No mecanismo do tipo I, o FS transfere elétrons ou átomos de hidrogênio para moléculas do meio biológico, levando à formação de radicais livres e outras EROs, como o ânion superóxido, o radical hidroxila e o peróxido de hidrogênio. No mecanismo do tipo II, ocorre a transferência direta de energia do FS para o oxigênio molecular, resultando na formação de oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), uma espécie altamente reativa e de curta vida média, considerada um dos principais mediadores do efeito citotóxico observado na TFD(Correia et al., 2021).

As EROs fazem parte do metabolismo celular normal em organismos aeróbios e, em condições fisiológicas, seu equilíbrio é mantido por sistemas antioxidantes endógenos.

Contudo, quando a produção de EROs excede a capacidade antioxidante celular, instala-se um estado de estresse oxidativo, capaz de causar danos a lipídios de membrana, proteínas e ácidos nucleicos. Esse desequilíbrio pode culminar em morte celular por diferentes vias, incluindo apoptose, necrose ou autofagia, dependendo da intensidade do dano oxidativo e do tipo celular envolvido (Kwiatkowski et al., 2018). Por se basear em mecanismos físico-químicos inespecíficos associados à geração de EROs, a TFD apresenta baixa probabilidade de indução de resistência terapêutica, característica que a torna especialmente atrativa para o tratamento de tumores resistentes às terapias convencionais, como quimioterapia e radioterapia (Agostinis et al., 2011).

Para além da destruição celular direta e do dano ao leito vascular tumoral, a TFD pode desencadear um terceiro componente determinante: a ativação do sistema imune. Embora esse efeito seja tipicamente tardio em relação aos eventos fotoquímicos iniciais, ele pode sustentar respostas sistêmicas e contribuir para o controle de doença residual e de processos metastáticos. Após a TFD, observa-se uma resposta inflamatória aguda caracterizada pelo aumento de moléculas de adesão endotelial (como E-selectina e ICAM-1), ativação do complemento e liberação de mediadores pró-inflamatórios que favorecem o recrutamento de neutrófilos e macrófagos ao sítio tumoral. Em paralelo, células tratadas podem expor e/ou liberar padrões moleculares associados a dano e sinais de estresse, os quais potencializam a ativação de células apresentadoras de antígeno e a amplificação da resposta adaptativa. Como consequência, há maior participação de células NK e, sobretudo, de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, fundamentais para a consolidação de uma resposta antitumoral específica e duradoura, o que sustenta a dimensão imunogênica da TFD (Dudzic et al., 2024).

O FS desempenha papel central na eficácia da TFD e deve apresentar propriedades específicas para aplicações biológicas, como boa estabilidade fotoquímica, baixa toxicidade na ausência de luz, acúmulo preferencial em células-alvo, rápida eliminação do organismo e alta eficiência na geração de ¹O₂. Com base nessas características, os FS são classificados em gerações. Os compostos de primeira geração, como os derivados de hematoporfirina, foram os primeiros a serem utilizados clinicamente, mas apresentam limitações importantes, incluindo baixa seletividade tumoral, fototoxicidade cutânea prolongada e absorção em comprimentos de onda mais curtos, o que restringe a profundidade de penetração da luz nos tecidos (Correia et al., 2021).

O desenvolvimento de FS de segunda geração representou um avanço significativo para a TFD. Essa classe inclui porfirinas, clorinas, bacterioclorinas e ftalocianinas,

compostos que absorvem luz em comprimentos de onda mais longos, geralmente na região do vermelho e do infravermelho próximo, permitindo maior penetração tecidual e melhor alcance terapêutico. Esses FS também apresentam maior rendimento quântico de geração de $^1\text{O}_2$ e menor fototoxicidade residual. Entre eles, as ftalocianinas destacam-se por sua elevada estabilidade fotoquímica, forte absorção na faixa de 650-700 nm e alta eficiência na produção de EROs.

Portanto, a eficiência da TFD depende não apenas do regime de irradiação e da disponibilidade de oxigênio, mas também da manutenção do FS em estado fotoativo no microambiente celular, o que reforça a relevância de sistemas nanoestruturados para otimizar sua entrega e desempenho.

2.5. Cloreto de alumínio-ftalocianina

As ftalocianinas constituem uma classe de macrociclos aromáticos altamente conjugados, amplamente investigada no contexto da TFD, em razão de suas propriedades fotofísicas e fotoquímicas favoráveis. Estruturalmente, são formadas por quatro unidades isoindólicas interligadas por átomos de nitrogênio, originando um sistema macrocíclico altamente conjugado. Essa configuração confere intensa absorção na região do vermelho e do infravermelho próximo, associada a menor absorção na faixa intermediária do espectro visível, o que contribui para a redução da fotossensibilidade cutânea sob iluminação ambiente. Ademais, a possibilidade de inserção de metais no centro do macrociclo permite modular propriedades eletrônicas, ópticas e biológicas, além de aumentar a estabilidade do complexo, tornando as ftalocianinas plataformas versáteis para aplicações terapêuticas (X. Li et al., 2019).

Entre os derivados metálicos, o AlClPc destaca-se como um dos FS mais promissores para uso em TFD. Esse composto apresenta forte absorção na região do vermelho do espectro eletromagnético, com banda Q característica entre aproximadamente 670 e 690 nm, faixa considerada ideal para aplicações clínicas por possibilitar maior penetração da luz nos tecidos biológicos. Outro atributo relevante é que a AlClPc exibe elevado rendimento quântico de geração de $^1\text{O}_2$, principal agente citotóxico envolvido no mecanismo do tipo II da TFD, o que resulta em elevada eficiência fotodinâmica (RAK et al., 2019; Rossetti et al., 2011).

Outro aspecto relevante da AlClPc é sua elevada estabilidade fotoquímica, propriedade essencial para FS utilizados em TFD, pois reduz a degradação do composto

durante a irradiação e permite a manutenção de sua atividade terapêutica ao longo do tratamento. Quando comparada a FS de gerações anteriores, como os derivados de hematoporfirina, o AICIPc apresenta menor fototoxicidade cutânea prolongada e maior potencial de seletividade tumoral quando adequadamente veiculada, reforçando seu interesse para aplicações translacionais (Jia & Jia, 2012; Santos et al., 2020).

Apesar dessas vantagens, a aplicação clínica do AICIPc na forma livre é limitada por seu caráter hidrofóbico, que resulta em baixa solubilidade em meio aquoso e favorece a agregação molecular. Esse fenômeno compromete suas propriedades fotodinâmicas, levando à diminuição da absorção efetiva de luz, à redução do rendimento quântico de $^1\text{O}_2$ e, conseqüentemente, à perda de eficácia terapêutica. A agregação também pode alterar a biodistribuição do FS, dificultando sua internalização celular e reduzindo a seletividade tumoral (Ceron Jayme et al., 2022).

Nesse contexto, a incorporação da AICIPc em sistemas nanoestruturados tem sido amplamente explorada como estratégia para superar essas limitações. A associação do FS a nanopartículas, micelas poliméricas, lipossomas ou nanocompósitos aumenta sua solubilidade, reduz a agregação molecular e favorece uma distribuição mais homogênea no meio biológico. Adicionalmente, esses sistemas podem proteger o FS da degradação prematura e promover maior acúmulo intracelular, fatores fundamentais para o sucesso da TFD (Py-Daniel et al., 2016).

Py-Daniel et al. (2016) demonstraram que a incorporação do AICIPc em micelas de Pluronic F127 melhora significativamente sua dispersão em meio aquoso e reduz a agregação molecular, fator que compromete a eficiência fotodinâmica do composto livre. Essa formulação micelar preserva as propriedades fotofísicas do FS, favorece a geração de EROs e resulta em maior citotoxicidade celular após a irradiação luminosa. Em comparação com a forma livre, o sistema coloidal apresentou maior estabilidade e desempenho terapêutico, reforçando seu potencial como estratégia promissora para aplicações em TFD.

Especificamente no câncer de mama, há evidências importantes de que a formulação adequada de FS do tipo ftalocianina pode impactar não apenas efeitos locais, mas também desfechos relacionados a progressão tumoral. Um exemplo relevante é o estudo de Rodrigues et al. (2020) que avaliou TFD mediada por uma nanoemulsão contendo ftalocianina de alumínio em modelo murino de adenocarcinoma de mama 4T1, relatando eliminação de tumores primários e prevenção de metástases pulmonares após o tratamento, reforçando o potencial de formulações baseadas em ftalocianinas em câncer de mama biologicamente agressivo. Embora a formulação específica não seja idêntica à do presente

estudo, esse tipo de evidência sustenta a ideia de que, ao melhorar entrega, estabilidade e disponibilidade fotoquímica, sistemas nanoestruturados podem elevar o desempenho da TFD em modelos que se aproximam do fenótipo triplo-negativo.

Além da nanoformulação polimérica ou lipídica, a combinação de ftalocianinas com nanopartículas metálicas, especialmente as de ouro, tem ganhado destaque por reunir duas vantagens complementares: oferecer uma plataforma estável para veicular e organizar o FS e, ao mesmo tempo, explorar propriedades ópticas que favorecem terapias ativadas por luz. Em geral, nanoconjugados que associam ftalocianinas a AuNPs tendem a aumentar a internalização celular e a citotoxicidade induzida pela TFD, além de ampliarem o potencial de integração com abordagens teranósticas. Como exemplo, Crous & Abrahamse (2022) avaliaram um conjugado AlPcS₄Cl–AuNP (derivado sulfonado de ftalocianina de alumínio) em contexto de TFD e observaram efeitos biológicos relacionados à redução de características associadas à progressão tumoral em um modelo de câncer de pulmão, reforçando o potencial da plataforma ouro-ftalocianina para aprimorar respostas fotodinâmicas.

De modo complementar, Mkhobongo et al. (2023) também exploraram nanoconjugados de ftalocianinas com ouro em abordagens voltadas a subpopulações celulares de maior agressividade, como células-tronco tumorais, afirmando que a versão conjugada induziu aumento significativo na citotoxicidade e apoptose quando comparado a forma livre, reforçando que a engenharia do nanossistema pode influenciar captação e resposta ao estresse oxidativo fotoinduzido.

Uma revisão atual de Naeem et al. (2025) sobre conjugados ftalocianina-nanopartícula destaca que essas estratégias vêm sendo empregadas para superar limitações clássicas das ftalocianinas (hidrofobicidade e agregação), além de permitir maior controle de entrega e de desempenho fotodinâmico, apontando o ouro como uma das plataformas recorrentes nesse avanço.

Dessa forma, o AlClPc consolida-se como um FS de grande relevância para aplicações em TFD, especialmente quando integrado a plataformas nanoestruturadas, justificando sua escolha nesse estudo como abordagem promissora para o avanço da TFD aplicada ao câncer de mama. Nesse contexto, considerando o elevado potencial fotoquímico da AlClPc e suas limitações de solubilidade e agregação em meio aquoso, este trabalho investiga sua associação a um nanocompósito de ouro-Pluronic como estratégia para aumentar estabilidade, disponibilidade e resposta fotodinâmica *in vitro*.

O nanocompósito desenvolvido baseia-se na auto-organização do copolímero anfifílico PLU, que atua simultaneamente como sistema carreador e agente estabilizante. Durante a síntese, os íons Au^{3+} interagem com a porção hidrofílica do polímero e são subsequentemente reduzidos, formando ouro coloidal estabilizado pelo próprio copolímero. Paralelamente, o AICIPc, devido ao seu caráter hidrofóbico, associa-se preferencialmente ao núcleo hidrofóbico de PLU, onde também se encontram as AuNPs. Esse arranjo estrutural permite que o PLU estabilize as AuNPs e, ao mesmo tempo, atue como carreador do FS, possibilitando a incorporação conjunta de AuNPs estáveis e AICIPc em um único nanossistema.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

O presente estudo teve como objetivo caracterizar as propriedades físico-químicas do nanocompósito AuPLU/AICIPc e avaliar a eficácia da TFD mediada por esse nanossistema em células tumorais de mama.

3.2. Objetivos específicos

1. Caracterizar as propriedades físico-químicas de AuPLU e AuPLU/AICIPc, incluindo o diâmetro hidrodinâmico (DH), o índice de polidispersão (PDI), o potencial zeta (PZ) e a estabilidade coloidal.
2. Avaliar as propriedades fotoquímicas de AuPLU/AICIPc.
3. Avaliar a estabilidade da estrutura de AuPLU sob condições de diluição.
4. Determinar a citotoxicidade de AuPLU/AICIPc em células de adenocarcinoma mamário murino (4T1-luc) após 24 h de exposição, na ausência de irradiação.
5. Avaliar a citotoxicidade induzida pela TFD mediada por AuPLU/AICIPc em células 4T1-luc e fibroblastos murino (NIH-3T3), considerando diferentes tempos de exposição a AuPLU/AICIPc (15, 30, 45 e 60 min).
6. Analisar o impacto de AuPLU/AICIPc na morfologia de células 4T1-luc, tanto sob condições protegidas de luz quanto irradiadas.
7. Avaliar o impacto a longo prazo da TFD mediada por AuPLU/AICIPc sobre a viabilidade e a capacidade proliferativa de células 4T1-luc.
8. Investigar os mecanismos antitumorais da TFD mediada por AuPLU/AICIPc em células 4T1-luc.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Síntese e caracterização de nanocompósitos de AuPLU/AICIPc

4.1.1. Síntese de AuPLU/AICIPc

O nanocompósito AuPLU, obtido por síntese assistida por UV (Gomes et al., 2023), na concentração de 255 mg Au/L e 25,2 g/L de copolímero Pluronic F-127 (PLU), foi preparado e gentilmente cedido pelo Laboratório de Nanofilmes e Nano Dispositivos do Instituto de Física da UnB, sob coordenação da Profa. Dra. Maria Aparecida Godoy Soler Pajanian. Em síntese, soluções aquosas de ácido cloroáurico (HAuCl_4 , 2 mmol/L) e PLU (2 mmol/L) foram misturadas suavemente e mantidas em repouso. Em seguida, a mistura foi submetida à irradiação UV (254 nm, 16 W, 25° C) em uma câmara por 10 min, período no qual foi possível observar uma mudança de cor da solução reacional de amarelo para rosa. Após, a amostra foi transferida para tubos Eppendorf e centrifugada a 12.000 rpm por 120 min, a 10 °C, para a remoção do excesso de PLU. A solução de AICIPc foi preparada na concentração de 1 mg/mL, utilizando etanol como solvente orgânico, com auxílio de banho ultrassônico por 10 min, protegido de luz (Py-Daniel et al., 2016). Posteriormente, uma fração da solução de AICIPc foi associada ao nanocompósito, resultando na formação do nanossistema AuPLU/AICIPc, contendo o FS na concentração final de 5 µg/mL.

4.1.2. Caracterização físico-química de AuPLU/AICIPc

O DH, o PDI e o PZ de AuPLU e de AuPLU/AICIPc foram determinados utilizando o equipamento Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments®, ZEN3600, UK), através das técnicas de espalhamento dinâmico de luz (DLS) para DH e PDI, e mobilidade eletroforética para PZ. As medições foram realizadas a um ângulo de espalhamento de 173° a 25 °C, com um laser He-Ne de 4 mW operando a 632,8 nm. As amostras foram diluídas em água ultrapura e em meio de cultura RPMI 1640 na proporção de 1:100 (10 µL de AuPLU e 990 µL de água ou meio). Para avaliar a estabilidade coloidal, as formulações foram armazenadas em geladeira (4-8°C) e examinadas a cada 7 dias, durante um período de 21 dias.

4.1.3. Caracterização fotoquímica de AuPLU/AICIPc

A capacidade de produção de $^1\text{O}_2$ por AuPLU/AICIPc foi determinada pelo método de decomposição de 1,3-difenil-isobenzofurano (DPBF). A sonda DPBF reage irreversivelmente com $^1\text{O}_2$ e é decomposto, resultando em um decaimento de absorvância óptica que pode ser monitorado por espectrofotometria. A solução de DPBF foi preparada a 22,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ em etanol absoluto, agitada em vórtex por 2 minutos e exposta ao banho ultrassônico por 10 minutos até completa homogeneização. Em seguida, 10 μL da solução de DPBF foram adicionados a 190 μL de AuPLU/AICIPc contendo 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ do FS em uma placa de 96 poços.

A placa foi irradiada por 10 ciclos de 10 segundos cada, utilizando uma fonte de luz LED de 660 nm, posicionada a 10 cm de distância. A densidade de potência foi de 0,04 W/cm^2 , resultando em uma fluência energética de 0,4 J/cm^2 por ciclo e fluência total de 4 J/cm^2 . A absorvância de DPBF foi registrada a 410 nm antes e após cada ciclo de irradiação, utilizando o espectrofotômetro Varioskan™ LUX (Thermo Scientific, EUA). Para investigar se a associação entre os componentes AuPLU e AICIPc causa interferência na fotoatividade do FS, uma solução aquosa de AICIPc a 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ também foi incluída na análise. As amostras foram avaliadas em triplicata em dois experimentos independentes ($n=6/\text{amostra}$).

4.2. Avaliação da estabilidade de AuPLU sob condições de diluição

As amostras de AuPLU/AICIPc foram submetidas a diluições em água destilada e analisadas por espectroscopia de UV-vis (185-900 nm, resolução de 0,1 nm, varredura de 600 nm/min) em cubetas de quartzo, utilizando um espectrofotômetro Shimadzu UV-2600 (Shimadzu Europe, Alemanha). Os espectros UV-vis foram registrados para a identificação da banda de ressonância plasmônica de superfície localizada (LSPR, *Localized Surface Plasmon Resonance*), com o objetivo de verificar a manutenção da estrutura micelar das amostras de AuPLU sob condições de diluição aplicadas nos ensaios biológicos subsequentes.

4.3. Ensaios biológicos *in vitro*

4.3.1. Cultura e manutenção de linhagens celulares

Os experimentos *in vitro* foram realizados utilizando as seguintes linhagens celulares: adenocarcinoma mamário murino (ATCC – CRL-2539) com expressão de luciferase *firefly*

(4T1-luc) e fibroblasto murino NIH-3T3 (BCRJ *Code* 0191) As células 4T1-luc e NIH-3T3 foram cultivadas nos meios RPMI 1640 e DMEM (Gibco[®], Invitrogen[™], EUA), respectivamente, suplementados com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco[®], Invitrogen[™], EUA) e 1% de antibiótico-antimicótico (100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e 0,25 µg/mL de anfotericina B (Gibco[®], Invitrogen[™], EUA). As culturas celulares foram mantidas em incubadora umidificada a 37°C, com 5% de CO₂. O subcultivo foi realizado quando as células atingiram 70-80% de confluência, utilizando solução 0,25% de tripsina-EDTA (Gibco[®], Invitrogen[™], EUA).

4.3.2. Citotoxicidade de AuPLU/AICIPc em células 4T1-luc na ausência de irradiação

As células 4T1-luc foram semeadas a uma densidade de 1×10^4 células/poço em placas de 96 poços. Após 24 h de incubação, o meio de cultura foi substituído por 200 µL de meio fresco contendo AuPLU/AICIPc em concentrações de 0,16 a 5,06 µM de ouro coloidal (Au⁰) associadas com AICIPc na concentração de 5 µg/mL. A concentração de AICIPc foi selecionada com base no trabalho de Py-Daniel et al. (2016).

Amostras de AuPLU, PLU e AICIPc isolados foram testadas nas mesmas condições para investigar a origem do efeito observado na combinação. O controle negativo recebeu meio de cultivo com tampão fosfato-salino (PBS). Após 24 h de exposição, as células foram lavadas 2x com PBS, e o efeito citotóxico foi avaliado pela técnica de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2 H-tetrazólio). As células foram incubadas com solução de MTT (0,5 mg/mL, 150 µL/poço) por 2h, em seguida, a solução foi removida e 150 µL de DMSO foram adicionados para solubilizar os cristais de formazan. A redução do MTT a cristais de formazan, um produto colorimétrico, ocorre apenas em células metabolicamente ativas. Os valores de absorvância foram medidos usando um espectrofotômetro (Microplate Photometer, HiPo MPP-96) a 568 nm, e os dados dos tratamentos foram normalizados em relação ao controle negativo para calcular a porcentagem de viabilidade celular. O experimento foi realizado em triplicata técnica e biológica (n = 9/concentração).

Um FS ideal deve ser seguro na ausência de luz. Assim, para prosseguir com os ensaios subsequentes, foram selecionadas as concentrações de AuPLU/AICIPc que não apresentaram efeitos citotóxicos após 24 h de exposição.

4.3.3. Fotocitotoxicidade da TFD mediada por AuPLU/AICIPc em células 4T1-

luc e NIH-3T3

As células 4T1-luc e NIH-3T3 foram semeadas a uma densidade de 1×10^4 células/poço em placas de 96 poços. Após 24h de incubação, o meio de cultura foi substituído por 200 μL de meio fresco contendo AuPLU/AICIPc em concentrações de 0,16, 0,32 e 0,63 μM de Au^0 associadas com 5 $\mu\text{g/mL}$ de AICIPc. Amostras de AuPLU e AICIPc isoladas foram testadas nas mesmas condições para comparação, e o controle negativo recebeu meio de cultivo com PBS. Após 15, 30, 45 e 60 minutos de exposição, as células foram lavadas 2x com 100 μL de PBS.

Para realizar a TFD, as células foram irradiadas em 100 μL de PBS por um LED de 660 nm, com densidade de potência de $40,8 \text{ mW/cm}^2$ por 10 minutos, resultando em uma fluência de $24,48 \text{ J/cm}^2$, conforme descrito por Py-Daniel et al. (2016). Após a irradiação, o PBS foi removido e as condições de cultivo foram restabelecidas por 24h. O efeito fotocitotóxico foi determinado pelo ensaio de MTT, como descrito em 4.3.2.

4.3.4. Efeito de AuPLU/AICIPc na morfologia celular

O impacto de AuPLU/AICIPc na morfologia das células 4T1-luc, tanto em condições protegidas de luz, quanto sob irradiação, foi avaliado por microscopia de contraste de fase, utilizando o sistema EVOS FL (Thermo Fisher Scientific, EUA), com ampliações de $100\times$ e $400\times$.

4.3.5. Eficácia a longo prazo da TFD mediada por AuPLU/AICIPc: monitoramento da viabilidade celular em tempo real

Para avaliar a eficácia da TFD em células 4T1-luc, este estudo investigou a capacidade de sobrevivência e proliferação das células remanescentes após o tratamento, ao longo de um período prolongado de 72 h. Para isso, foi realizado um ensaio de viabilidade em tempo real utilizando o kit reagente RealTime-Glo™ MT (Cat.# G9711, Promega), conforme instruções do fabricante. O princípio da técnica baseia-se na adição de NanoLuc (luciferase) e do pró-substrato MT Cell Viability Substrate às células. Células metabolicamente ativas reduzem o pró-substrato para formar um substrato, que se difunde para o meio e reage com a NanoLuc, gerando um sinal luminescente proporcional ao número de células viáveis.

As células 4T1-luc foram semeadas a uma densidade de 1×10^4 células/poço em placas de 96 poços, brancas e de paredes opacas (Kasvi, modelo K12-096, Brasil). Após 24 h de incubação para aderência, as células foram incubadas por 15 minutos com AuPLU/AICIPc e submetidas à TFD, conforme descrito anteriormente (item 4.2.3). Imediatamente após o tratamento, a condição de cultivo foi restabelecida com adição de 100 μL de meio de cultivo completo adicionado a 100 μL da mistura de reagentes (996 μL de meio, 2 μL do substrato e 2 μL da enzima). A intensidade de luminescência (RLU) foi medida logo após a TFD, 24 h, 48 h e 72 h após a adição do reagente, utilizando um leitor de microplacas (Varioskan™ LUX, Thermo Scientific, EUA). A natureza não lítica do ensaio possibilitou a coleta de dados em intervalos temporais a partir do mesmo grupo celular. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão (DP) de determinações em triplicata de dois experimentos independentes ($n = 6$ /concentração). Durante o intervalo de tempo, as placas foram mantidas na incubadora à 37°C e 5% de CO₂ protegidas de luz.

4.3.6. Análise dos mecanismos antitumorais da TFD mediada por AuPLU/AICIPc em células 4T1-luc por citometria de fluxo

A produção de EROs e na integridade do DNA após a TFD mediada por AuPLU/AICIPc foram avaliados por citometria de fluxo. Para isso, as células 4T1-luc foram semeadas a uma densidade de 4×10^5 células/poço em placas de 6 poços (Kasvi). Após 24h de incubação para aderência, as células foram tratadas por 15 min com AuPLU/AICIPc em concentração de 0,63 μM de Au⁰ associada com 5 $\mu\text{g/mL}$ de AICIPc e, em seguida, submetidas à TFD, conforme descrito anteriormente (item 4.3.3).

Imediatamente após os tratamentos, o sobrenadante foi reservado e as células foram dissociadas com 800 μL de TrypLE Express (Gibco, USA) por 10 min a 37 °C. A inativação enzimática foi realizada adicionando 700 μL do sobrenadante previamente coletado. A suspensão celular foi submetida a ciclos de lavagem por centrifugação a 2000 rpm por 5 min a 4°C (centrífuga Excelsa Baby, Fanem, BRA). Após as lavagens, os *pellets* celulares foram ressuspensos em tampão adequado para incubação com os marcadores específicos.

As medições foram realizadas imediatamente utilizando o citômetro de fluxo Accuri™ C6 (Becton Dickinson, EUA). As dispersões frontais (FSC) e lateral (SSC) das amostras foram medidas simultaneamente, e os debris celulares foram excluídos. Para cada amostra, pelo menos 10.000 eventos foram analisados. Os dados foram processados utilizando o software FlowJo® vX 0.7.

4.3.6.1. *Análise do estresse oxidativo*

O nível de EROs intracelular, importante indicador da eficiência da TFD, foi determinado utilizando a sonda CellROX™ Green (C10444 - Invitrogen, USA). Esta sonda, permeável à célula, apresenta fluorescência fraca no estado reduzido e emite fluorescência fotoestável e verde intensa após ser oxidada e se ligar ao DNA, com máximos de absorção/emissão de 485/520 nm. As células foram ressuspensas em 100 µL de PBS e incubadas com 200 µL de solução de CellROX Green® (5 µM) por 30 min à 37 °C, protegidas da luz. Após a incubação, as células foram lavadas 3x e imediatamente analisadas.

4.3.6.2. *Análise de fragmentação do DNA*

Para avaliar a possível fragmentação do material genético, foi utilizado iodeto de propídio (IP) (P1304MP – Invitrogen, USA). O IP é um agente intercalante de DNA que emite fluorescência vermelha quando excitado a 488 nm. Quando o DNA das células está fragmentado, a fluorescência é detectada como picos menores ou mais dispersos.

As células foram fixadas em etanol 70% a -20 °C por, no mínimo, 24 h. Após centrifugação, o sobrenadante foi removido e as células foram incubadas com 100 µL de solução de RNase (50 µg/mL) por 30 min a 37 °C, protegidas da luz. Após esse período, foi adicionada solução de iodeto de propídeo (20 µg/mL) em tampão de lise 100 µL, e as células foram mantidas à temperatura ambiente, protegidas da luz, por mais 30 min. Como controle positivo, as células foram tratadas com peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 20 mM por 2 h antes do procedimento de fixação. As amostras foram, então, analisadas imediatamente.

4.3.7. **Análise da integridade da membrana celular**

Imediatamente após os tratamentos (descrito em 4.3.3.), a integridade da membrana plasmática foi avaliada pelo método de exclusão por azul de tripan. O azul de tripan é um corante vital que penetra seletivamente em células com membranas danificadas, marcando-as de azul. Uma alíquota de 10 µL da suspensão celular foi acrescida a 90 µL do corante azul de tripan. A contagem de células com membranas danificadas (mortas ou em processo de morte) foi realizada utilizando um contador automático Countess 3 (Invitrogen, USA). Os

ensaios foram realizados em dois experimentos independentes, com triplicatas técnicas (n = 6).

4.4. Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas no software GraphPad Prism 10.6.1 (GraphPad Software, EUA). A normalidade dos dados foi verificada pelo teste de Shapiro–Wilk. A partir desse resultado, foram selecionados testes estatísticos adequados para a comparação entre os grupos experimentais, conforme as premissas atendidas. Os dados foram expressos como média \pm desvio-padrão, e diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Caracterização do nanocompósito

A **Tabela 1** apresenta os valores de DH, PDI e o PZ do nanocompósito AuPLU/AICIPc disperso em água ultrapura e em meio de cultura RPMI 1640 suplementado com SFB. O nanocompósito AuPLU apresentou DH médio de $154,31 \pm 71,96$ nm em água e de $31,83 \pm 13,01$ nm no meio de cultura. Tendência semelhante foi verificada para o AuPLU/AICIPc, cujo DH médio foi de $200,40 \pm 70,27$ nm em água e de $90,29 \pm 36,73$ nm no meio de cultura. Em conjunto, esses resultados indicam uma redução do DH quando as amostras são avaliadas em um ambiente biologicamente mais relevante. AuPLU/AICIPc apresentou maior DH do que AuPLU, o que pode ser justificado pela própria conjugação do FS ao nanocompósito.

A mesma tendência foi relatada Simelane et al. (2023) que observou um aumento de DH de 18,71 nm para 24,83 nm após conjugação de AICIPc com nanopartículas bimetálicas de cobre-ouro PEGiladas. Esse comportamento é consistente com a conhecida propensão das ftalocianinas à agregação, frequentemente mediada por empilhamento π - π , o que pode contribuir para o aumento do tamanho aparente quando esses FS são associados a nanopartículas (J. Wang et al., 2025).

Tabela 1. Diâmetro hidrodinâmico (DH), índice de polidispersão (PDI) e potencial zeta (PZ) do nanocompósito de ouro-Pluronic associado ao cloreto de alumínio ftalocianina (AuPLU/AICIPc).

Amostra	DH (nm)	PDI	PZ (mV)
AuPLU (água ultrapura)	$154,31 \pm 71,96$	$0,37 \pm 0,20$	$-7,94 \pm 3,67$
AuPLU (meio cultura suplementado)	$31,83 \pm 13,01$	$0,62 \pm 0,17$	$-10,57 \pm 6,42$
AuPLU/AICIPc (água ultrapura)	$200,4 \pm 70,27$	$0,49 \pm 0,09$	$-19,80 \pm 13,29$
AuPLU/AICIPc (meio cultura suplementado)	$90,29 \pm 36,73$	$0,52 \pm 0,04$	$-12,64 \pm 10,05$

Os resultados apresentados correspondem à média obtida a partir de duas medições independentes \pm desvio padrão (n = 4).

O DH das nanopartículas é um parâmetro dependente de diversos fatores, incluindo o método de síntese, a composição, o revestimento e as condições experimentais, o que

dificulta comparações diretas entre os estudos (Abram et al., 2025). Diante disso, o DH do AuPLU encontra-se dentro da faixa para aplicações biológicas, uma vez que nanopartículas >10 nm a 500 nm, tendem a apresentar maior tempo de circulação e podem se acumular preferencialmente em tecido tumoral por meio da vasculatura mais permeável, sendo posteriormente retidas devido à drenagem linfática reduzida, fenômeno conhecido com efeito de permeação e retenção aumentados (Huang et al., 2021).

Além disso, a redução no DH observada no meio de cultura, em comparação à água, está alinhada com fenômenos descritos para sistemas nanoestruturados em ambientes biológicos. O meio RPMI 1640, suplementado com soro, contém proteínas, aminoácidos e sais que podem interagir com a superfície do nanocompósito, reduzindo a tendência à agregação e promovendo uma dispersão coloidal mais estável. Esse processo, conhecido como formação da corona proteica, é amplamente documentado como um modulador chave das propriedades coloidais de nanopartículas, uma vez que reduz a energia superficial, estabiliza a dispersão e pode resultar em DH aparentes menores e mais homogêneos quando comparados a sistemas agregados em meio aquoso (Hajipour et al., 2023; Lundqvist et al., 2008; Monopoli et al., 2012; Park, 2020).

Diversos estudos (Awashra & Młynarz, 2023; Fröhlich, 2012; Møller & Lykkesfeldt, 2014; X. Shao et al., 2015) indicam que a carga superficial é um determinante importante na interação da nanopartícula com as células e conseqüentemente para citotoxicidade. De modo geral, nanopartículas catiônicas tendem a ser mais tóxicas do que nanopartículas aniônicas e neutras, porque a membrana celular externamente apresenta carga negativa devido, sobretudo, a cabeça aniônica dos fosfolipídios, o que favorece atração eletrostática, maior adsorção à membrana e maior captação celular. Esse aumento de interação pode intensificar danos de membrana e desencadear eventos como estresse oxidativo, disfunção mitocondrial e alterações de integridade lisossomal, elevando a probabilidade de efeitos citotóxicos (Awashra & Młynarz, 2023; X. Shao et al., 2015). Nesse contexto, o AuPLU/AIClPc que apresentou PZ $-19,80 \pm 13,29$ mV em água e $-12,64 \pm 10,05$ mV em meio de cultura suplementado, enquadrando-se em um perfil levemente aniônico, considerado mais biocompatível.

O PDI, no presente estudo, variou entre $0,37 \pm 0,20$ e $0,62 \pm 0,17$. Esse resultado indica que a suspensão apresenta polidispersidade moderada a alta, sugerindo a coexistência de diferentes populações de tamanho e/ou a presença de uma fração de agregados (Danaei et al., 2018). Ainda assim, esse achado não implica, por si só, inviabilidade para uso biológico, especialmente em meios complexos, nos quais interações com biomoléculas,

formação de corona proteica e associações transitórias podem ampliar a distribuição de tamanhos (Hajipour et al., 2023).

A estabilidade coloidal das formulações foi monitorada ao longo de 21 dias de armazenamento sob refrigeração **Figura 2**. Em cada tempo experimental, a conjugação entre AuPLU e AICIPc foi realizada imediatamente antes das medições, de modo que os parâmetros DH, PDI e PZ refletem o comportamento coloidal das formulações após a associação entre os componentes no momento da análise. De maneira geral, observou-se que os valores de DH apresentaram variações ao longo do tempo, porém sem indicar aumento progressivo que sugerisse instabilidade coloidal das nanopartículas armazenadas. Em água ultrapura, as variações de DH foram mais pronunciadas, especialmente para o sistema AuPLU/AICIPc, enquanto em meio de cultura suplementado os valores tenderam a permanecer menores e com menor amplitude de variação ao longo do período experimental, possivelmente em decorrência da interação dos nanocompósitos com biomoléculas presentes no meio.

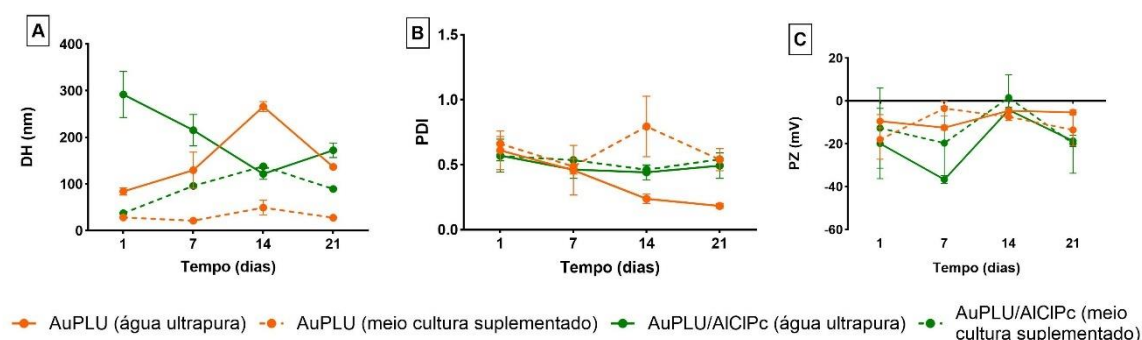


Figura 2. Avaliação da estabilidade coloidal das formulações AuPLU e AuPLU/AICIPc ao longo de 21 dias de armazenamento, a partir do primeiro ponto experimental de análise (tempo 1). Os gráficos representam: (A) diâmetro hidrodinâmico médio (DH), (B) índice de polidispersão (PDI) e (C) potencial zeta (PZ), determinados por espalhamento dinâmico de luz (DLS). Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão (quatro medidas independentes em quintuplicata cada). A significância estatística foi determinada por Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn ($p < 0,05$). Não foram observadas diferenças significativas nos parâmetros avaliados ao longo do tempo para cada formulação, dentro de uma mesma condição experimental.

De forma semelhante, o PDI apresentou oscilações moderadas entre os diferentes tempos de análise, sem evidenciar tendência consistente de aumento da heterogeneidade da suspensão. Em relação ao potencial zeta, ambas as formulações mantiveram valores predominantemente negativos ao longo do período avaliado, indicando manutenção de uma carga superficial aniônica. Em conjunto, a análise dos parâmetros DH, PDI e PZ sugere que

as nanopartículas AuPLU mantiveram características coloidais relativamente estáveis durante o armazenamento, e que a associação com AICIPc realizada no momento da análise não promoveu alterações que indiquem comprometimento da dispersão coloidal sob as condições experimentais avaliadas.

Considerando o conjunto dos parâmetros físico-químicos avaliados, o AuPLU demonstrou características adequadas e compatíveis com aplicações biológicas, justificando sua investigação nos ensaios subsequentes.

5.2. Caracterização fotoquímica de AuPLU/AICIPc

A capacidade de geração de EROs pelo nanocompósito na presença do FS, quando irradiado com LED a 660 nm, foi avaliada pelo método de degradação do DPBF. A escolha por LEDs de alta potência para a TFD representa um avanço importante, pois essa tecnologia tem se mostrado uma alternativa eficiente ao uso de lasers. Além de reduzir custos, os LEDs permitem irradiar áreas maiores em menor tempo, mantendo um perfil de segurança favorável e compatível com aplicações clínicas (Guo et al., 2024).

Os resultados obtidos estão apresentados na **Figura 3**. Observou-se que a amostra de AuPLU/AICIPc gerou uma redução acentuada da absorvância do DPBF, de aproximadamente 50%, nos três primeiros ciclos de irradiação (1,2 J/cm²), confirmando a produção de ¹O₂. Após o 3º ciclo de irradiação, a absorvância atingiu um platô, comportamento consistente com a limitação do processo fotodinâmico, sugerindo que o DPBF remanescente no meio atingiu um limite de degradação sob as condições experimentais empregadas, possivelmente em função do consumo do substrato reativo. Além disso, como o experimento foi conduzido com irradiação contínua, a disponibilidade de oxigênio dissolvido pode ter se tornado um fator crítico: a TFD do tipo II depende diretamente de O₂ e, ao mesmo tempo, o consome durante a fotoreação, de modo que a taxa de reposição de oxigênio pode não acompanhar a taxa de consumo, levando a depleção local e redução progressiva da geração de ¹O₂ (Alonso-Mtz de Salinas et al., 2025; Kim & Hong, 2025).

Em contraste, a amostra contendo AICIPc livre não apresentou fotoatividade significativa, mantendo cerca de 80% da absorvância inicial do DPBF após o processo de irradiação (4 J/cm²). A baixa produção de ¹O₂ observada para a AICIPc livre pode estar relacionada à sua tendência à agregação em meio aquoso, decorrente do caráter hidrofóbico

da molécula, o que compromete sua atividade fotodinâmica quando não associado a sistemas micelares e outros sistemas nanoparticulados (Borzęcka et al., 2021; Bunin et al., 2023).

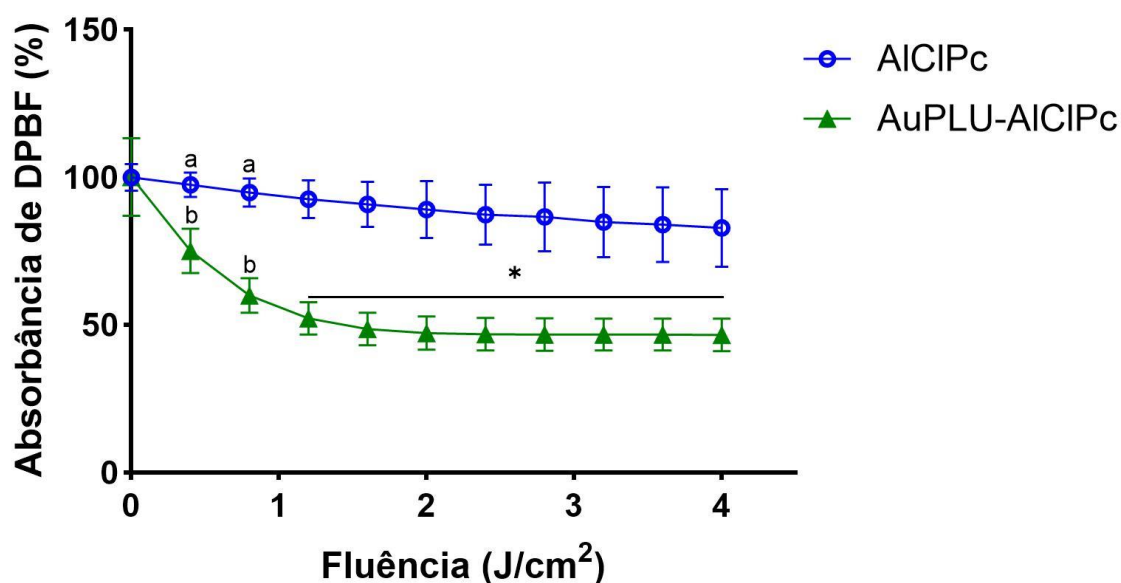


Figura 3. Absorbância do 1,3-difenil-isobenzofurano (DPBF) após exposição às amostras de AuPLU/AICIPc ou AICIPc livre a 5 µg/ml, sob irradiação com luz LED. * Diferença estatisticamente significativa do grupo AuPLU/AICIPc em relação ao tempo inicial (sem irradiação; fluência 0). Os dados foram apresentados como média ± desvio padrão de três ensaios independentes realizados em triplicata técnica (n= 9). A significância estatística foi determinada por teste de Friedman e pós-teste de Dunn ($p < 0,05$). ^{a,b} Diferença estatisticamente significativa entre os grupos AICIPc e AuPLU/AICIPc.

Esse comportamento está em concordância com achados prévios. Py-Daniel et al. (2016) demonstraram que micelas de Pluronic F127 associadas ao AICIPc aumentam significativamente a eficácia da TFD. De forma complementar, estudos recentes (Mfouo-Tynga et al., 2018; Mfouo-Tynga et al., 2018; Saw et al., 2022; Thakur et al., 2019) indicaram que a integração de ftalocianinas a AuNPs potencializa a geração de EROs. Simelane et al. (2023) mostraram que a conjugação da AICIPc a nanopartículas bimetálicas de ouro-cobre revestidas com PEG (PEG-CuAuNPs) resultou em um aumento expressivo da produção de EROs após irradiação, quando comparado ao FS livre.

Em conjunto, esses resultados indicam que o AuPLU/AICIPc constitui uma estratégia eficaz para a potencialização da TFD, configurando-se como uma plataforma promissora para aplicações fototerapêuticas e motivando a continuidade das investigações em sistemas biológicos, incluindo a avaliação da eficácia para tratamento de células tumorais.

5.3. Estabilidade da estrutura do nanocompósito de AuPLU após diluições seriadas

Considerando a necessidade de diluição da formulação AuPLU para a realização dos ensaios *in vitro*, tornou-se necessário verificar a estabilidade da estrutura do nanocompósito em concentrações reduzidas, uma vez que eventuais alterações estruturais poderiam comprometer seu desempenho biológico e fotoquímico. Para isso, procedeu-se a análise de AuPLU em diferentes concentrações por espectroscopia UV-vis.

A **Figura 4** apresenta os espectros obtidos. Em todas as amostras foi identificada a banda LSPR entre 520 e 580 nm, faixa característica para AuNPs (Anselmo et al., 2022; Gomes et al., 2023). A preservação dessa banda após diluições extensivas indica a manutenção da organização micelar e estabilidade coloidal do AuPLU. Nas formulações contendo AICIPc, observou-se ainda a presença de um pico adicional em, aproximadamente, 680 nm, atribuído à banda Q da ftalocianina (Tedesco et al., 2003).

Esse achado reforça que a diluição de AuPLU e a associação ao FS não compromete sua integridade estrutural ou fotoquímica, assegurando a funcionalidade de ambos os componentes para os ensaios subsequentes. Py-Daniel et al. (2016) relataram que AICIPc incorporado em micelas de pluronic F127 acima da concentração micelar crítica, formam micelas com duas partes: (i) núcleo hidrofóbico; (ii) coroa hidrofílica. O FS tende a se alojar no núcleo, com isso, gerando fluorescência sem efeito de supressão. Diante disso, os resultados confirmam a conjugação de AICIPc em AuPLU, justificando assim, a continuidade dos experimentos com ensaios *in vitro*.

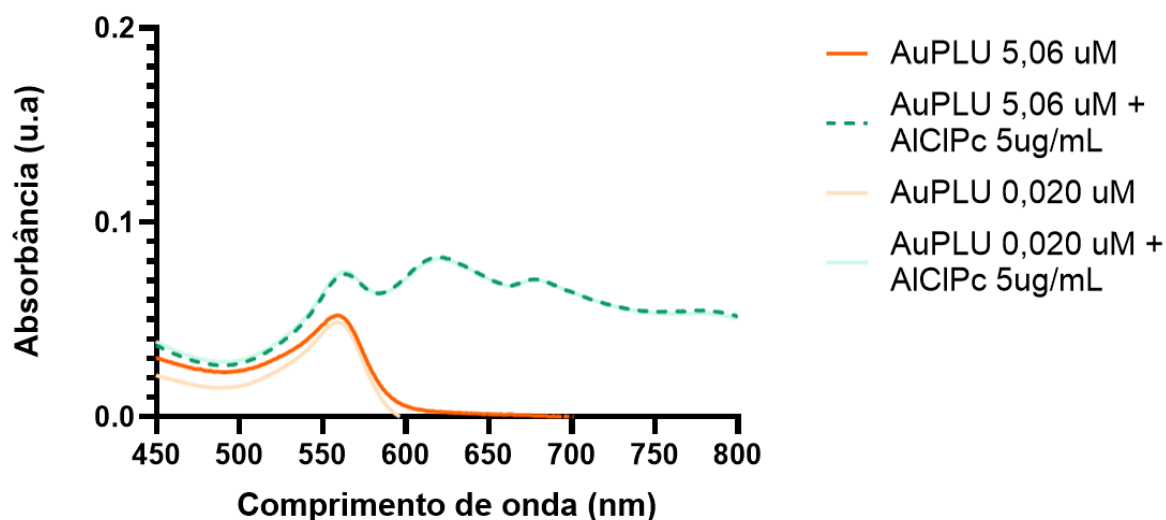


Figura 4. Espectroscopia UV-vis do nanocompósito AuPLU em diferentes concentrações associado e não-associado a AICIPc a 5 $\mu\text{g/mL}$.

5.4. Avaliação da citotoxicidade de AuPLU/AICIPc na ausência de irradiação em células 4T1-luc

A avaliação da citotoxicidade de AuPLU/AICIPc foi conduzida por meio do ensaio de MTT em células 4T1-luc tratadas por 24 h na ausência de irradiação. Essa etapa teve como objetivo identificar concentrações não tóxicas para aplicação nos ensaios subsequentes de TFD, visto que um FS ideal deve exibir baixa toxicidade no escuro (Horne & Cronjé, 2017).

Conforme apresentado na **Figura 5**, combinação de AuPLU e AICIPc potencializou o efeito citotóxico basal de AICIPc em células 4T1-luc, que na forma livre reduziu cerca de 30% da viabilidade na ausência de irradiação (**Figura 5C**), enquanto em combinação com AuPLU nas concentrações de 1,26, 2,53 e 5,06 μM de Au reduziram significativamente a viabilidade de 4T1-luc a 62,58%, 61,13% e 49,71%, respectivamente (**Figura 5A**). Já AuPLU e PLU isolados não promoveram redução significativa da viabilidade em comparação ao controle negativo (**Figura 5B e 4D**).

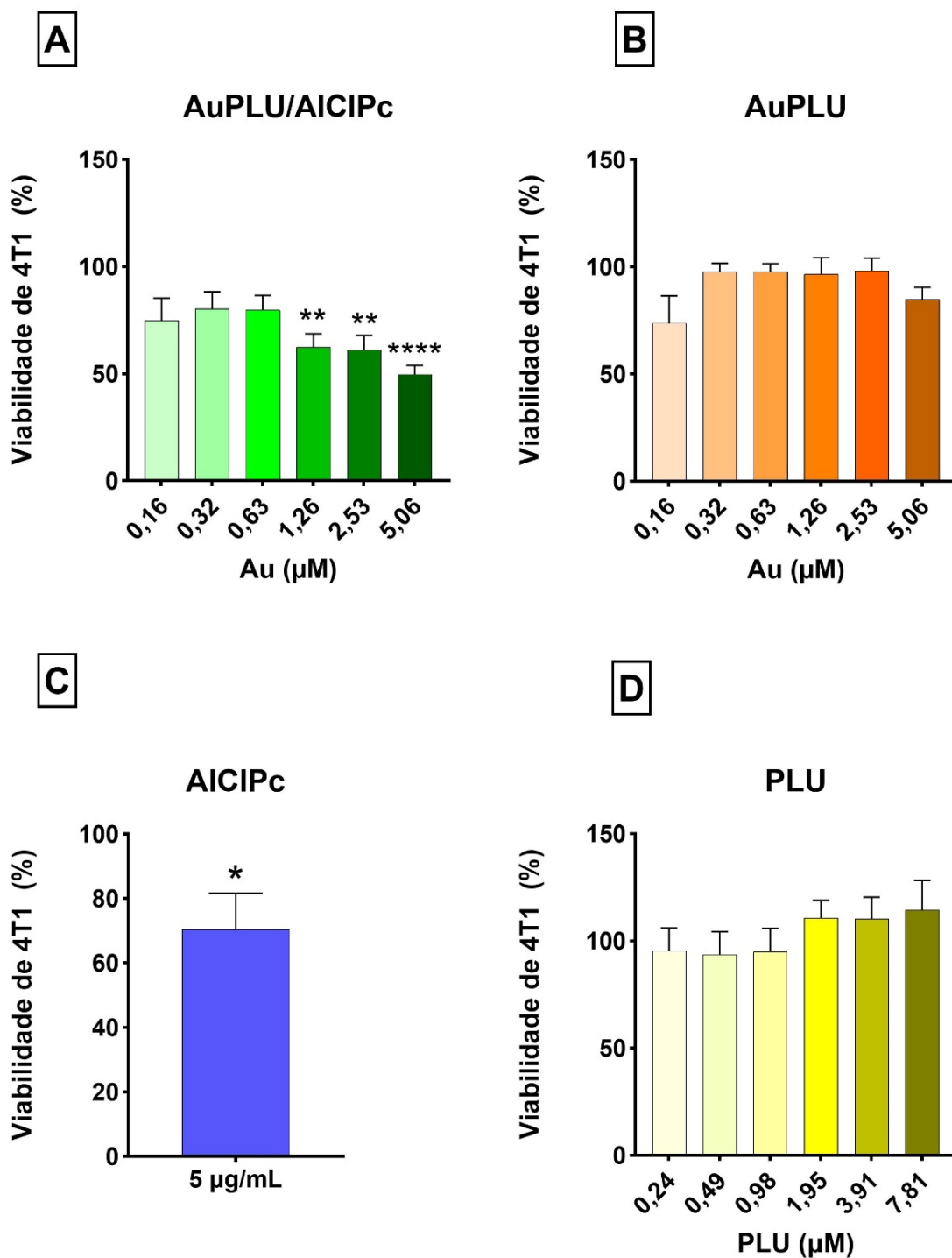


Figura 5. Efeito de AuPLU/AICIPc na viabilidade de células 4T1, na ausência de irradiação, determinado pelo ensaio de MTT. As células 4T1 foram incubadas, por 24 h, com AuPLU em concentrações variando de 0,16 a 5,06 μM de Au, associado ao AICIPc na concentração fixa de 5 $\mu\text{g/mL}$. Os componentes isolados (AuPLU, AICIPc e PLU) foram avaliados de forma equivalente. Os dados foram apresentados como média \pm desvio padrão de três ensaios independentes realizados em triplicata técnica ($n=9$). A significância estatística foi determinada por Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn ($p < 0,05$). Os asteriscos indicam diferenças significativas em relação ao controle negativo: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$.

Esse comportamento pode estar relacionado à elevada taxa de internalização de FS de terceira geração por células tumorais. Em geral, tumores, especialmente os mais proliferativos, reprogramam o tráfego de membrana e as vias endocíticas para sustentar o crescimento e atender às demandas metabólicas aumentadas. Nesse cenário, FS de terceira geração, exploram receptores superexpressos na superfície tumoral e favorecem a entrada celular por endocitose mediada por receptor (Evergren et al., 2024; B. Wang et al., 2024).

Adicionalmente, células tumorais apresentam maior susceptibilidade ao estresse oxidativo induzido por nanomateriais, o que pode potencializar efeitos citotóxicos mesmo na ausência de irradiação luminosa, particularmente quando FS estão associados a sistemas nanoestruturados (Lin et al., 2023). Ressalta-se ainda que diferentes linhagens celulares podem responder de maneira distinta a esses sistemas (Khandker et al., 2020). Nesse contexto, Py-Daniel et al. (2016) demonstraram que o AICIPc associado a micelas de Pluronic F127, na concentração de 5 µg/mL, não induz citotoxicidade em células de adenocarcinoma pulmonar humano (A549) sob condições de proteção à luz, evidenciando que a resposta biológica ao sistema depende fortemente do tipo celular avaliado e das condições experimentais.

Na literatura, trabalhos com AuNPs e ftalocianinas de zinco apresentaram ausência de toxicidade no escuro em linhagens de câncer de mama (MCF-7, SK-BR-3, MDA-MB-231) e não cancerosa (MCF-10) em ensaios de MTT e WST-1 em 24 h de tratamento (Dube et al., 2019; García Calavia et al., 2018).

O efeito do nanocompósito AuPLU/AICIPc, na concentração de 0,63 µM de Au, bem como de seus componentes isolados, sobre a morfologia das células 4T1-luc foi avaliado por microscopia de contraste de fase. As micrografias correspondentes estão apresentadas na **Figura 6**. Os grupos AuPLU e AuPLU/AICIPc exibiram morfologia globalmente preservada, sem evidências de citotoxicidade acentuada, embora no grupo AuPLU tenham sido observadas algumas células arredondadas, compatíveis com estresse celular pontual ou células em mitose. Em contraste, as células tratadas com AICIPc livre apresentaram alterações morfológicas sugestivas de citotoxicidade, caracterizadas por aumento de células desaderidas e maior presença de detritos celulares, indicando perda de adesão e possível comprometimento da integridade celular em relação ao controle negativo.

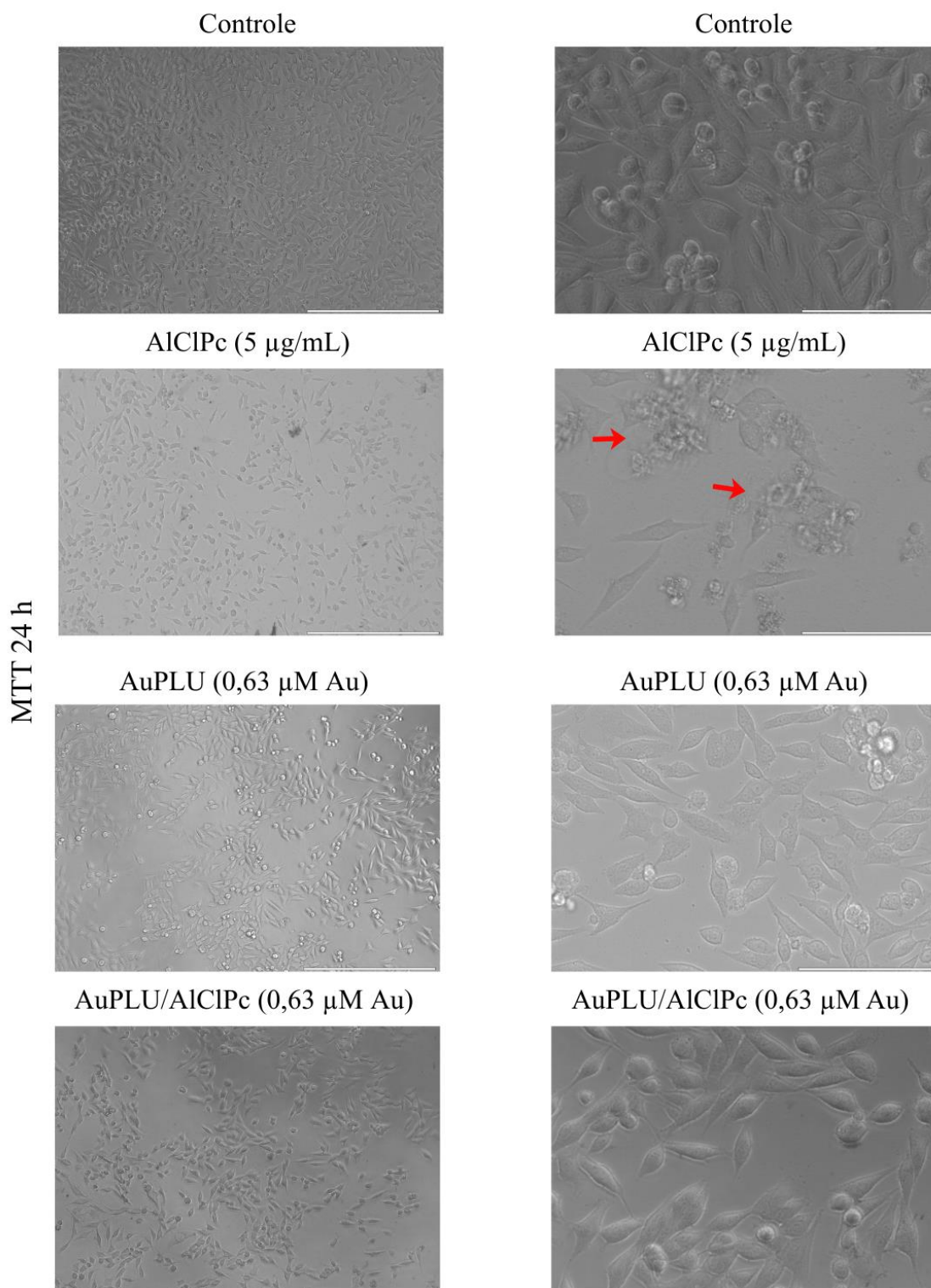


Figura 6. Morfologia de células 4T1-luc após 24 h de exposição aos tratamentos avaliados no ensaio de MTT, incluindo AuPLU, AICIPc livre e o conjugado AuPLU/AICIPc, nas concentrações de 0,63 μM (Au) e 5 $\mu\text{g/mL}$ (AICIPc). Barras de escala: 400 μm (direita) e 200 μm (esquerda). Detritos celulares estão indicados em vermelho.

Neste estudo, não foi realizada a avaliação da citotoxicidade de AuPLU/AICIPc em células não tumorais após 24 h de exposição contínua em condições de escuro. Essa decisão metodológica considera as limitações inerentes aos modelos *in vitro* 2D, nos quais as células são expostas de forma direta e homogênea ao nanossistema, sem a presença de barreiras fisiológicas que, em sistemas biológicos mais complexos, modulam a cinética de internalização e a exposição diferencial entre tecidos saudáveis e tumorais. Em condições de exposição prolongada em modelos 2D, o tempo disponível é suficiente para que o nanossistema seja internalizado independentemente do tipo celular, reduzindo a influência de características intrínsecas das diferentes linhagens e limitando a capacidade do ensaio em fornecer informações relevantes sobre segurança diferencial ou seletividade celular. Assim, ensaios de longa duração tendem a refletir predominantemente a toxicidade intrínseca do sistema, em vez de diferenças associadas a propriedades celulares específicas.

A partir dos resultados de citotoxicidade no escuro, foram selecionadas as três menores concentrações de AuPLU (0,16, 0,32 e 0,63 μM de Au) associadas ao AICIPc, consideradas não tóxicas para a linhagem 4T1-luc, para a avaliação da resposta fotodinâmica do sistema AuPLU/AICIPc.

5.5. Resposta fotodinâmica do sistema AuPLU/AICIPc em células NIH-3T3 e 4T1-luc

Nessa etapa, investigou-se a influência do tempo de incubação do nanossistema e de seus componentes isolados sobre a viabilidade de células 4T1-luc e NIH-3T3, bem como se o perfil de segurança observado na ausência de irradiação se traduziria em seletividade celular sob ativação luminosa. Diferentemente de uma exposição prolongada, a avaliação em tempos curtos de incubação (15, 30, 45 e 60 min) permite considerar, ainda que de forma limitada, aspectos relacionados às características celulares, como dinâmica de membrana, metabolismo e vias iniciais de internalização, fornecendo informações mais apropriadas para a investigação preliminar de seletividade em modelos simplificados (Faber & Lamprecht, 2025; Richards et al., 2025).

Como esperado, nas condições de tratamento de 4T1-luc no escuro por 15 min (**Figura 7A**), os resultados foram similares aos observados com 24 h de incubação, com valores médios mínimos de viabilidade de aproximadamente 74%, 88% e 75% para AuPLU/AICIPc, AuPLU e AICIPc, respectivamente. Por outro lado, a irradiação luminosa promoveu uma redução acentuada da viabilidade tanto para o AICIPc livre quanto para

AuPLU/AICIPc, já no menor tempo de incubação avaliado (15 min). Nessa condição, a viabilidade celular foi reduzida para aproximadamente 7% no tratamento com AICIPc livre e para valores entre 2-3% nas diferentes concentrações de AuPLU/AICIPc, não sendo observadas diferenças estatisticamente significativas entre esses tratamentos. Esses resultados indicam que, em curtos tempos de incubação, ambos os sistemas são igualmente eficientes na indução de citotoxicidade fotodinâmica em células 4T1.

Esse contraste entre moderada toxicidade no escuro e intensa fototoxicidade oferece uma separação clara entre condições seguras e altamente citotóxicas, aspecto ideal para a aplicação da TFD.

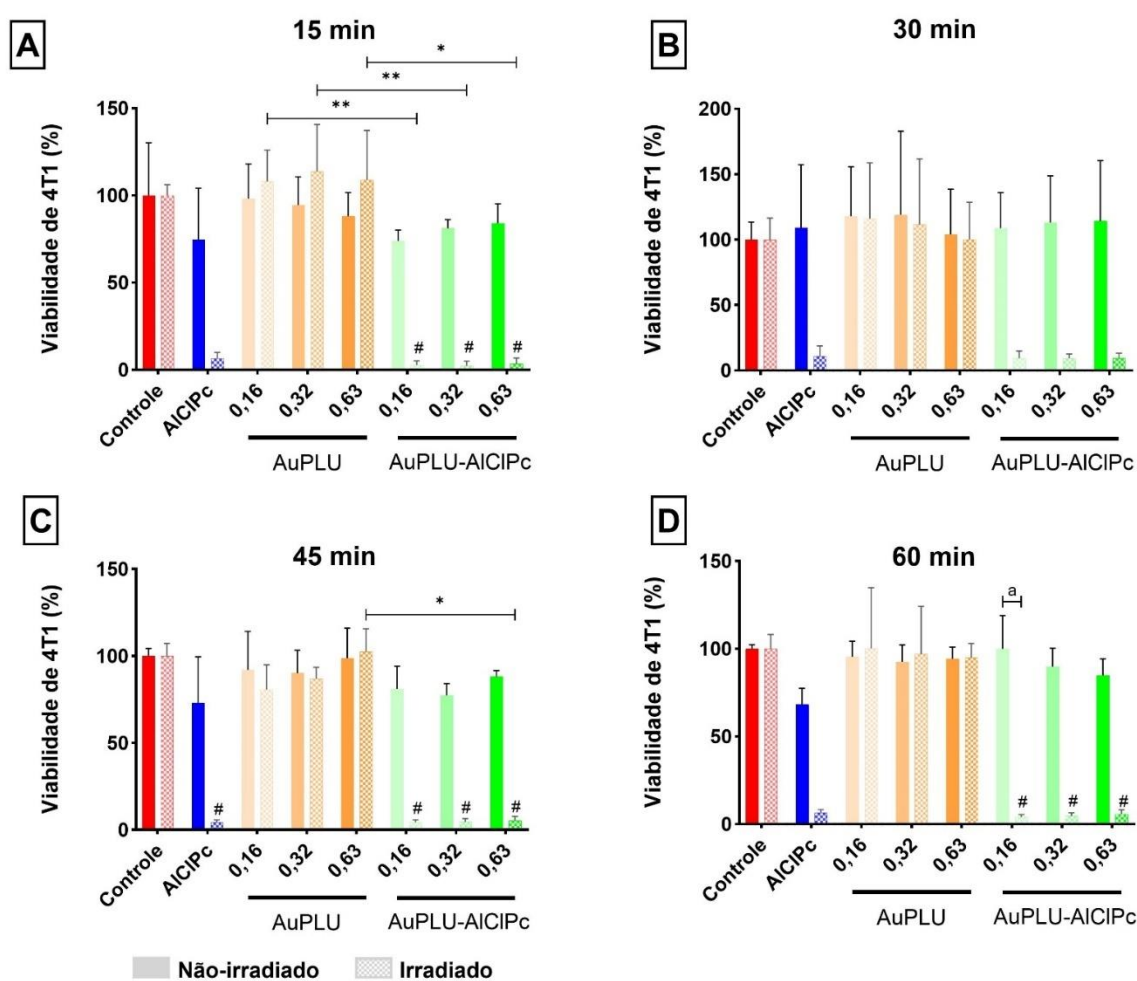


Figura 7. Terapia fotodinâmica em células tumorais 4T1. Viabilidade de células tumorais 4T1 após tratamento com AICIPc livre, AuPLU e AuPLU/AICIPc, em condições de escuro e após irradiação luminosa, avaliada pelo ensaio de MTT. As células foram tratadas por diferentes tempos (15, 30, 45 e 60 min) antes da irradiação. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão de três ensaios independentes realizados em triplicata técnica ($n = 9$). Diferenças estatisticamente significativas foram determinadas por Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn ($p < 0,05$). Hashtags (#) indicam diferenças significativas em relação ao

controle irradiado; Asteriscos (*) indicam diferenças significativas entre os grupos AuPLU e AuPLU/AICIPc tratados com a mesma concentração; Letra (a) indica diferença significativa entre AuPLU/AICIPc não-irradiado e irradiado.

A avaliação de tempos de tratamento superiores (30, 45 e 60 min) não resultou em aumento adicional significativo da eficácia fotodinâmica, uma vez que a viabilidade celular após irradiação permaneceu igualmente baixa para AICIPc e AuPLU/AICIPc em todas as concentrações testadas (Erro! Fonte de referência não encontrada. **B**, **6C**, **6D**). Esse comportamento sugere que 15 min de incubação são suficientes para que o FS, livre ou associado ao nanocompósito, atinja níveis intracelulares adequados para exercer seu efeito fotodinâmico máximo em células 4T1-luc. Tal resultado pode estar relacionado à rápida internalização do FS e/ou à elevada susceptibilidade dessas células ao estresse oxidativo induzido pela geração de EROs, como apresentado adiante. Rodrigues et al. (2022), relataram sinais compatíveis com morte celular imunogênica após TFD com 15 min de incubação em linhagens celulares tumorais (CT26 e 4T1) tratadas com ftalocianina de alumínio em nanoemulsão. Por esses motivos, os ensaios subsequentes foram conduzidos utilizando apenas 15 min de exposição aos tratamentos.

O efeito da TFD, no tempo de irradiação de 15 min, sobre a morfologia das células 4T1-luc foi avaliado imediatamente após o procedimento por microscopia de contraste de fase. Para essa análise, foram considerados o nanocompósito AuPLU/AICIPc, na concentração de 0,63 μM de Au, bem como de seus componentes isolados. As micrografias correspondentes estão apresentadas na **Figura 8**. De modo geral, todos os grupos exibiram morfologia semelhante logo após a irradiação, com células mais arredondadas e desaderidas, sugerindo um estresse agudo induzido pelo procedimento. Entretanto, conforme observado previamente no ensaio de MTT após 24 h, a citotoxicidade foi expressiva apenas nos grupos contendo AICIPc, indicando que as alterações morfológicas imediatas não refletem, necessariamente, a perda de viabilidade celular e que o efeito fotodinâmico se manifesta de forma mais evidente ao longo do tempo.

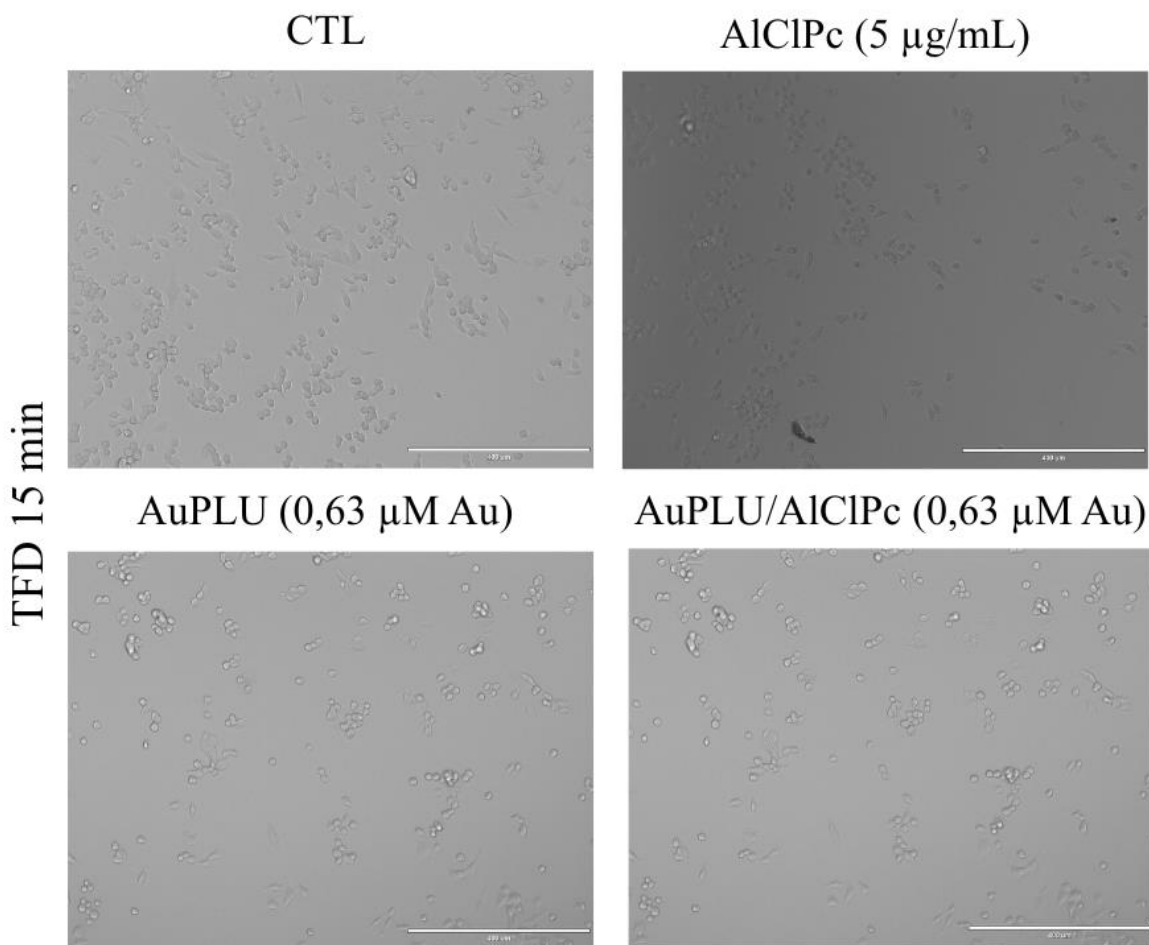


Figura 8. Morfologia celular de 4T1-luc após 15 min de incubação e terapia fotodinâmica (TFD), para os grupos AuPLU, AlClPc livre e AuPLU/AlClPc, nas concentrações de 0,63 µM (Au) e 5 µg/mL (AlClPc). Barras de escala: 200 µm.

Considerando que os fibroblastos representam um dos tipos celulares mais abundantes do organismo e estão presentes na região peritumoral em contextos clínicos reais (X. Li et al., 2024), a avaliação da citotoxicidade em células NIH-3T3 é sugestiva da seletividade e segurança biológica do nanossistema AuPLU/AlClPc. Nesse contexto, observou-se que o AlClPc livre, na concentração de 5 µg/mL, promoveu uma redução de aproximadamente 24% da viabilidade de células NIH-3T3, mesmo na ausência de irradiação luminosa, indicando um efeito citotóxico basal do FS (**Figura 9**), como observado para 4T1. Esse comportamento, já descrito para ftalocianinas hidrofóbicas, pode estar associado à interação direta do FS livre com membranas celulares e organelas, promovendo desorganização estrutural, geração de EROs ou disfunção mitocondrial independentemente da ativação luminosa (Dudzik et al., 2024).

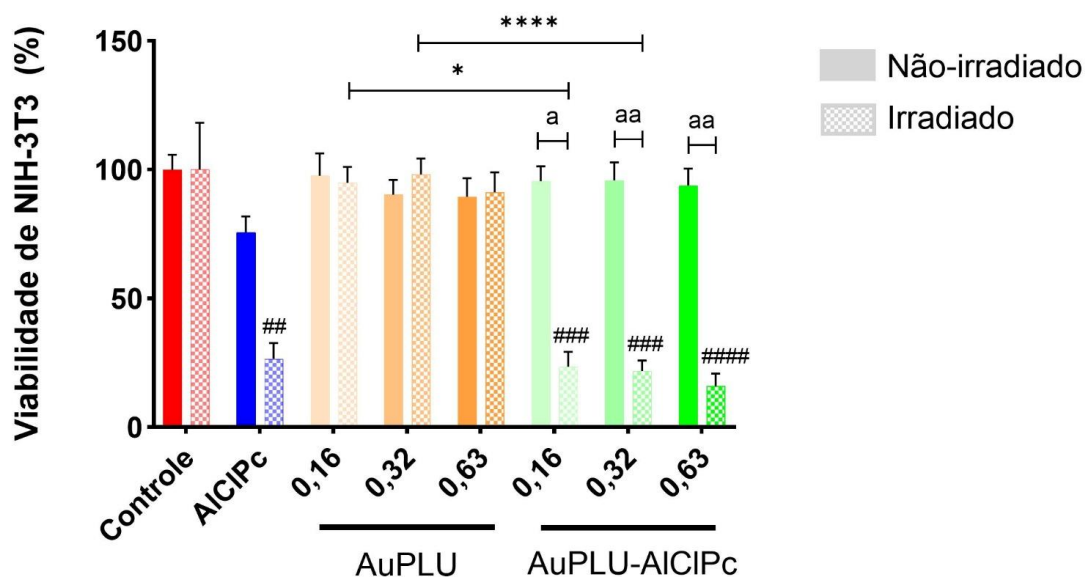


Figura 9. Resposta fotodinâmica em células não tumorais NIH-3T3. Viabilidade de células NIH-3T3 após terapia fotodinâmica com AICIPc livre, AuPLU, PLU e o sistema AuPLU/AICIPc, determinada pelo ensaio de MTT. O sistema AuPLU/AICIPc e o AuPLU foram avaliados nas concentrações de 0,16, 0,32 e 0,63 μM de Au, o PLU nas concentrações de 0,24, 0,49 e 0,98 μM , e o AICIPc livre na concentração de 5 $\mu\text{g/mL}$. As barras representam a viabilidade celular após irradiação luminosa. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão de três ensaios independentes realizados em triplicata técnica ($n = 9$). Diferenças estatisticamente significativas foram determinadas por Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn ($p < 0,05$). Hashtags (#) indicam diferenças significativas em relação ao controle irradiado; Asteriscos (*) indicam diferenças significativas entre os grupos AuPLU e AuPLU/AICIPc tratados com a mesma concentração; Letra (a) indica diferença significativa entre AuPLU/AICIPc não-irradiado e irradiado. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

Em contraste, o sistema AuPLU/AICIPc não apresentou citotoxicidade relevante para células NIH-3T3 após 15 min de exposição, mantendo viabilidade superior a 90% em todas as concentrações avaliadas. De forma semelhante, os componentes isolados, AuPLU e PLU, também não induziram redução significativa da viabilidade celular em comparação ao controle negativo, com valores superiores a 89% e 92%, respectivamente (**Figura 9**).

Estes resultados evidenciam a biocompatibilidade da plataforma e sugerem que a associação de AICIPc ao nanocompósito modula sua interação com as células, reduzindo efeitos indesejados na ausência de ativação luminosa. Nanossistemas poliméricos são amplamente descritos como capazes de associar FS hidrofóbicos, promovendo maior estabilidade coloidal, menor agregação e menor toxicidade no escuro (Gergely et al., 2023; Repetowski et al., 2024; Turnovská & Etrych, 2025).

Em células NIH-3T3, também houve uma redução significativa da viabilidade após

TFD mediada por 15 min de exposição ao AlClPc livre e ao sistema AuPLU/AlClPc (**Figura 9**). A viabilidade de NIH-3T3 foi reduzida para aproximadamente 27% no tratamento com AlClPc livre e para valores entre 16-24% nas diferentes concentrações de AuPLU/AlClPc, valores estatisticamente superiores aos observados em células 4T1. Essa diferença de comportamento entre as linhagens NIH-3T3 e 4T1 indica um grau moderado de seletividade celular, o qual, embora limitado pelas condições do modelo *in vitro*, pode tornar-se mais evidente em sistemas fisiológicos mais complexos e deve ser investigada.

Rodrigues et al. (2020) utilizaram uma nanoemulsão contendo ftalocianina de alumínio (AlPc-NE) como mediadora da TFD em um modelo murino de câncer de mama, no qual células 4T1 foram enxertadas em camundongos BALB/c, e demonstraram elevada eficácia terapêutica, com eliminação tumoral e prevenção da formação de metástases pulmonares. Além disso, a análise histopatológica não evidenciou alterações anormais em órgãos como pulmões e fígado, com achados comparáveis aos observados em animais saudáveis.

A combinação de menor toxicidade no escuro em células não tumorais, aliada à maior sensibilidade das células tumorais, reforça o potencial do nanossistema AuPLU/AlClPc para aplicações em TFD, nas quais a ação citotóxica é preferencialmente condicionada à irradiação e ao tecido-alvo. Além disso, os resultados obtidos em NIH-3T3 e 4T1 sob condições de TFD sugerem que, uma vez ativado pela luz, o AlClPc mantém elevada capacidade de geração de EROs independentemente de sua forma de apresentação. Entretanto, esses resultados devem ser interpretados com cautela, uma vez que, em condições experimentais simplificadas, a ativação luminosa tende a sobrepor eventuais efeitos moduladores do nanocarreador, resultando em respostas fotodinâmicas comparáveis entre os sistemas avaliados.

Nesse contexto, ainda que o sistema AuPLU/AlClPc apresente eficácia fotodinâmica semelhante à do FS livre nos ensaios realizados, a associação entre eles oferece vantagens terapêuticas relevantes. A nanoestrutura viabiliza estratégias de direcionamento passivo ou ativo e potencial redução de efeitos *off-target* (G. Li et al., 2024; Z. Li et al., 2023; Płaskonka et al., 2025). Ademais, as propriedades ópticas intrínsecas das AuNP conferem ao sistema potencial aplicação teranóstica, possibilitando a integração de diagnóstico por imagem e tratamento em uma única plataforma. Foi demonstrado previamente o elevado potencial do nanocompósito como um nanocarreador biocompatível e agente de contraste em tomografias computadorizadas de raios X, com desempenho semelhante a um agente de contraste iodado comercialmente disponível (Gomes et al., 2023). Dessa forma, a equivalência de eficácia observada *in vitro* não invalida, mas reforça o potencial de AuPLU/AlClPc para aplicações

in vivo mais seguras, controladas e multifuncionais.

5.6. Efeito a longo prazo da TFD mediada por AuPLU/AICIPc em células 4T1-luc

O efeito da TFD mediada por AuPLU/AICIPc em células 4T1-luc foi monitorado por um período de até 72 h, em tempo real, para investigar o potencial de remissão de células tumorais após o tratamento. Os resultados obtidos estão apresentados na **Figura 10**.

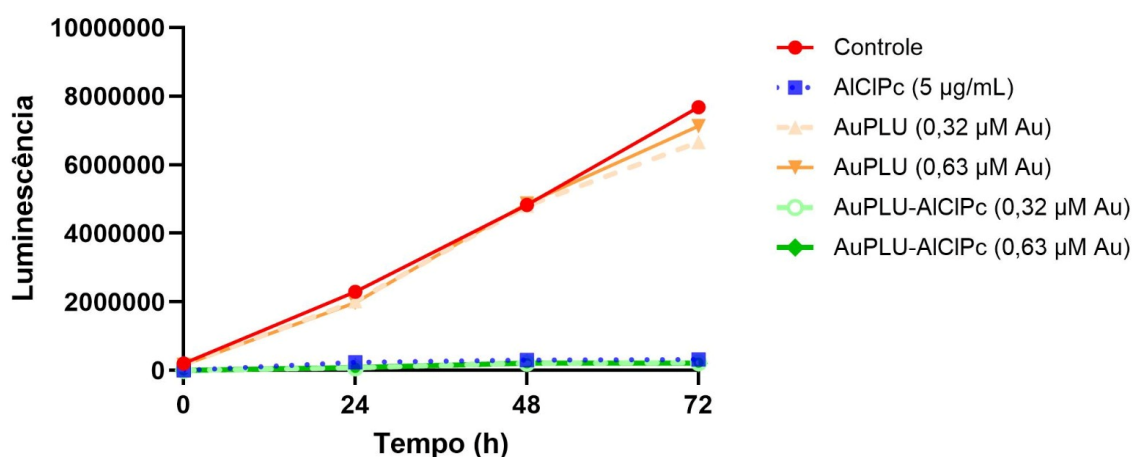


Figura 10. Monitoramento em tempo real da proliferação de células 4T1 submetidas a TFD mediada por AuPLU/AICIPc. A luminescência foi monitorada por 72 h (0, 24, 48 e 72 h) como indicador da atividade metabólica celular. Tempo 0 refere-se ao período imediatamente após a TFD. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão de três ensaios independentes realizados em triplicata técnica ($n = 9$). Diferenças estatisticamente significativas foram determinadas por Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn ($p < 0,05$).

O nanocompósito isolado não apresentou efeito tóxico a longo prazo, mantendo o crescimento celular contínuo, de forma similar ao grupo controle. Esse comportamento reforça a biocompatibilidade da plataforma. Por outro lado, os grupos tratados com AICIPc livre e com AuPLU/AICIPc apresentaram morte celular imediata após a TFD, evidenciando ação fotodinâmica rápida e altamente eficiente. Observa-se que, mesmo após 72 h dos tratamentos, a taxa de luminescência, indicativa de atividade metabólica, permaneceu em valores baixos, demonstrando que não houve recuperação da atividade proliferativa das células tumorais. Observou-se diferença significativa, particularmente, entre o grupo controle e AuPLU/AICIPc (0,63 μ M Au) após 72 h ($p=0,0341$).

A morfologia das células 4T1-luc foi avaliada 72 h após a TFD por microscopia de contraste de fase, com o objetivo de acompanhar a evolução temporal do efeito citotóxico. As micrografias correspondentes estão apresentadas na **Figura 11**. Observou-se que as alterações morfológicas se tornaram mais pronunciadas ao longo do tempo, sugerindo que o dano fotodinâmico inicial evoluiu para perda sustentada de adesão e de capacidade proliferativa. Enquanto o grupo AuPLU manteve aspecto semelhante ao controle, indicando ausência de citotoxicidade relevante na ausência do FS, os grupos contendo AlCIPc exibiram comprometimento morfológico comparável entre si, com escassez de células aderidas, acentuada escassez de células e abundância de debris.

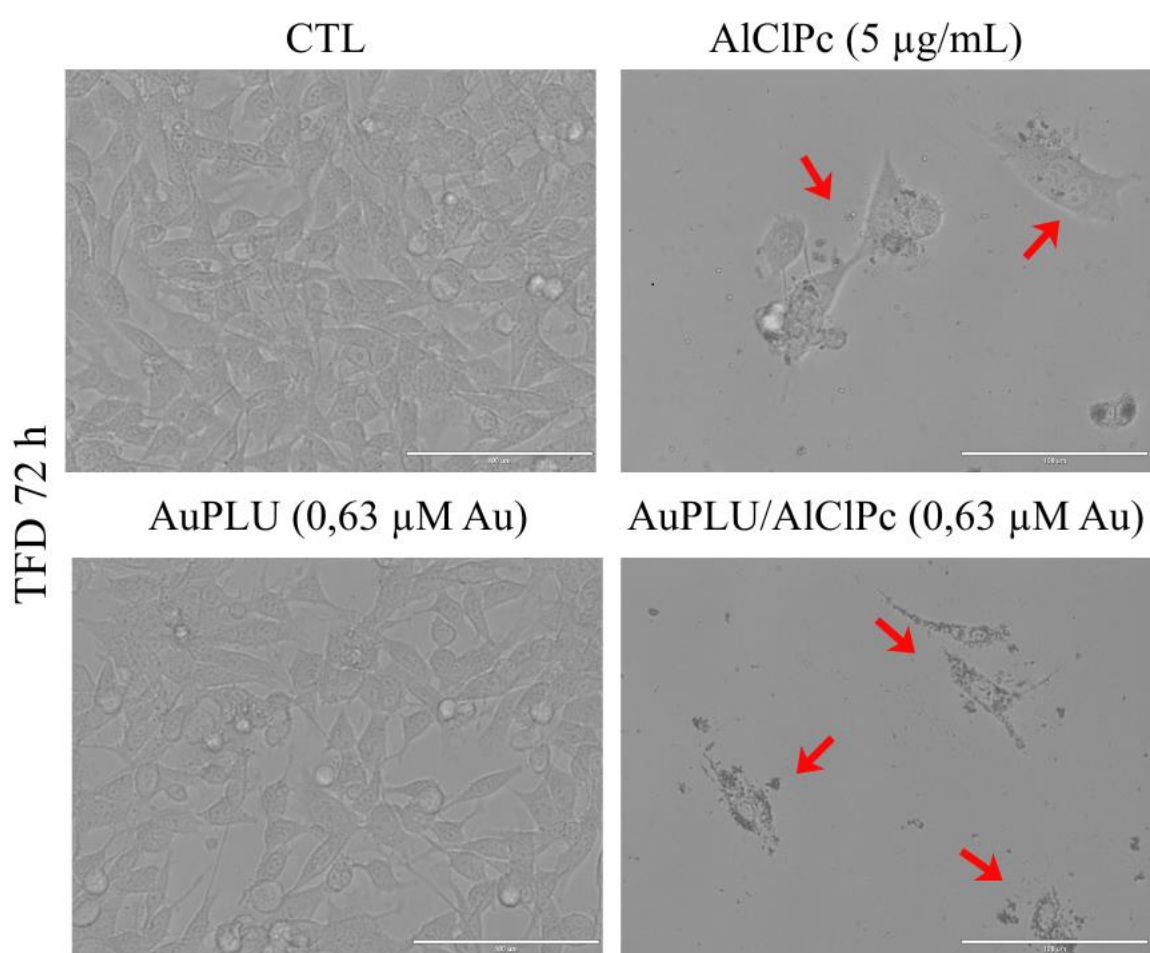


Figura 11. Morfologia celular de 4T1-luc após 15 min de incubação e avaliação 72 h após a terapia fotodinâmica (TFD), nos grupos AuPLU, AlCIPc livre e AuPLU/AlCIPc, nas concentrações de 0,63 μM (Au) e 5 $\mu\text{g/mL}$ (AlCIPc). Barras de escala: 400 μm . Em vermelho debris.

Essa persistência do efeito citotóxico indica que a TFD induziu danos irreversíveis às células 4T1-luc, caracterizando uma ação sustentada e altamente efetiva do FS quando

associado ao nanocompósito. Em termos biológicos, esse padrão é especialmente relevante porque, além do dano oxidativo imediato gerado durante a irradiação, a TFD pode desencadear uma cascata de eventos pós-tratamento, como disfunção mitocondrial, peroxidação de membranas e danos a macromoléculas, que se consolidam ao longo de horas ou dias e culminam em morte celular tardia (Peskova et al., 2021).

Assim, a manutenção do sinal reduzido em um intervalo prolongado sugere não apenas citotoxicidade aguda, mas também comprometimento duradouro da capacidade de repopulação tumoral, aspecto crítico para o controle do crescimento neoplásico *in vitro*. Adicionalmente, a associação do FS ao AuPLU pode favorecer uma distribuição intracelular mais adequada e aumentar a fração de FS efetivamente disponível em compartimentos subcelulares sensíveis, promovendo geração localizada de EROs e elevando a probabilidade de lesões letais pouco passíveis de reparo (Overchuk et al., 2023).

Resultados semelhantes foram descritos por Simelane et al. (2023), que reportaram aumento significativo na produção de EROs e morte celular imediata em células de câncer de colón (Caco-2) após irradiação em sistemas contendo AlClPc (20 mg, 0,023 mmol) associada a nanopartículas bimetálicas de cobre-ouro. No estudo, as células foram previamente incubadas com o FS por 4 h, seguidas de irradiação e avaliação da viabilidade celular após 24 h, sem investigação de tempos experimentais superiores. De maneira semelhante, Mello et al. (2022) também demonstraram elevada citotoxicidade da AlClPc (20 μ M e 40 μ M) associada a nanopartículas lipídicas sólidas à base de manteiga da Amazônia em células de melanoma murino (B16-F10) após irradiação, com avaliação *in vitro* realizada 24 h após o tratamento, igualmente sem análise de períodos mais prolongados. Em conjunto, esses achados reforçam a superioridade de fotossensibilizadores veiculados por nanoestruturas, comportamento que converge com os resultados observados no presente estudo.

Embora estudos indiquem que os efeitos da TFD podem persistir por pelo menos 48 h após o tratamento, com perda significativa da capacidade clonogênica das células, análises cinéticas mais detalhadas, particularmente em 72 h, ainda são pouco exploradas na literatura (de Souza et al., 2022; García Calavia et al., 2018b). Nesse contexto, a avaliação temporal ampliada apresentada neste trabalho contribui para uma compreensão mais completa da progressão dos efeitos citotóxicos induzidos pela TFD.

5.7. Mecanismos antitumorais da TFD mediada por AuPLU/AlClPc em células 4T1-luc

Para investigar as vias responsáveis pela morte celular induzida TFD mediada por AuPLU/AICIPc, foram analisados a produção de EROs, a integridade da membrana celular e do DNA. As análises foram realizadas imediatamente após a TFD, uma vez o fotodano foi imediato, sem sinais de recuperação celular por até 72 h.

A análise de produção de EROs não revelou diferenças estatisticamente significativas nos níveis de fluorescência entre os grupos de tratamento (**Figura 12**). Ainda assim, em comparação ao controle, observou-se um aumento percentual na produção de EROs imediatamente após a TFD nos grupos tratados com AuPLU/AICIPc e AICIPc livre, que apresentaram medianas da intensidade de fluorescência (MIF) de $2,98 \times 10^5$ e $2,74 \times 10^5$ ua, correspondendo a aumentos aproximados de 36% e 26%, respectivamente. Já AuPLU isolado apresentou valores de MIF semelhantes aos do controle ($1,76 \times 10^5$ e $2,18 \times 10^5$ ua, respectivamente), confirmando que a plataforma AuPLU, por si só, não contribui de forma relevante para o estresse oxidativo. Em conjunto, esses resultados indicam que os tratamentos com AuPLU/AICIPc e AICIPc livre induzem níveis comparáveis de estresse oxidativo imediato, sem distinção significativa entre o FS e o nanocompósito.

Para garantir que a autofluorescência do FS não interferisse na quantificação de EROs, foram incluídos controles sem marcação com a sonda fluorescente, o que permitiu confirmar que o sinal emitido pelo CellROX Green[®], independentemente de estímulo para EROs, é suficientemente elevado para tornar desprezível qualquer contribuição de autofluorescência da AICIPc. Assim, os valores observados refletem efetivamente a produção de EROs.

Entretanto, a quantificação de EROs por CellROX Green[®] pode estar sujeita a limitações cinéticas relacionadas ao momento de marcação. Como a sonda foi adicionada minutos após a irradiação, é provável que a leitura tenha subestimado o pico inicial (*burst*) de EROs primárias geradas durante a TFD, especialmente espécies de vida extremamente curta, como o $^1\text{O}_2$ e o radical hidroxila ($\bullet\text{OH}$). Assim, embora o ensaio confirme a ocorrência de estresse oxidativo, o sinal fluorescente obtido tende a refletir predominantemente oxidantes residuais e/ou espécies reativas secundárias formadas posteriormente ao evento fotodinâmico inicial, as quais podem ser influenciadas pela dinâmica temporal entre irradiação, manipulação e leitura.

Adicionalmente, em condições de dano celular acentuado particularmente quando há comprometimento da membrana plasmática, como sugerido pelos demais resultados, a cinética de entrada, a distribuição intracelular e a retenção da sonda podem ser alteradas,

introduzindo variabilidade e limitando a sensibilidade do método para discriminar diferenças entre os grupos. Desse modo, no ensaio de produção de EROs, a ausência de diferenças estatísticas marcantes entre os tratamentos não necessariamente contradiz a elevada fotocitotoxicidade observada no ensaio de viabilidade, podendo refletir, ao menos em parte, limitações inerentes à janela temporal de detecção e ao princípio do método empregado.

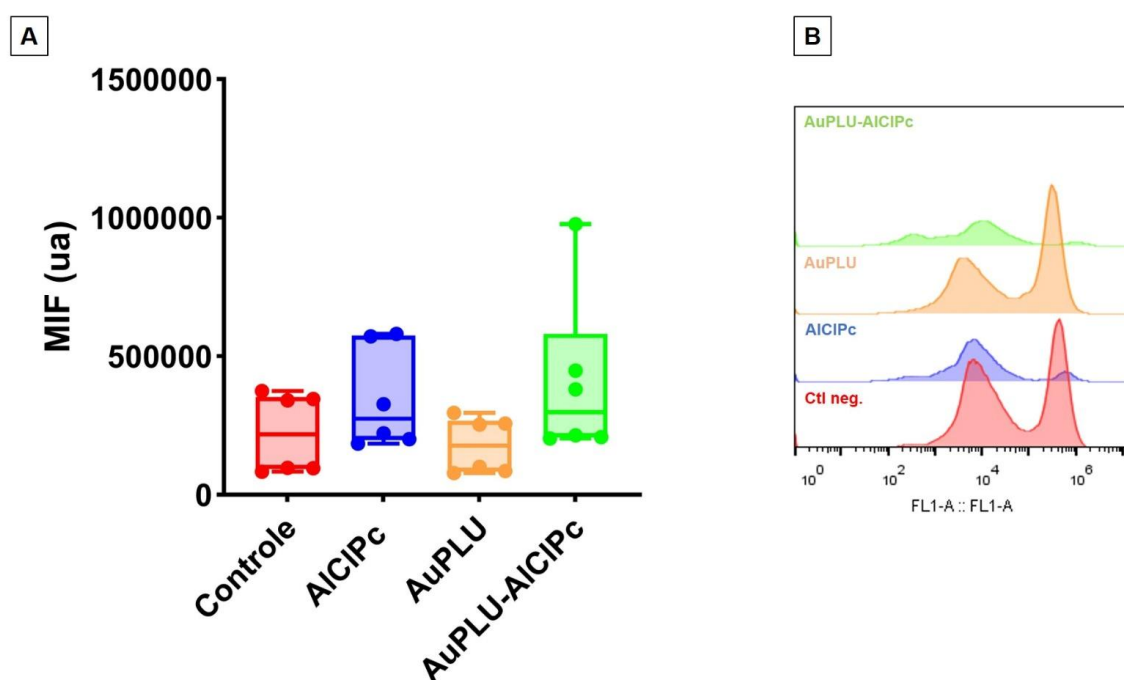


Figura 12. Detecção da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) em células 4T1 por citometria de fluxo utilizando a sonda fluorescente CellROX Green®. (A) Quantificação da mediana da intensidade de fluorescência (MIF, unidades arbitrárias) para os grupos controle, AICIPc livre, AuPLU e AuPLU/AICIPc. (B) Histogramas representativos da intensidade de fluorescência no canal FL1-A para os grupos controle, AICIPc livre, AuPLU e AuPLU/AICIPc, evidenciando o deslocamento do sinal fluorescente após os diferentes tratamentos. Os dados são apresentados como boxplot indicando mediana, intervalo interquartil e valores individuais de dois ensaios independentes realizados em triplicata técnica ($n = 6$). Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos analisados (Kruskal-Wallis, $p > 0,05$).

A análise de fragmentação de DNA revelou diferenças significativas entre os grupos experimentais (**Figura 13**). O controle negativo apresentou níveis basais de DNA fragmentado (<2%), enquanto o controle positivo exibiu aumento moderado (~26%), confirmando a sensibilidade do ensaio. O tratamento com AICIPc livre induziu fragmentação expressiva do DNA (~57%), indicando dano genômico associado à TFD. O nanocompósito isolado apresentou baixos níveis de fragmentação (~13%), semelhantes ao controle negativo,

evidenciando ausência de genotoxicidade relevante. Em contraste, o AuPLU/AICIPc apresentou o maior percentual de DNA fragmentado (~77%), sugerindo intensificação do dano genético após ativação luminosa. Esses resultados indicam que a fragmentação de DNA é dependente da presença do FS e é potencializada quando associado ao nanossistema, sendo compatível com mecanismos de morte celular mediados por estresse oxidativo. Ressalta-se, entretanto, que se trata de um ensaio preliminar, conduzido com número amostral reduzido ($n=2$), sendo necessária a repetição do experimento para confirmação e robustez estatística dos achados.

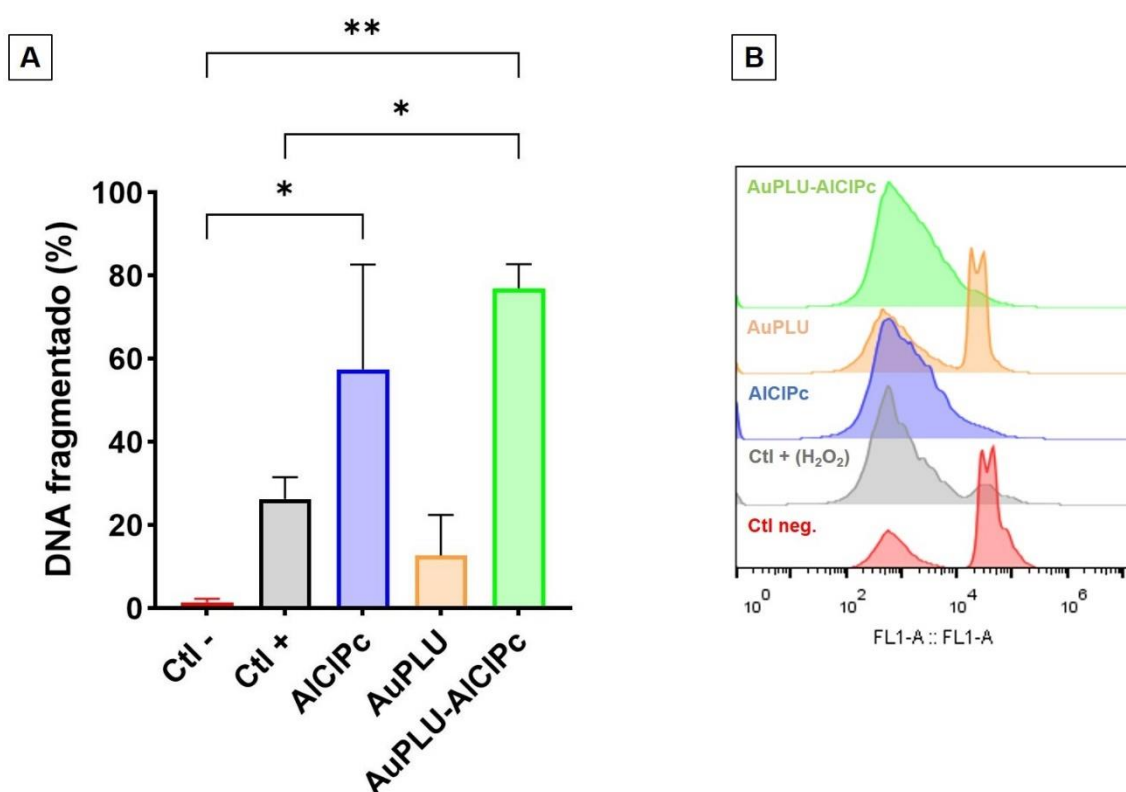


Figura 13. Fragmentação de DNA em células 4T1 após terapia fotodinâmica (TFD) avaliada por citometria de fluxo após coloração com IP. (A) Percentual de DNA fragmentado (%) para os grupos controle negativo, controle positivo (H₂O₂), AICIPc, AuPLU e AuPLU/AICIPc. (B) Histogramas representativos da intensidade de fluorescência do IP, canal FL1-A para os diferentes grupos, evidenciando alterações no perfil de fluorescência após os tratamentos. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão de duas replicatas técnicas ($n=2$). Diferenças estatisticamente significativas foram determinadas por ANOVA one-way seguida de teste pós-hoc Dunn (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

A integridade da membrana plasmática foi avaliada imediatamente após a irradiação por meio do ensaio de exclusão por azul de tripan (**Figura 14**). O grupo tratado com AuPLU isolado manteve elevada integridade de membrana, com aproximadamente 99% das células viáveis, semelhante ao controle negativo (<1% de membrana lesionada). Em contraste, o

tratamento com AICIPc livre resultou em dano de membrana em cerca de 59% das células, evidenciando efeito citotóxico imediato, em concordância com os resultados de viabilidade celular previamente observados. O grupo AuPLU/AICIPc apresentou o maior comprometimento de membrana, com aproximadamente 94% das células exibindo membrana lesionada, valor significativamente superior ao controle e ao AuPLU isolado. Contudo, não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos AuPLU/AICIPc e AICIPc livre, indicando que a associação do FS ao nanocompósito não amplifica de forma relevante o dano de membrana induzido pela TFD, mas preserva sua eficácia citotóxica imediata.

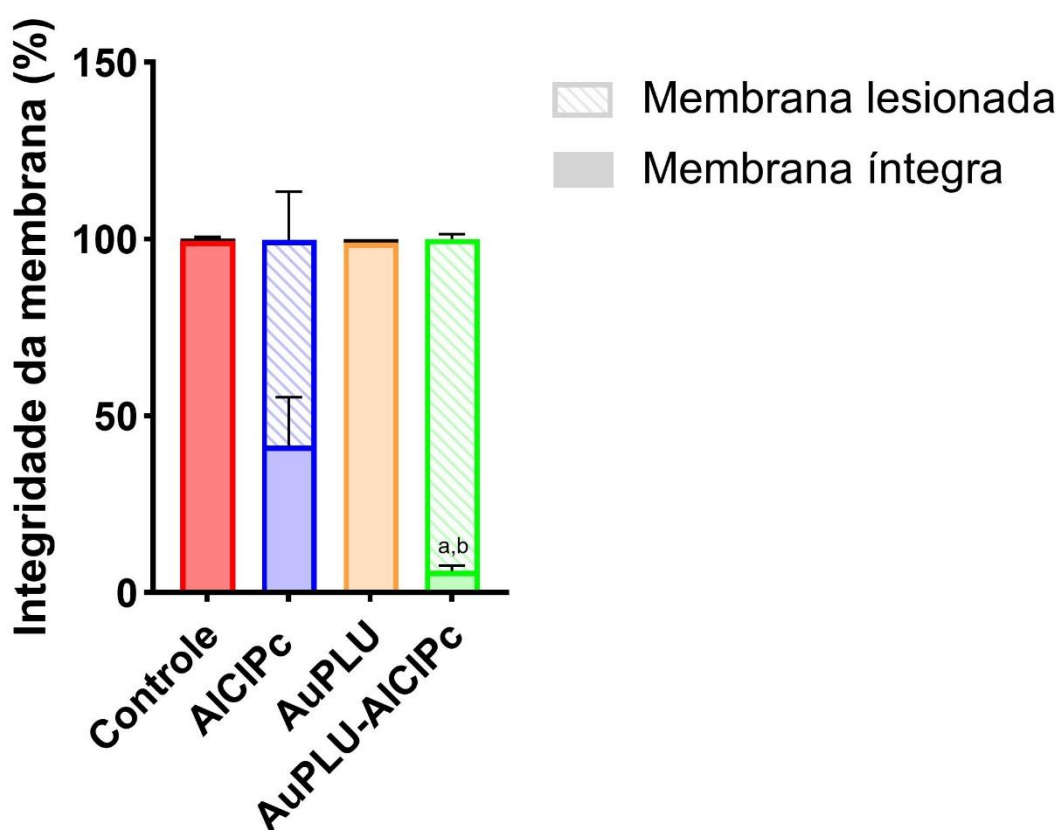


Figura 14. Avaliação da integridade da membrana plasmática de células 4T1 imediatamente após a TFD mediada por AuPLU/AICIPc, determinada pelo ensaio de exclusão por azul de tripan. As barras representam a porcentagem de células com membrana íntegra (preto) e membrana lesionada (cinza) nos grupos controle, AICIPc livre, AuPLU e AuPLU/AICIPc. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão de dois ensaios independentes em triplicata técnica ($n=6$). As letras **a** e **b** indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle e ao grupo AuPLU, respectivamente (Kruskal-Wallis, teste post-hoc de Dunn, $p < 0,05$).

6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Considerando os principais resultados obtidos nesse estudo, conclui-se que AuPLU/AICIPc:

- Apresentou DH maior em água e aparente diminuição em meio de cultivo suplementado, possivelmente associada à formação de corona proteica. A presença de AICIPc aumentou o DH, compatível com a associação do FS e sua tendência à agregação. Apesar do PDI moderado-alto, o PZ levemente aniônico e os parâmetros obtidos sustentam a adequação do sistema para ensaios biológicos.
- A caracterização fotoquímica indicou que a formulação AuPLU/AICIPc gerou fotoatividade eficiente, com melhor desempenho que AICIPc livre, confirmando sua capacidade de produzir EROs e seu potencial como plataforma para TFD.
- A avaliação sob condições de diluição mostrou que AICIPc foi incorporado ao nanocomposito AuPLU, sendo observados duas bandas bem definidas.
- Em concentrações mais elevadas o AuPLU/AICIPc potencializou o efeito citotóxico de AICIPc em células 4T1-luc sob tratamento no escuro por 24 h.
- Os resultados demonstram que 15 min de incubação são suficientes para que AuPLU/AICIPc e AICIPc livre atinjam efeito fotodinâmico máximo em 4T1-luc, com forte queda de viabilidade sem ganho adicional em tempos maiores.
- AuPLU/AICIPc exibiu melhor perfil de segurança no escuro em NIH-3T3 (viabilidade > 90%), enquanto o AICIPc livre apresentou citotoxicidade basal. Sob TFD, observou-se seletividade moderada, com maior sensibilidade das células tumorais em comparação aos fibroblastos.
- A longo prazo (72 h), a TFD mediada por AuPLU/AICIPc e por AICIPc livre induziu dano irreversível às células 4T1, evidenciando uma ação sustentada e elevada eficácia.
- Células 4T1 tratadas com AuPLU/AICIPc apresentaram morfologia preservada no escuro. Após a TFD, o dano celular tornou-se progressivo e mais evidente em 72 h, com perda de adesão e debris nos grupos contendo AICIPc, sem diferenças relevantes em comparação ao AICIPc livre.
- AuPLU/AICIPc e AICIPc livre desencadearam aumento imediato de EROs, acompanhado de comprometimento de membrana plasmática e fragmentação de

DNA; embora os níveis de EROs e o dano de membrana tenham sido globalmente semelhantes entre as formulações com FS.

Em síntese, o espectro UV-vis do AuPLU/AICIPc apresentou duas bandas bem definidas, em aproximadamente 520 nm e 680 nm, atribuídas, respectivamente, à ressonância plasmônica das AuNPs e à banda Q característica do AICIPc. A coexistência dessas bandas indica que ambos os componentes permanecem opticamente ativos no sistema micelar. A presença da banda Q sugere que o AICIPc encontra-se majoritariamente em forma monomérica ou fracamente agregada, favorecida pelo encapsulamento no núcleo hidrofóbico do Pluronic. Entretanto, não foi observado aumento significativo da eficácia fotodinâmica em comparação ao AICIPc livre, indicando que, nas condições avaliadas, a associação ao nanocompósito preserva, mas não amplifica, a atividade fotodinâmica do FS.

Esse comportamento pode estar relacionado à ausência de um acoplamento plasmônico efetivo capaz de aumentar a geração de EROs, bem como à saturação da resposta celular ao dano oxidativo. Apesar disso, a combinação AuPLU/AICIPc pode oferecer vantagens relacionadas à estabilidade coloidal, dispersão em meio biológico e potencial controle da entrega do composto.

Embora os resultados obtidos neste estudo tenham sido gerados em modelos *in vitro*, eles permitem vislumbrar possíveis caminhos para a translação clínica do sistema AuPLU/AICIPc no tratamento do câncer de mama. Em um cenário clínico, a formulação poderia ser administrada por via local ou sistêmica, seguida da aplicação controlada de luz no local do tumor para ativação do FS e consequente geração localizada de EROs. Em tumores superficiais ou facilmente acessíveis, a TFS poderia ser realizada por meio de fontes de luz externas, constituindo uma abordagem minimamente invasiva e potencialmente complementar às terapias convencionais. Já em tumores mais profundos, a ativação do FS poderia ser realizada por meio da inserção de fibras ópticas diretamente no tecido tumoral, técnica já empregada em protocolos clínicos de TFD para outros tipos de câncer.

Nesses contextos, a TFD poderia atuar como estratégia adjuvante após procedimentos diagnósticos, como biópsia, ou após ressecção cirúrgica parcial ou total, contribuindo para a eliminação de células tumorais residuais ou para a redução da massa tumoral antes de intervenções terapêuticas adicionais.

Como perspectivas futuras, recomenda-se otimizar o nanossistema para evidenciar vantagens terapêuticas além da preservação da fotoatividade, sobretudo ajustando a razão Au:PLU:AICIPc, visando principalmente, a distância entre o FS e a superfície do ouro para

favorecer um possível acoplamento plasmônico. Adicionalmente, torna-se relevante quantificar a captação celular e mapear a localização subcelular do AlClPc no nanocompósito, uma vez que o sítio de geração de EROs influencia diretamente a resposta fotodinâmica. Além disso, ensaios *in vivo* são necessários para avaliar a biodistribuição, a biocompatibilidade e a eficácia terapêutica do nanossistema em modelos animais, etapas fundamentais para avançar na validação translacional dessa plataforma nanoestruturada.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abram, S.-L., Tavernaro, I., Johnston, L. J., Zou, S., & Resch-Genger, U. (2025). Nanoscale reference and test materials for the validation of characterization methods for engineered nanomaterials — current state, limitations, and needs. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 417(12), 2405–2425. <https://doi.org/10.1007/s00216-024-05719-6>
- Agostinis, P., Berg, K., Cengel, K. A., Foster, T. H., Girotti, A. W., Gollnick, S. O., Hahn, S. M., Hamblin, M. R., Juzeniene, A., Kessel, D., Korbelik, M., Moan, J., Mroz, P., Nowis, D., Piette, J., Wilson, B. C., & Golab, J. (2011). Photodynamic therapy of cancer: An update. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 61(4), 250–281. <https://doi.org/10.3322/caac.20114>
- Ahmeda, M., Ahmida, N., & Ahmeida, A. (2017). Introduction to nanotechnology: definition, terms, occurrence and applications in environment. *Libyan International Medical University Journal*, 02(01), 12–26. <https://doi.org/10.21502/limuj.003.02.2017>
- Alonso-Mtz de Salinas, L., Garcia-Mouronte, E., Naharro-Rodriguez, J., Perez-Gonzalez, L. A., & Fernández-Guarino, M. (2025). Optimization of Photodynamic Therapy in Dermatology: The Role of Light Fractionation. *International Journal of Molecular Sciences*, 26(16), 8054. <https://doi.org/10.3390/ijms26168054>
- Anselmo, G., Paulo, J., De Moraes, C., Bentes, R., & Azevedo, D. E. (2022). *NANOTECNOLOGIA: CONSIDERAÇÕES EM MATERIAIS, SAÚDE E MEIO AMBIENTE*.
- Awashra, M., & Młynarz, P. (2023). The toxicity of nanoparticles and their interaction with cells: an *in vitro* metabolomic perspective. *Nanoscale Advances*, 5(10), 2674–2723. <https://doi.org/10.1039/D2NA00534D>
- Bartusik-Aebisher, D., Przygórzewska, A., Woźnicki, P., & Aebisher, D. (2025). Nanoparticles for Photodynamic Therapy of Breast Cancer: A Review of Recent Studies. *Molecules*, 30(7), 1571. <https://doi.org/10.3390/molecules30071571>
- Borzęcka, W., Domiński, A., & Kowalczyk, M. (2021). Recent Progress in Phthalocyanine-Polymeric Nanoparticle Delivery Systems for Cancer Photodynamic Therapy. *Nanomaterials*, 11(9), 2426. <https://doi.org/10.3390/nano11092426>
- Bray, F., Laversanne, M., Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Soerjomataram, I., & Jemal, A. (2024). Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 74(3), 229–263. <https://doi.org/10.3322/caac.21834>
- Bunin, D. A., Martynov, A. G., Gvozdev, D. A., & Gorbunova, Y. G. (2023). Phthalocyanine aggregates in the photodynamic therapy: dogmas, controversies, and future prospects. *Biophysical Reviews*, 15(5), 983–998. <https://doi.org/10.1007/s12551-023-01129-7>
- Ceron Jayme, C., Rezende, N., S. Fernandes, D., B de Paula, L., Gimenes de Castro, B., U Takahashi, L. A., & Tedesco, A. C. (2022). Target selectivity of cholesterol-phosphatidylcholine liposome loaded with phthalocyanine for breast cancer diagnosis

and treatment by photodynamic therapy. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 39, 102992. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2022.102992>

Choudhary, S., Kaur, S. D., Gandhi, H., Pemmaraju, D. B., & Kapoor, D. N. (2025). An updated review on the potential of gold nanoparticles for cancer treatment and detection. *Gold Bulletin*, 58(1), 4. <https://doi.org/10.1007/s13404-025-00357-x>

Correia, J. H., Rodrigues, J. A., Pimenta, S., Dong, T., & Yang, Z. (2021). Photodynamic Therapy Review: Principles, Photosensitizers, Applications, and Future Directions. *Pharmaceutics*, 13(9), 1332. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13091332>

Crous, A., & Abrahamse, H. (2022). Photodynamic Therapy with an ALPcS4Cl Gold Nanoparticle Conjugate Decreases Lung Cancer's Metastatic Potential. *Coatings*, 12(2), 199. <https://doi.org/10.3390/coatings12020199>

Dai, T., Fuchs, B. B., Coleman, J. J., Prates, R. A., Astrakas, C., St. Denis, T. G., Ribeiro, M. S., Mylonakis, E., Hamblin, M. R., & Tegos, G. P. (2012). Concepts and Principles of Photodynamic Therapy as an Alternative Antifungal Discovery Platform. *Frontiers in Microbiology*, 3. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00120>

Danaei, M., Dehghankhold, M., Ataei, S., Hasanzadeh Davarani, F., Javanmard, R., Dokhani, A., Khorasani, S., & Mozafari, M. R. (2018). Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. *Pharmaceutics*, 10(2), 57. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10020057>

de Souza, M., Shinobu-Mesquita, C., Meirelles, L. E., Mari, N., César, G., Gonçalves, R., Caetano, W., Damke, E., Silva, V., Damke, G., & Consolaro, M. (2022). Effects of hypericin encapsulated on Pluronic F127 photodynamic therapy against triple negative breast cancer. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 23(5), 1741–1751. <https://doi.org/10.31557/APJCP.2022.23.5.1741>

Dougherty, T. J., & Marcus, S. L. (1992). Photodynamic therapy. *European Journal of Cancer*, 28(10), 1734–1742. [https://doi.org/10.1016/0959-8049\(92\)90080-L](https://doi.org/10.1016/0959-8049(92)90080-L)

Dube, E., Oluwole, D. O., Njemuwa, N., Prinsloo, E., & Nyokong, T. (2019). Photophysicochemical and photodynamic therapy properties of metallophthalocyanines linked to gold speckled silica nanoparticles. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 25, 325–333. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2019.01.019>

Dudzik, T., Domański, I., & Makuch, S. (2024). The impact of photodynamic therapy on immune system in cancer – an update. *Frontiers in Immunology*, 15. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1335920>

Evergren, E., Mills, I. G., & Kennedy, G. (2024). Adaptations of membrane trafficking in cancer and tumorigenesis. *Journal of Cell Science*, 137(10). <https://doi.org/10.1242/jcs.260943>

Faber, T., & Lamprecht, A. (2025). Cellular Uptake and Trafficking of Lipid Nanocarriers Using High-Resolution Electron Microscopy. *AAPS PharmSciTech*, 26(3), 71. <https://doi.org/10.1208/s12249-025-03061-3>

Fan, D., Cao, Y., Cao, M., Wang, Y., Cao, Y., & Gong, T. (2023). Nanomedicine in cancer therapy. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 8(1), 293. <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01536-y>

Fröhlich, E. (2012). The role of surface charge in cellular uptake and cytotoxicity of medical nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine*, 5577. <https://doi.org/10.2147/IJN.S36111>

García Calavia, P., Chambrier, I., Cook, M. J., Haines, A. H., Field, R. A., & Russell, D. A. (2018a). Targeted photodynamic therapy of breast cancer cells using lactose-phthalocyanine functionalized gold nanoparticles. *Journal of Colloid and Interface Science*, 512, 249–259. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2017.10.030>

García Calavia, P., Chambrier, I., Cook, M. J., Haines, A. H., Field, R. A., & Russell, D. A. (2018b). Targeted photodynamic therapy of breast cancer cells using lactose-phthalocyanine functionalized gold nanoparticles. *Journal of Colloid and Interface Science*, 512, 249–259. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2017.10.030>

Gergely, L. P., Yüceel, Ç., İsci, Ü., Spadin, F. S., Schneider, L., Spingler, B., Frenz, M., Dumoulin, F., & Vermathen, M. (2023). Comparing PVP and Polymeric Micellar Formulations of a PEGylated Photosensitizing Phthalocyanine by NMR and Optical Techniques. *Molecular Pharmaceutics*, 20(8), 4165–4183. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.3c00306>

Gomes, D. S. B., Paterno, L. G., Santos, A. B. S., Barbosa, D. P. P., Holtz, B. M., Souza, M. R., Moraes-Souza, R. Q., Garay, A. V., de Andrade, L. R., Sartoratto, P. P. C., Mertz, D., Volpato, G. T., Freitas, S. M., & Soler, M. A. G. (2023). UV-Accelerated Synthesis of Gold Nanoparticle–Pluronic Nanocomposites for X-ray Computed Tomography Contrast Enhancement. *Polymers*, 15(9), 2163. <https://doi.org/10.3390/polym15092163>

Grieneisen, M. L., & Zhang, M. (2011). Nanoscience and Nanotechnology: Evolving Definitions and Growing Footprint on the Scientific Landscape. *Small*, 7(20), 2836–2839. <https://doi.org/10.1002/smll.201100387>

Guo, Z., Zhou, W., Ke, C., Huang, Z., Wang, Y., Zhu, Y., Yuan, K., & Qi, X. (2024). Simulating PDT of port-wine stains in the in vivo chicken wattle model using Hemoporphin and radiation at 532 nm: Comparison of a LED and a laser source. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 46, 104068. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2024.104068>

Hajipour, M. J., Safavi-Sohi, R., Sharifi, S., Mahmoud, N., Ashkarran, A. A., Voke, E., Serpooshan, V., Ramezankhani, M., Milani, A. S., Landry, M. P., & Mahmoudi, M. (2023). An Overview of Nanoparticle Protein Corona Literature. *Small*, 19(36). <https://doi.org/10.1002/smll.202301838>

- Horne, T. K., & Cronjé, M. J. (2017). Mechanistics and photo-energetics of macrocycles and photodynamic therapy: An overview of aspects to consider for research. *Chemical Biology & Drug Design*, 89(2), 221–242. <https://doi.org/10.1111/cbdd.12761>
- Huang, D., Sun, L., Huang, L., & Chen, Y. (2021). Nanodrug Delivery Systems Modulate Tumor Vessels to Increase the Enhanced Permeability and Retention Effect. *Journal of Personalized Medicine*, 11(2), 124. <https://doi.org/10.3390/jpm11020124>
- INCA. (2023). *Estimativa 2023-2025: Incidência de Câncer no Brasil*.
- Jia, X., & Jia, L. (2012). Nanoparticles Improve Biological Functions of Phthalocyanine Photosensitizers Used for Photodynamic Therapy. *Current Drug Metabolism*, 13(8), 1119–1122. <https://doi.org/10.2174/138920012802850074>
- Joudeh, N., & Linke, D. (2022). Nanoparticle classification, physicochemical properties, characterization, and applications: a comprehensive review for biologists. *Journal of Nanobiotechnology*, 20(1), 262. <https://doi.org/10.1186/s12951-022-01477-8>
- Khandker, S. S., Shakil, Md. S., & Hossen, Md. S. (2020). Gold Nanoparticles; Potential Nanotheranostic Agent in Breast Cancer: A Comprehensive Review with Systematic Search Strategy. *Current Drug Metabolism*, 21(8), 579–598. <https://doi.org/10.2174/1389200221666200610173724>
- Kim, M., & Hong, J. (2025). A Comparative Analysis of Absorbance- and Fluorescence-Based 1,3-Diphenylisobenzofuran Assay and Its Application for Evaluating Type II Photosensitization of Flavin Derivatives. *International Journal of Molecular Sciences*, 27(1), 66. <https://doi.org/10.3390/ijms27010066>
- Kwiatkowski, S., Knap, B., Przystupski, D., Saczko, J., Kędzierska, E., Knap-Czop, K., Kotlińska, J., Michel, O., Kotowski, K., & Kulbacka, J. (2018). Photodynamic therapy – mechanisms, photosensitizers and combinations. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 106, 1098–1107. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.07.049>
- Lau, K. H., Tan, A. M., & Shi, Y. (2022). New and Emerging Targeted Therapies for Advanced Breast Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(4), 2288. <https://doi.org/10.3390/ijms23042288>
- Li, G., Wang, C., Jin, B., Sun, T., Sun, K., Wang, S., & Fan, Z. (2024). Advances in smart nanotechnology-supported photodynamic therapy for cancer. *Cell Death Discovery*, 10(1), 466. <https://doi.org/10.1038/s41420-024-02236-4>
- Li, X., Li, N., Wang, Y., Han, Q., & Sun, B. (2024). Research Progress of Fibroblasts in Human Diseases. *Biomolecules*, 14(11), 1478. <https://doi.org/10.3390/biom14111478>
- Li, X., Zheng, B.-D., Peng, X.-H., Li, S.-Z., Ying, J.-W., Zhao, Y., Huang, J.-D., & Yoon, J. (2019). Phthalocyanines as medicinal photosensitizers: Developments in the last five years. *Coordination Chemistry Reviews*, 379, 147–160. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2017.08.003>

- Li, Z., Zhou, Z., Wang, Y., Wang, J., Zhou, L., Cheng, H.-B., & Yoon, J. (2023). Activatable nano-photosensitizers for precise photodynamic cancer therapy. *Coordination Chemistry Reviews*, 493, 215324. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2023.215324>
- Lin, J., Li, D., Li, C., Zhuang, Z., Chu, C., (Ken) Ostrikov, K., Thompson, E. W., Liu, G., & Wang, P. (2023). A review on reactive oxygen species (ROS)-inducing nanoparticles activated by uni- or multi-modal dynamic treatment for oncotherapy. *Nanoscale*, 15(28), 11813–11833. <https://doi.org/10.1039/D3NR01735D>
- Lockwood, Z. A., Jirousek, M. R., Basilion, J. P., & Burda, C. (2025). Redefining cancer photodynamic therapy with gold nanoparticles. *Photochemistry and Photobiology*, 101(5), 1120–1138. <https://doi.org/10.1111/php.14099>
- Łukasiewicz, S., Czezelewski, M., Forma, A., Baj, J., Sitarz, R., & Stanisławek, A. (2021). Breast Cancer—Epidemiology, Risk Factors, Classification, Prognostic Markers, and Current Treatment Strategies—An Updated Review. *Cancers*, 13(17), 4287. <https://doi.org/10.3390/cancers13174287>
- Lundqvist, M., Stigler, J., Elia, G., Lynch, I., Cedervall, T., & Dawson, K. A. (2008). Nanoparticle size and surface properties determine the protein corona with possible implications for biological impacts. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(38), 14265–14270. <https://doi.org/10.1073/pnas.0805135105>
- Møller, P., & Lykkesfeldt, J. (2014). Positive Charge, Negative Effect: The Impact of Cationic Nanoparticles in The Brain. *Nanomedicine*, 9(10), 1441–1443. <https://doi.org/10.2217/nnm.14.91>
- Maqbool, M., Bekele, F., & Fekadu, G. (2022). Treatment Strategies Against Triple-Negative Breast Cancer: An Updated Review. *Breast Cancer: Targets and Therapy*, Volume 14, 15–24. <https://doi.org/10.2147/BCTT.S348060>
- Marrache, S., Choi, J. H., Tundup, S., Zaver, D., Harn, D. A., & Dhar, S. (2013). Immune stimulating photoactive hybrid nanoparticles for metastatic breast cancer. *Integrative Biology*, 5(1), 215–223. <https://doi.org/10.1039/c2ib20125a>
- Mello, V. C., Araújo, V. H. S., de Paiva, K. L. R., Simões, M. M., Marques, D. C., da Silva Costa, N. R., de Souza, I. F., da Silva, P. B., Santos, I., Almeida, R., Magalhães, K. G., da Silva, S. W., Santos, A. S., Veiga-Souza, F., Souza, P. E. N., Raddichi, M. A., Longo, J. P. F., de Araújo, J. T. C., Muehlmann, L. A., ... Báo, S. N. (2022). Development of New Natural Lipid-Based Nanoparticles Loaded with Aluminum-Phthalocyanine for Photodynamic Therapy against Melanoma. *Nanomaterials*, 12(20), 3547. <https://doi.org/10.3390/nano12203547>
- Mfouo-Tynga, I., Houreld, N. N., & Abrahamse, H. (2018). Characterization of a multiple particle delivery complex and determination of cellular photodamage in skin fibroblast and breast cancer cell lines. *Journal of Biophotonics*, 11(2). <https://doi.org/10.1002/jbio.201700077>
- Mfouo-Tynga, I., Houreld, N. N., & Abrahamse, H. (2018). Evaluation of cell damage induced by irradiated Zinc-Phthalocyanine-gold dendrimeric nanoparticles in a breast

cancer cell line. *Biomedical Journal*, 41(4), 254–264. <https://doi.org/10.1016/j.bj.2018.05.002>

Mkhobongo, B., Chandran, R., & Abrahamse, H. (2023). Impact of Aluminium phthalocyanine nanoconjugate on melanoma stem cells. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 51(1), 334–345. <https://doi.org/10.1080/21691401.2023.2233568>

Monopoli, M. P., Åberg, C., Salvati, A., & Dawson, K. A. (2012). Biomolecular coronas provide the biological identity of nanosized materials. *Nature Nanotechnology*, 7(12), 779–786. <https://doi.org/10.1038/nnano.2012.207>

Naeem, N., Sadiq, A., Ogaly, H. A., & Mughal, E. U. (2025). Phthalocyanine-nanoparticle conjugates for enhanced cancer photodynamic therapy. *RSC Advances*, 15(36), 29890–29924. <https://doi.org/10.1039/D5RA04347F>

Ostańska, E., Aebisher, D., & Bartusik-Aebisher, D. (2021). The potential of photodynamic therapy in current breast cancer treatment methodologies. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 137, 111302. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111302>

Overchuk, M., Weersink, R. A., Wilson, B. C., & Zheng, G. (2023). Photodynamic and Photothermal Therapies: Synergy Opportunities for Nanomedicine. *ACS Nano*, 17(9), 7979–8003. <https://doi.org/10.1021/acsnano.3c00891>

Park, S. J. (2020). Protein–Nanoparticle Interaction: Corona Formation and Conformational Changes in Proteins on Nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine*, Volume 15, 5783–5802. <https://doi.org/10.2147/IJN.S254808>

Patel, P., Vedarethinam, V., Korsah, M. A., Danquah, M. K., & Jeevanandam, J. (2024). Exploring the Potential of Nanoparticles in the Treatment of Breast Cancer: Current Applications and Future Directions. *Applied Sciences*, 14(5), 1809. <https://doi.org/10.3390/app14051809>

Perala, S. R. K., & Kumar, S. (2013). On the Mechanism of Metal Nanoparticle Synthesis in the Brust–Schiffrin Method. *Langmuir*, 29(31), 9863–9873. <https://doi.org/10.1021/la401604q>

Peskova, N. N., Brilkina, A. A., Gorokhova, A. A., Shilyagina, N. Yu., Kutova, O. M., Nerush, A. S., Orlova, A. G., Klapshina, L. G., Vodeneev, V. V., & Balalaeva, I. V. (2021). The localization of the photosensitizer determines the dynamics of the secondary production of hydrogen peroxide in cell cytoplasm and mitochondria. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 219, 112208. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2021.112208>

Płaskonka, D. M., Barczyk, D., Repetowski, P., Warszyńska, M., & Dąbrowski, J. M. (2025). Biomolecule–Photosensitizer Conjugates: A Strategy to Enhance Selectivity and Therapeutic Efficacy in Photodynamic Therapy. *Pharmaceuticals*, 19(1), 65. <https://doi.org/10.3390/ph19010065>

Py-Daniel, K. R., Namban, J. S., de Andrade, L. R., de Souza, P. E. N., Paterno, L. G., Azevedo, R. B., & Soler, M. A. G. (2016). Highly efficient photodynamic therapy colloidal system

based on chloroaluminum phthalocyanine/pluronic micelles. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 103, 23–31. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2016.03.028>

RAK, J., POUCKOVA, P., BENES, J., & VETVICKA, D. (2019). Drug Delivery Systems for Phthalocyanines for Photodynamic Therapy. *Anticancer Research*, 39(7), 3323–3339. <https://doi.org/10.21873/anticancer.13475>

Repetowski, P., Warszyńska, M., Kostecka, A., Pucelik, B., Barzowska, A., Emami, A., İsci, Ü., Dumoulin, F., & Dąbrowski, J. M. (2024). Synthesis, Photo-Characterizations, and Pre-Clinical Studies on Advanced Cellular and Animal Models of Zinc(II) and Platinum(II) Sulfonyl-Substituted Phthalocyanines for Enhanced Vascular-Targeted Photodynamic Therapy. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 16(37), 48937–48954. <https://doi.org/10.1021/acsami.4c04138>

Richards, C. J., Melero Martinez, P., Roos, W. H., & Åberg, C. (2025). High-throughput approach to measure number of nanoparticles associated with cells: size dependence and kinetic parameters. *Nanoscale Advances*, 7(1), 185–195. <https://doi.org/10.1039/D4NA00589A>

Rodrigues, M. C., de Sousa Júnior, W. T., Mundim, T., Vale, C. L. C., de Oliveira, J. V., Ganassin, R., Pacheco, T. J. A., Vasconcelos Morais, J. A., Longo, J. P. F., Azevedo, R. B., & Muehlmann, L. A. (2022). Induction of Immunogenic Cell Death by Photodynamic Therapy Mediated by Aluminum-Phthalocyanine in Nanoemulsion. *Pharmaceutics*, 14(1), 196. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14010196>

Rodrigues, M. C., Vieira, L. G., Horst, F. H., de Araújo, E. C., Ganassin, R., Merker, C., Meyer, T., Böttner, J., Venus, T., Longo, J. P. F., Chaves, S. B., Garcia, M. P., Estrela-Lopis, I., Azevedo, R. B., & Muehlmann, L. A. (2020). Photodynamic therapy mediated by aluminium-phthalocyanine nanoemulsion eliminates primary tumors and pulmonary metastases in a murine 4T1 breast adenocarcinoma model. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 204, 111808. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2020.111808>

Rossetti, F. C., Lopes, L. B., Carollo, A. R. H., Thomazini, J. A., Tedesco, A. C., & Bentley, M. V. L. B. (2011). A delivery system to avoid self-aggregation and to improve in vitro and in vivo skin delivery of a phthalocyanine derivative used in the photodynamic therapy. *Journal of Controlled Release*, 155(3), 400–408. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.06.034>

Sakai, T., & Alexandridis, P. (2005). Mechanism of Gold Metal Ion Reduction, Nanoparticle Growth and Size Control in Aqueous Amphiphilic Block Copolymer Solutions at Ambient Conditions. *The Journal of Physical Chemistry B*, 109(16), 7766–7777. <https://doi.org/10.1021/jp046221z>

Santos, K. L. M., Barros, R. M., da Silva Lima, D. P., Nunes, A. M. A., Sato, M. R., Faccio, R., de Lima Damasceno, B. P. G., & Oshiro-Junior, J. A. (2020). Prospective application of phthalocyanines in the photodynamic therapy against microorganisms and tumor cells: A

mini-review. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 32, 102032. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2020.102032>

Saw, W. S., Anasamy, T., Do, T. T. A., Lee, H. B., Chee, C. F., Isci, U., Misran, M., Dumoulin, F., Chong, W. Y., Kiew, L. V., Imae, T., & Chung, L. Y. (2022). Nanoscaled PAMAM Dendrimer Spacer Improved the Photothermal–Photodynamic Treatment Efficiency of Photosensitizer-Decorated Confeito-Like Gold Nanoparticles for Cancer Therapy. *Macromolecular Bioscience*, 22(8). <https://doi.org/10.1002/mabi.202200130>

Shao, H., & Varamini, P. (2022). Breast Cancer Bone Metastasis: A Narrative Review of Emerging Targeted Drug Delivery Systems. *Cells*, 11(3), 388. <https://doi.org/10.3390/cells11030388>

Shao, X., Wei, X., Song, X., Hao, L., Cai, X., Zhang, Z., Peng, Q., & Lin, Y. (2015). Independent effect of polymeric nanoparticle zeta potential/surface charge, on their cytotoxicity and affinity to cells. *Cell Proliferation*, 48(4), 465–474. <https://doi.org/10.1111/cpr.12192>

Si, P., Razmi, N., Nur, O., Solanki, S., Pandey, C. M., Gupta, R. K., Malhotra, B. D., Willander, M., & de la Zerda, A. (2021). Gold nanomaterials for optical biosensing and bioimaging. *Nanoscale Advances*, 3(10), 2679–2698. <https://doi.org/10.1039/D0NA00961J>

Simelane, N. W. N., Matlou, G. G., & Abrahamse, H. (2023). Photodynamic Therapy of Aluminum Phthalocyanine Tetra Sodium 2-Mercaptoacetate Linked to PEGylated Copper–Gold Bimetallic Nanoparticles on Colon Cancer Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(3), 1902. <https://doi.org/10.3390/ijms24031902>

Tedesco, A., Rotta, J., & Lunardi, C. (2003). Synthesis, Photophysical and Photochemical Aspects of Phthalocyanines for Photodynamic Therapy. *Current Organic Chemistry*, 7(2), 187–196. <https://doi.org/10.2174/1385272033373076>

Thakur, N. S., Patel, G., Kushwah, V., Jain, S., & Banerjee, U. C. (2019). Self-Assembled Gold Nanoparticle–Lipid Nanocomposites for On-Demand Delivery, Tumor Accumulation, and Combined Photothermal–Photodynamic Therapy. *ACS Applied Bio Materials*, 2(1), 349–361. <https://doi.org/10.1021/acsabm.8b00618>

Turkevich, J., Stevenson, P. C., & Hillier, J. (1953). The Formation of Colloidal Gold. *The Journal of Physical Chemistry*, 57(7), 670–673. <https://doi.org/10.1021/j150508a015>

Turnovská, A., & Etrych, T. (2025). Polymeric micelles in advanced photodynamic therapy: Design, delivery and translational prospects. *International Journal of Pharmaceutics: X*, 10, 100439. <https://doi.org/10.1016/j.ijpx.2025.100439>

Wang, B., Hu, S., Teng, Y., Chen, J., Wang, H., Xu, Y., Wang, K., Xu, J., Cheng, Y., & Gao, X. (2024). Current advance of nanotechnology in diagnosis and treatment for malignant tumors. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 9(1), 200. <https://doi.org/10.1038/s41392-024-01889-y>

Wang, J., Zhu, X., Zhang, Y., Pang, Z., Zhao, C., & Zhang, F. (2025). Structural design of porous organic polymers to mitigate π -stacking-induced quenching in

porphyrin/phthalocyanine photosensitizers for enhanced antibacterial activity. *RSC Advances*, 15(56), 48604–48627. <https://doi.org/10.1039/D5RA08102E>

Wu, L., He, C., Zhao, T., Li, T., Xu, H., Wen, J., Xu, X., & Gao, L. (2024). Diagnosis and treatment status of inoperable locally advanced breast cancer and the application value of inorganic nanomaterials. *Journal of Nanobiotechnology*, 22(1), 366. <https://doi.org/10.1186/s12951-024-02644-9>

Xiong, X., Zheng, L.-W., Ding, Y., Chen, Y.-F., Cai, Y.-W., Wang, L.-P., Huang, L., Liu, C.-C., Shao, Z.-M., & Yu, K.-D. (2025). Breast cancer: pathogenesis and treatments. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 10(1), 49. <https://doi.org/10.1038/s41392-024-02108-4>

Yang, Y., Zheng, X., Chen, L., Gong, X., Yang, H., Duan, X., & Zhu, Y. (2022). Multifunctional Gold Nanoparticles in Cancer Diagnosis and Treatment. *International Journal of Nanomedicine*, Volume 17, 2041–2067. <https://doi.org/10.2147/IJN.S355142>

Younis, M. A., Tawfeek, H. M., Abdellatif, A. A. H., Abdel-Aleem, J. A., & Harashima, H. (2022). Clinical translation of nanomedicines: Challenges, opportunities, and keys. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 181, 114083. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2021.114083>

Zafar, A., Khatoon, S., Khan, M. J., Abu, J., & Naeem, A. (2025). Advancements and limitations in traditional anti-cancer therapies: a comprehensive review of surgery, chemotherapy, radiation therapy, and hormonal therapy. *Discover Oncology*, 16(1), 607. <https://doi.org/10.1007/s12672-025-02198-8>