



UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
ESCOLA DE FARMÁCIA
Departamento de Farmácia



Fernanda Fung dos Reis

**Avaliação da biodistribuição de nanopartículas poliméricas
contendo marcador fluorescente encapsulado ou ligado
covalentemente ao polímero por via intravenosa em
camundongos**

Orientadora: Profa. Dra. Vanessa Carla
Furtado Mosqueira

Co-orientadora: Dra. Marina Guimarães
Carvalho Machado

Ouro Preto

2022

Fernanda Fung dos Reis

**Avaliação da biodistribuição de nanopartículas poliméricas
contendo marcador fluorescente encapsulado ou ligado
covalentemente ao polímero por via intravenosa em
camundongos**

Monografia apresentada como parte dos
requisitos para a obtenção do grau de Bacharel
em Farmácia ao Curso de Farmácia da
Universidade Federal de Ouro Preto.

Ouro Preto

2022



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



FOLHA DE APROVAÇÃO

Fernanda Fung dos Reis

Avaliação da biodistribuição de nanopartículas poliméricas contendo marcador fluorescente encapsulado ou ligado covalentemente ao polímero por via intravenosa em camundongos

Monografia apresentada ao Curso de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito parcial para obtenção do título de Farmacêutico

Aprovada em 23 de junho de 2022.

Membros da banca

Professora Doutora - Vanessa Carla Furtado Mosqueira - Orientadora (Universidade Federal de Ouro Preto)
Doutora - Marina Guimarães Carvalho Machado - Co-orientadora (PPG CiPharma - Universidade Federal de Ouro Preto)
Mestra - Maria Alice de Oliveira - Avaliadora (PPG CiPharma - Universidade Federal de Ouro Preto)
Doutora - Renata Tupinambá Branquinho - Avaliadora (Universidade Federal de Ouro Preto)

Professora Vanessa Carla Furtado Mosqueira - orientadora do trabalho, aprovou a versão final e autorizou seu depósito na Biblioteca Digital de Trabalhos de Conclusão de Curso da UFOP em 15/08/2022.



Documento assinado eletronicamente por **Vanessa Carla Furtado Mosqueira, PROFESSOR DE MAGISTERIO SUPERIOR**, em 15/09/2022, às 09:05, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.ufop.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0398206** e o código CRC **41C84FA7**.

Referência: Caso responda este documento, indicar expressamente o Processo nº 23109.012822/2022-44

SEI nº 0398206

R. Diogo de Vasconcelos, 122, - Bairro Pilar Ouro Preto/MG, CEP 35400-000
Telefone: (31)3559-1069 - www.ufop.br

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela oportunidade que me deu de chegar até aqui e realizar esse sonho.

Aos meus pais, Lin e Fernando, que nunca pouparam esforços para me ver feliz e realizada. Ao meu irmão, Renato, por todo apoio e incentivo nesses anos. Vocês são tudo para mim!

A toda minha família, Fung e Reis, familiares que sempre acreditaram em mim, vocês fazem parte disso. Em especial, aos meus avós Helena, Alice, Luiz e Manoel, devo muito essa conquista a vocês.

A minha amada casa, República Atena, e amigos que criei nesses últimos 5 anos. Com certeza vocês deixaram a minha vida mais feliz e esse caminho mais fácil. Obrigada por todos momentos compartilhados!

A todos professores e mestres que tive ao longo da graduação, obrigada por transmitirem tanto conhecimentos nesses anos. Viva à Gloriosa Escola de Farmácia.

A Vanessa por ter me dado a oportunidade de crescer e aprender dentro do Laboratório LDG Nano. A todos colegas do laboratório, principalmente Marina, Renata e Márcia, vocês foram fundamentais em todo conhecimento adquirido.

Sentimento de dever cumprido e gratidão. Muito obrigada a todos, que de alguma forma contribuíram para o meu crescimento acadêmico e pessoal!

RESUMO

Os tratamentos contra o câncer possuem limitações, principalmente pela falta de seletividade dos fármacos utilizados. A busca por novas alternativas para suprirem esses efeitos colaterais, levou a descoberta das ferramentas teranósticas. Estas são capazes de realizar a terapia e o monitoramento/diagnóstico da doença. Destacam-se dentro dessas ferramentas a imagem molecular e as terapias fotodinâmica e fototérmica. Neste contexto, o fotossensibilizador IR 780 vem sendo muito utilizado para estas aplicações. O seu alto rendimento quântico de fluorescência em comprimentos de onda de excitação e emissão na faixa do infravermelho próximo (NIR), entre 780-810 nm, reduz a interferência da autofluorescência dos tecidos. Além disso, tem comprovado tropismo pela mitocôndria de células tumorais. Para melhorar a dispersibilidade coloidal em fluidos biológicos, o IR 780 foi carregado por nanopartículas poliméricas. Portanto, o objetivo principal deste trabalho foi estudar a biodistribuição de nanocápsulas poliméricas contendo IR780 encapsulado fisicamente (NC IR 780) ou o polímero fluorescente IR-PLA (onde o fluoróforo IR780 está ligado covalentemente ao PLA), por via intravenosa em camundongos Balb/c. Após administração intravenosa das formulações, imagens do animal de corpo inteiro e dos órgãos retirados foram adquiridas utilizando o equipamento IVIS Lumina III (Perkin Elmer). Nessas foram comparadas a fluorescência obtida no animal mantido vivo e acompanhado durante vários tempos ao longo do experimento. IR780 livre e IR780 encapsulado nas NC tiveram um perfil muito semelhante de distribuição. O IR780 ligado covalentemente ao polímero se mostrou um tipo de marcação mais confiável para realizar o monitoramento da nanocápsula polimérica, visto que, o IR780 quando encapsulado pode ser liberado do nanocarreador ao longo do tempo, sendo assim a sua biodistribuição pode não estar associada à nanopartícula, levando a uma avaliação errônea dos nanocarreadores, além de não direcionar ao seu alvo de interesse.

Palavras chaves: Nanocápsulas poliméricas, fotosensibilizador, biodistribuição, IR780, infravermelho próximo, polímeros biodegradáveis, polímeros conjugados.

ABSTRACT

Cancer treatments have limitations, mainly due to the lack of selectivity of the drugs used. The search for new alternatives to overcome these side effects led to the discovery of theranostic tools. These are capable of carrying out therapy and monitoring/diagnosis of the disease. Among these tools, molecular imaging and photodynamic and photothermal therapies stand out. In this context, the IR 780 photosensitizer has been widely used for these applications. Its high quantum yield of fluorescence at excitation and emission wavelengths in the near infrared (NIR) range, with emission between 780-810 nm, reduces tissue autofluorescence interference. In addition to having proven tropism for the mitochondria of tumor cells. To improve colloidal dispersibility in biological fluids, IR 780 was carried by polymeric nanoparticles. Therefore, the main objective of the study was to study the biodistribution of polymeric nanocapsules containing physically encapsulated IR780 (NC IR 780) or the fluorescent polymer IR-PLA (where the fluorophore IR780 is covalently linked to PLA), intravenously in Balb/c mice. After intravenous administration of the formulations, images of the entire body of the animal and the harvested organs were acquired using the IVIS Lumina III equipment (Perkin Elmer). In these, the fluorescence obtained in the animal kept alive and monitored for several times throughout the experiment was compared. Free IR780 and NC encapsulated IR780 had a very similar distribution profile. The IR780 covalently linked to the polymer proved to be a more reliable type of labeling to carry out the monitoring of the polymeric nanocapsule, since the IR780 when encapsulated can be released from the nanocarrier over time and indicate a biodistribution not associated with the nanoparticle, leading to an erroneous assessment of nanocarriers, in addition to not directing them to their target of interest.

Keywords: Polymeric nanocapsules, photosensitizer, biodistribution, IR780, near infrared fluorescence, conjugated polymer, biodegradable polymer.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema das funções farmacocinéticas dos órgãos sobre as nanopartículas. (a) Esquema farmacocinético; (b) vias metabólicas	12
Figura 2. Representação de nanocápsulas e nanoesferas	15
Figura 3. Representação esquemática de nanocápsulas poliméricas contendo o marcador fluorescente IR780; (a) fisicamente associado ou (b) covalentemente ligado.....	16
Figura 4. Estrutura molecular do IR780.....	17
Figura 5. Esquema da aplicabilidade de nanoestruturas baseadas em IR780 para fototerapia e imagem do câncer	18
Figura 6. Efeitos dos fatores que afetam a biodistribuição e depuração de nanopartículas	21
Figura 7. Esquema de preparação de nanopartículas pelo método de nanoprecipitação	28
Figura 8. Equipamento Zetasizer Nano ZS (Malvern Instrument, UK)	29
Figura 9. Metodologia usada para a caracterização das nanocápsulas	29
Figura 10. Esquema do estudo de biodistribuição <i>in vivo</i> utilizado	30
Figura 11. Equipamento IVIS Lumina III (PerkinElmer)	31
Figura 12. Órgãos selecionados, colocados sempre na mesma ordem sobre papel de desenho preto carvão (Artagain®)	32
Figura 13. Imagens obtidas da biodistribuição do animal de corpo inteiro	35
Figura 14. Fluorescência no cérebro, coração, rins, fígado e baço, após 24 e 72h	36
Figura 15. Fluorescência no pulmão, bexiga, fêmur, músculo e pele, após 24 e 72h	38
Figura 16. Fluorescência no estômago e intestino, após 24 e 72h	39
Figura 17. Gráfico representativo da a biodistribuição das diferentes nanocápsulas e IR780 livre nos órgãos excisados em 24 e 72h	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características química do IR780 17

Tabela 2. Diferentes estudos de biodistribuição em modelos tumorais murinos utilizando o IR780 encapsulado a diferentes nanocarreadores, todos administrados por via intravenosa caudal 23

Tabela 3. Tamanho médio, índice de polidispersão e potencial zeta das nanocápsulas 33

LISTA DE ABREVIACÕES

Dh - Diâmetro hidrodinâmico

DLS - Dispersão dinâmica de Luz

DP - Desvio padrão

EPR - Efeito de permeabilidade e retenção aumentada

FDA - Food and Drug Administration

ICG - Indocianina verde

IR780 - Iodeto de 2-[2-[2-Cloro-3-[(1,3-di-hidro-3,3-dimetil-1-propil-2H-indol-2-ilideno)etilideno]-1-ciclo-hexen-1-il]etenilo]-3,3-dimetil-1-propilindolio

IR-PLA - IR780 ligado covalentemente ao polilactídeo

NC - Nanocápsulas

NIR - Infravermelho próximo

NLC - nanocápsula lipídica

NPs - Nanopartículas

OP - Imagem óptica

PBS - Tampão fosfato salino

PdI - Índice de Polidispersão

PDT - Terapia fotodinâmica

PEG – Polietileno glicol

PET - Tomografia por emissão de pósitrons

PLA – Polilactídeo ou ácido poli(láctico)

PLA-*b*-PEG - Poli(D,L-láctico)-bloco-polietilenoglicol

PLGA - Ácido poli(láctico-*co*- glicólico)

PTT - Terapia fototérmica

RM - Ressonância Magnética

SFM - Sistema fagocitário mononuclear

SPECT - Tomografia computadorizada por emissão de fóton único

SRE – Sistema retículo endotelial

TC - Tomografia computadorizada

US - Ultrassom

λ - Comprimento de onda

ζ – Potencial Zeta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. REFERENCIAL TEÓRICO	13
2.1 Câncer	13
2.2 Tratamentos oncológicos e diagnóstico	13
2.3 Nanopartículas: avanço tecnológico	14
2.4 IR780	16
2.5 IR780: Terapia Fotodinâmica (PDT) e Terapia Fototérmica (PTT)	18
2.6 Fatores que afetam a biodistribuição de nanopartículas	19
2.7 Técnicas para determinação da biodistribuição <i>in vivo</i>	21
2.8 Estudos de biodistribuição contendo IR780	22
3. JUSTIFICATIVA	25
4. OBJETIVOS	26
4.1 Objetivo Geral	26
4.2 Objetivos Específicos	26
5. MATERIAIS E MÉTODOS	27
5.1 Materiais	27
5.2 Preparo das nanocápsulas	27
5.3 Caracterização das nanocápsulas	28
5.4 Estudo de biodistribuição <i>in vivo</i>	29
5.5 Análise de dados	32
6. RESULTADOS E DISCUSSÕES	33
6.1 Preparo e caracterização das nanocápsulas	33
6.2 Biodistribuição	35
7. CONCLUSÃO	42
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43

1. INTRODUÇÃO

Segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA): “Câncer é o nome dado a um conjunto de doenças (mais de 100) que tem em comum o crescimento desordenado de células que invadem tecidos e órgãos. Esse crescimento tem como característica marcante ser agressivo e incontrolável, ocasionando tumores que podem se espalhar pelo restante do corpo” (INCA, 2020). Em 2018, no Brasil, foram registradas 224.712 mortes por câncer. Entre as mulheres, o câncer de mama é o que mais ocasiona a morte (INCA, 2020).

Os tratamentos disponíveis contra o câncer atualmente incluem cirurgia, radioterapia e terapias baseadas em pequenas moléculas, como quimioterapia e terapia hormonal. Entretanto, a utilidade da quimioterapia é comprometida pela toxicidade dos fármacos, falta de seletividade e resistência dos tumores aos ativos, os quais levaram ao desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas (Rwei *et al.*, 2015).

Visando o sucesso no tratamento contra o câncer, ferramentas teranósticas chamam a atenção. Estas ferramentas permitem o monitoramento da administração de fármacos em tempo real, sendo ao mesmo tempo uma técnica de diagnóstico (Mallakpour e Behranvand, 2016). Como exemplo dessas terapias teranósticas, temos a terapia fototérmica (PTT) e terapia fotodinâmica (PDT). Estas utilizam fotossensibilizadores para gerar oxigênio singlete e/ou causar hipertermia, sob irradiações em determinado comprimento de onda (Melamed *et al.*, 2015). É utilizado, preferencialmente, o intervalo entre 700 – 1000 nm, chamado de região espectral do infravermelho próximo (NIR). Uma vez que neste intervalo as interações com outros componentes biológicos são mínimas e a luz possui maior capacidade de penetração no tecido (de Melo-Diogo *et al.*, 2017).

O IR780 é um fotossensibilizador lipofílico, que vem sendo estudado para aplicação como teranóstico devido à sua versatilidade, principalmente por ter afinidade por células tumorais (Yi *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2014). Sua fluorescência é emitida com alta intensidade na faixa de comprimento de onda do NIR, onde a interferência da autofluorescência dos tecidos é muito reduzida, permitindo com maior precisão o acompanhamento de tumores em estudos de imagem, bem como no diagnóstico em pequenos animais *in vivo* (Yue *et al.*, 2013; Kuang *et al.*, 2017). Entretanto, esse fluoróforo lipofílico, é excretado rapidamente e possui toxicidade alta (Jiang *et al.*, 2015;

Yuan *et al.*, 2015). Para suprir essas limitações, o IR780 vem sendo associado à diferentes tipos de nanoestruturas, afim de melhorar sua dispersibilidade em fluidos biológicos, prolongar o tempo de residência no plasma e tecidos e aumentar a seletividade pelas células cancerosas (Peng *et al.*, 2011; Jiang *et al.*, 2015; Pais-Silva *et al.*, 2017, Machado *et al.*, 2019, 2022).

Tem-se dado uma maior importância para as nanopartículas produzidas a partir de polímeros solúveis, por exemplo, polietilenoglicol (PEG). Por ser extremamente hidrofílico, elas são eficientes para escapar do sistema fagocitário e, além disso elas são facilmente produzidos. As nanopartículas de polilactídeo (PLA) contendo fármacos antitumorais têm sido usadas com frequência na terapia do câncer por ser facilmente degradado e metabolizado pelo organismo (Yang *et al.*, 2011).

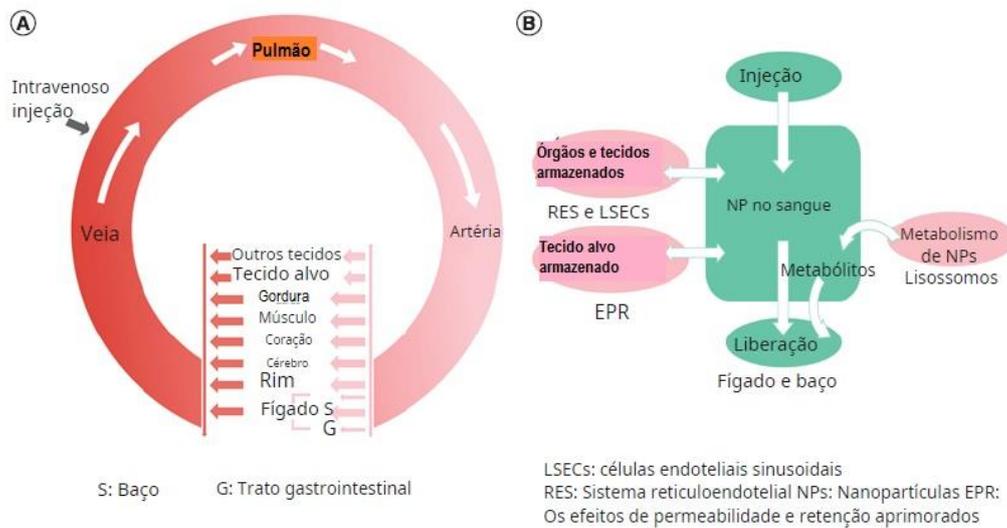
Estudos feitos por Machado e colaboradores (2020), compararam o uso do IR780 ligado covalentemente ao polímero com IR780 associado fisicamente às nanocápsulas em ensaios *in vitro*, utilizando a célula J774. No caso do encapsulado, o IR780 foi liberado das NCs por meio de um mecanismo mediado por proteínas séricas e o fotossensibilizador se acumulou nas células. Entretanto, na NC contendo o IR780 ligado ao polímero PLA, o IR780 continuou preso às NCs mesmo na presença de células e proteínas séricas, resultando em níveis mais baixos de captação celular. Foi demonstrada a importância da ligação covalente do fluóforo ao polímero, para termos um rastreamento confiável de nanocarreadores poliméricos em estudos de interação com células (Machado *et al.*, 2021, 2022).

O estudo da biodistribuição *in vivo* das nanocápsulas poliméricas é de extrema importância para definir a eficiência terapêutica e os potenciais efeitos colaterais. Nos últimos anos a nanotecnologia vem crescendo como uma alternativa para modificar a biodistribuição de candidatos à fármacos, principalmente em terapias oncológicas, onde os estudos se encontram mais avançados.

A via de administração escolhida para estudar a biodistribuição neste trabalho foi a intravenosa. Uma vez que esta via favorece que as nanocápsulas consigam atingir o corpo do animal de forma generalizada, sendo transportados juntamente com a circulação sistêmica. As NC entram pelas veias venosas, passam pelos pulmões e por fim, através do fluxo arterial chegam aos outros órgãos. Cada órgão terá uma interação específica com as nanocápsulas, podendo ser armazenadas e liberadas, metabolizadas ou eliminadas (figura 1).

Figura 1. Esquema das funções farmacocinéticas dos órgãos sobre as nanopartículas.

(a) Esquema farmacocinético; (b) vias metabólicas.



Fonte: Wei *et al.*, 2018

No presente trabalho foi realizado um estudo de biodistribuição de nanopartículas poliméricas contendo o fotossensibilizador fluorescente IR780 desenvolvidas previamente no nosso grupo (Machado *et al.*, 2021). Foram preparadas duas formulações. Uma com o IR780 encapsulado fisicamente (NC IR70) e outra com o IR780 ligado covalentemente ao polímero PLA (NC IR-PLA), para realizar a comparação entre elas, analisando quais seriam as vantagens de ter o IR 780 associado ao polímero de forma covalente. Assim, foram realizados ensaios *in vivo* com camundongos fêmeas Balb/C e a comparação feita através de imagens e gráficos.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Câncer

O câncer é um grande problema de saúde pública no mundo, atingindo todas as classes socioeconômicas. É caracterizado por um crescimento desordenado de células que podem invadir tecidos e órgãos. Sua rápida multiplicação faz com que essas células se tornem agressivas e incontroláveis, determinando a formação de tumores que podem se espalhar pelo corpo. Seu desenvolvimento é de forma silenciosa, de difícil visualização e engloba mecanismos fisiológicos complexos (INCA, 2020).

Os diferentes tipos de cânceres são determinados de acordo com o tecido que se originam, por exemplo: quando se originam de tecidos epiteliais, são denominados carcinomas e quando se originam de tecidos conjuntivos, são denominados sarcomas. Há também outras características para a diferenciação, como a velocidade de multiplicação das células e a capacidade de invadir tecidos e órgãos vizinhos ou distantes, chamada de metástase.

A estimativa mais recente feita pelo INCA, no ano 2018, aponta que ocorreram no mundo 18 milhões de casos novos de câncer e 9,6 milhões de óbitos. Sendo que o câncer de mama é disparadamente aquele que tem maior incidência entre as mulheres (24,2%).

2.2 Tratamentos oncológicos e diagnóstico

O tratamento do câncer requer muita atenção de uma equipe multiprofissional, altamente especializada, utiliza uma tecnologia sofisticada e de alto custo. Ele pode provocar incapacidades, exigir internação e acompanhamento ambulatorial frequente e isso torna o custo elevado (INCA, 2018).

Existem várias modalidades de tratamento, como cirurgia, hormonioterapia, radioterapia e quimioterapia alvo específica ou pela combinação de duas ou mais terapias (INCA, 2008). Os fármacos antineoplásicos apresentam limitações devido à sua elevada incidência de citotoxicidade, devido à baixa seletividade do fármaco contra as células tumorais. Ocasionalmente assim, efeitos colaterais que podem matar células de órgãos e

tecidos saudáveis, justamente por não serem específicos (Tanaka et al., 2009; Vinogradov; Wei, 2012).

Os procedimentos para o realizar o diagnóstico de células malignas têm como limitações a falta de sensibilidade e seletividade, além de permitir um possível prejuízo radioativo. Dentro destas técnicas estão inclusas: ressonância magnética, tomografia computadorizada, radiografia e ultrassonografia (Luo *et al.*, 2011).

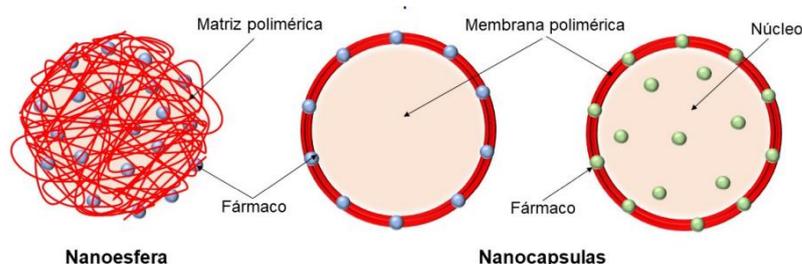
Como uma alternativa para evitar esses efeitos colaterais, a nanotecnologia vem crescendo bastante, principalmente no que diz a respeito ao desenvolvimento de nanocarreadores aplicáveis ao teranóstico do câncer. Essa vantagem acontece, pois nanocarreadores podem carrear fármacos específicos para o tratamento de doença e diagnóstico (Banik, Fattahi, Brown, 2016). Pesquisas feitas por Zou e colaboradores (2016) constatou uma evolução nos últimos anos na área de imagem molecular e diagnóstico, por exemplo, utilizando a fluorescência no infravermelho próximo (NIR).

2.3 Nanopartículas: avanço tecnológico

A nanotecnologia nos últimos anos vem atraindo bastante a comunidade científica, o setor tecnológico e a mídia. O interesse científico se deve às características físicas e químicas particulares das nanopartículas, as quais são muito vantajosas quando comparadas aos materiais macroscópicos para algumas aplicações, como a administração de fármacos. A sua principal promessa é na área biomédica, pois essas nanopartículas (NP) apresentam tamanhos comparáveis aos de entidades biológicas, como células, vírus, moléculas, proteínas e até mesmo genes, as tornando adequadas para alcançar os alvos terapêuticos (Silva, 2013).

Nanopartículas poliméricas são materiais com tamanho reduzido, que podem ser classificadas como: nanocápsulas ou nanoesferas. As nanocápsulas possuem um invólucro constituído de polímero disposto em torno de um núcleo oleoso, diferentemente das nanoesferas, que são constituídas pelo material polimérico matricial, conforme representado na figura 3 (Souto *et al.*, 2012).

Figura 2. Representação de nanocápsulas e nanoesferas.



Fonte: (Luiz, 2018).

Um das vantagens das NPs, é que elas podem ser modificadas, ou funcionalizadas em sua superfície com moléculas orgânicas, vitaminas, antibióticos, peptídeos ou recobrimento polimérico com a intenção de alterar suas propriedades físicas, podendo ser usadas em aplicações terapêuticas ou diagnósticas (Silva, 2013)

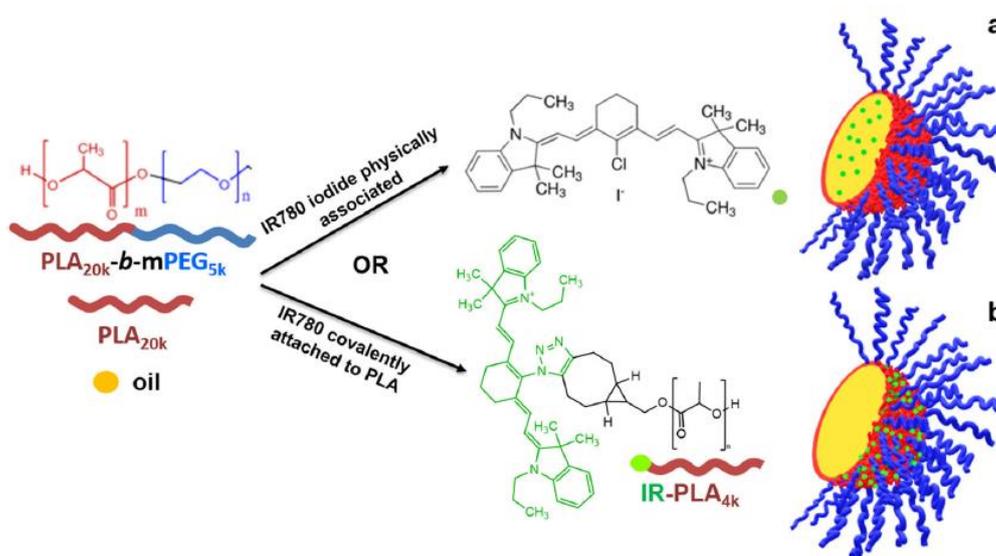
A utilização dos poliésteres, ácido polilactico (PLA) e ácido lático-co-ácido glicólico (PLGA) foi um grande avanço para a nanotecnologia depois que eles foram aprovados para uso em humanos pela *Food and Drug Administration* (FDA) (Thakor; Gambhir, 2013). O polilactídeo (PLA) é facilmente degradado e metabolizado pelo organismo. O PLA é um dos biomateriais mais utilizados devido à sua biodisponibilidade, encapsulamento melhorado, controle de liberação e propriedades cito e biocompatíveis, favorecem a qualidade terapêutica dos agentes encapsulados em nanopartículas coloidais (Kumari, *et al.*, 2010; Grossen *et al.* 2017).

A copolimerização do PLA com polímeros hidrofílicos como o PEG, gerando polímeros autoagregáveis e anfílicos foi uma estratégia que resultou no aumento do tempo de retenção das nanopartículas no organismo (Neckel; Lemos-Senna, 2005). (Thakor; Gambhir, 2013). As nanopartículas a base polímeros anfílicos biodegradáveis como o poli(D,L-láctico)-bloco-polietilenoglicol (PLA-PEG) têm se mostrado promissores nanocarreadores de substâncias. O PEG retarda a adsorção das proteínas à superfície das nanopartículas, conferindo estabilidade físico-química durante o armazenamento e nos fluidos biológicos. A ausência deste polímero causa a fácil retenção pelo sistema de defesa. (Mosqueira *et al.*, 2001; Sharma; Badyal; Gupta, 2005).

Em trabalho recente do nosso grupo pesquisa, o polímero PLA foi modificado quimicamente afim de ligar covalentemente o fotossensibilizador IR 780. Essa síntese química foi proposta com o intuito de evitar que o fotossensibilizador se desprenda da nanopartículas. Assim, o IR 780 foi derivatizado e conjugado (ligado covalentemente) ao

polímero PLA por meio da reação de multicomponente de cicloadição azida-alcino promovida pela tensão de ciclo (Machado et al., 2020). Machado e colaboradores (2020) utilizaram o IR 780 associado de duas maneiras à nanocápsulas. Na primeira maneira, representado pela figura 2A, ele foi apenas encapsulado fisicamente ao núcleo oleoso. Enquanto na figura 2B, foi utilizado o polímero modificado, contendo o IR780 ligado covalentemente (PLA-IR780).

Figura 3. Representação esquemática de nanocápsulas poliméricas contendo o marcador fluorescente IR780; (a) fisicamente associado ou (b) covalentemente ligado.



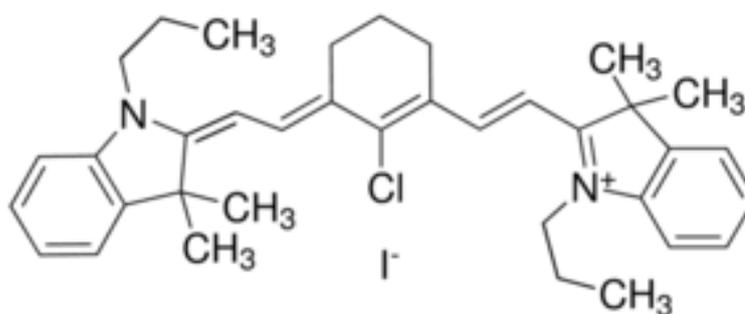
Fonte: Machado *et al.*, 2020.

2.4 IR780

O iodeto de 2-[2-[2-Cloro-3-[(1,3-di-hidro-3,3-dimetil-1-propil-2H-indol-2-ilideno)etilideno]-1-ciclo-hexen-1-il]etenilo]-3,3-dimetil-1-propilindolio (IR780) é um fotosensibilizador catiônico derivado heptametina, muito lipofílico ($\log P=6,62$). Ele apresenta boa intensidade de fluorescência e maior fotoestabilidade do que a indocianina verde (ICG), que é solúvel em água e aprovada para uso pela FDA, ambos fluoróforos no NIR. O ICG tem como desvantagem sua rápida eliminação, sendo inviável para rastreamento de tumor devido ao seu curto tempo de residência que prejudica os experimentos para imagens (Yeh *et al.*, 2013).

Um anel ciclohexenil rígido na cadeia da heptametina com um átomo de cloro central presente no IR780, mantém a fotoestabilidade, aumenta o rendimento quântico, diminui o fotobranqueamento e reduz a agregação em solução aquosa, quando comparado ao ICG (W. She *et al.*, 2013). Seu pico de absorção é de 780nm, e está dentro da faixa do NIR garantindo emissão nos comprimentos de onda no infravermelho próximo. O interessante é que o IR780 se acumula nas mitocôndrias de células tumorais, (Conceição *et al.* 2013, Jiang *et al.*, 2015). Sua estrutura química está mostrada na figura 4.

Figura 4. Estrutura molecular do IR780.



Fonte: Sigma-Aldrich

Tabela 1. Características químicas do IR780.

Log P calculado	6,62
Composição	C:64,8% H:6,6% Cl:5,5% I: 19% N:4,2%
Fórmula molecular	C ₃₆ H ₄₄ ClN ₂ .I
Massa Molecular	667,105443

Fonte: BIOVIA Draw

Algumas desvantagens do IR780 como sua lipofilia muito alta e meia-vida curta, limitam suas aplicações clínicas (Yue *et al.*, 2013) (Yang *et al.*, 2020).

Por isso, estão sendo estudados métodos para suprirem essas desvantagens, e um deles é o encapsulamento da molécula em nanoestruturas poliméricas para que o IR 780 seja utilizado como um fotosensibilizador. Alves e colaboradores (2018), apresentam uma revisão sobre vários nanocarreadores contendo IR780, com melhoria da aplicação do IR780 em terapias fototérmicas, fotodinâmicas e em estudos de imagens, melhorando sua dispersibilidade, permanência na circulação sanguínea e, conseqüentemente, implicando em um maior acúmulo em tecidos tumorais.

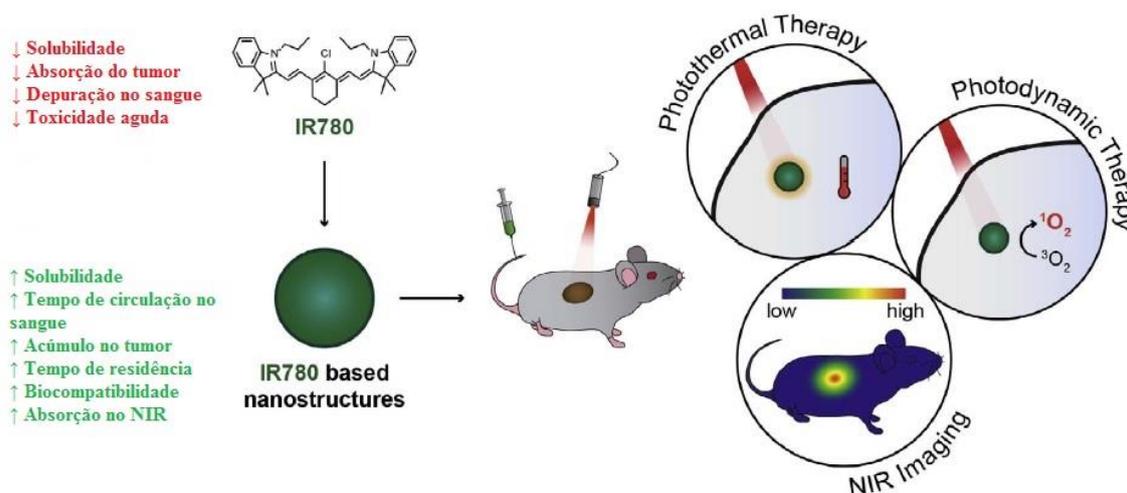
2.5 IR780: Terapia Fotodinâmica (PDT) e Terapia Fototérmica (PTT)

Quando o fotossensibilizador IR780 carregado por nanoestruturas chegam ao tecido tumoral alvo, pode ser induzida uma hipertermia e/ou produção de oxigênio singlete por meio de iluminação à laser no comprimento de onda específico de 808 nm (Li et al., 2017; Pais-Silva et al., 2017; Yuan *et al.*, 2015).

O aumento da temperatura, por meio da geração de calor ao absorver a luz, causa danos irreparáveis às células (PTT), levando à morte celular por meio da necrose (de Melo-Diogo et al., 2017b). A viabilidade celular também pode ser afetada pelo oxigênio singlete formado após a incidência do laser (PDT), devido à oxidação de diversos constituintes celulares, como proteínas, lipídeos ou DNA (Castano et al., 2004). A esquematização da Terapia Fototérmica e Fotodinâmica, são mostradas na figura 5.

Há um grande benefício na propriedade fototérmica quando o IR780 é encapsulado em nanoestruturas. Li e colaboradores (2017), compararam os efeitos fototérmicos do IR780 livre e encapsulado, e relataram que o encapsulamento em carreador lipídico (NLC) levou a uma maior eficiência na produção de calor quando exposta à irradiação, causando um maior efeito citotóxico.

Figura 5. Esquema da aplicabilidade de nanoestruturas baseadas em IR780 para fototerapia e imagem do câncer.



Fonte: Adaptado de Alves *et al.*, 2018.

2.6 Fatores que afetam a biodistribuição de nanopartículas

O estudo de biodistribuição de nanopartículas permite a obtenção de informações a respeito dos locais de acumulação destas dentro do organismo, tempo de permanência e suas possíveis interações com órgãos, tecidos e células (Garcia, 2005; Chouly *et al.*, 1996).

Quando falamos de nanopartículas, o foco da biodistribuição e da depuração se baseia em quatro principais fatores que causam as interações com o ambiente fisiológico: tamanho, forma, biodegradação e modificação da superfície (Wei, *et al.*, 2018).

O tamanho é o primeiro parâmetro para realizar as adequações necessárias para o carregamento do fármaco e direcionar o tratamento. É necessário que o tamanho das NPs seja otimizado, pois a eliminação precoce de nanopartículas pode diminuir sua eficiência, embora um tempo prolongado de residência no organismo pode levar ao aumento da toxicidade (Wei, *et al.*, 2018). A morfologia contínua do endotélio dos vasos sanguíneos permite apenas a passagem de pequenas moléculas (<3 nm de tamanho), é o caso dos capilares musculares. Enquanto os endotélios fenestrados e descontínuos possuem um espaço poroso maior, possibilitando o extravasamento de nanopartículas com diâmetro hidrodinâmico (D_h) maior nos tecidos supridos por esses vasos sanguíneos (Choi *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2010). O endotélio fenestrado é encontrado nos órgãos que fazem parte do sistema fagocitário mononuclear (SFM), que são o fígado, o baço e a medula óssea (Henrikson *et al.*, Schnitzer *et al.*, 2011). O endotélio fica mais permeável também onde há inflamação e tumores. Nos tumores há naturalmente a acumulação de células de defesa e de NP de maior tamanho, devido à forma e arquitetura anormais dos vasos e a uma drenagem linfática menos eficiente (Perrault, *et al.*, 2009). Portanto, ocorre uma maior permeabilidade e retenção dessas nanopartículas nesses tecidos. Este mecanismo é chamado de efeito de permeabilidade e retenção aumentados, “enhanced permeation and retention effect” (EPR).

Estudo feito por Wei e colaboradores (2018), definiu que o tamanho entre 100 e 200 nm é o ideal para que a nanopartículas não fossem captadas pelo sistema fagocítico mononuclear, conseqüentemente tendo uma circulação mais prolongada. Este estudo foi baseado apenas no tamanho da NP, não levando em conta outros possíveis fatores de depuração.

Quanto à forma, a esférica é preferível, pois possui um menor número de dimensões e é mais fácil para sintetizar (Truong, *et al.*, 2015).

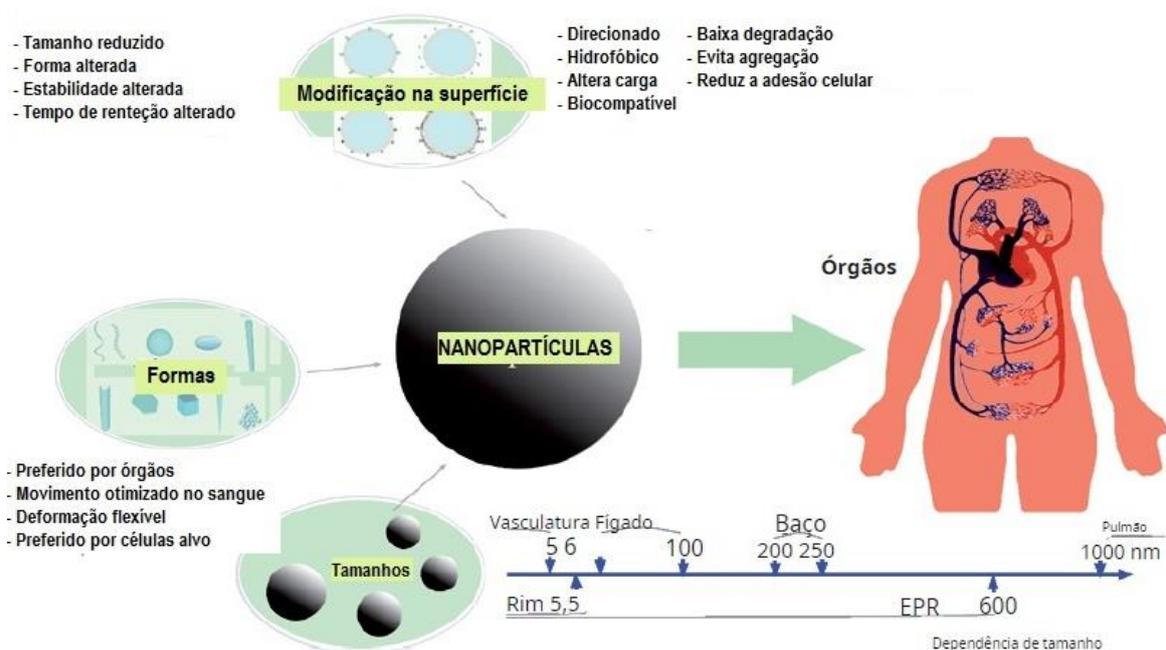
Outro fator determinante na biodistribuição de nanopartículas é a adsorção de proteínas que pode ocorrer nas nanopartículas enquanto estão circulando na corrente sanguínea. Karmali e colaboradores (2011), sugerem que a adsorção é dependente do tamanho, curvatura, hidrofobicidade e carga superficial das nanopartículas. As NP são passíveis de alterações em suas propriedades físico-químicas quando as proteínas ficam aderidas à sua superfície, podendo aumentar o seu diâmetro hidrodinâmico, alterar sua carga superficial ou facilitar sua agregação. Além disso, as proteínas específicas que são capazes adsorver em uma nanopartícula, podem determinar os tipos de células que irão absorver as nanopartículas (Karmila, 2011; Aggarwal *et al.*, 2009; Dobrovolskala *et al.*, 2009).

A adsorção de proteínas do complemento ou anticorpos nas nanopartículas inicia uma resposta imune em cascata do complemento desencadeando a fagocitose pelos macrófagos e atraindo um número ainda maior de macrófagos (Guyton *et al.*, 2017; Dobrovolskala *et al.*, 2008). Além disso, os macrófagos são capazes de secretar moléculas de sinalização, citocinas ao serem captados por nanopartículas, dando estímulo a uma resposta imune sistêmica (Dobrovolskala *et al.*, 2009) podendo levar à rápida eliminação das NP. Por isso, a adição de PEG à nanoestrutura criar uma corona hidrofílica entorno da NP, que impede a opsonização e retarda o reconhecimento pelo sistema imune, prolongando o tempo de circulação sanguínea (Lesniak *et al.*, 2012; Saha *et al.*, 2016; Yang *et al.*, 2009). Com isso, a “PEGuilação” pode aumentar o tempo de meio vida sanguínea permitindo a acumulação da nanopartícula em tecidos tumorais pelo efeito de permeabilidade e retenção aumentadas (EPR) (Han *et al.*; 2016).

A modificação da superfície do nanocarreador, inclui também estudos mais recentes e promissores que é a adição de ligantes moleculares que servem para aprimorar o direcionamento ao órgão alvo ou para aumentar o tempo de circulação sanguínea das nanopartículas no organismo. Albumina e ácido fólico são exemplos de ligantes que vem sendo eficientes (Yue *et al.*, 2013; Alves *et al.*, 2020)

Na figura 6, podemos ver esquematicamente uma forma resumida dos fatores que afetam a biodistribuição de nanopartículas.

Figura 6. Efeito dos fatores que afetam a biodistribuição e depuração de nanopartículas.



Fonte: Adaptado de Wei, *et al.*, 2018.

2.7 Técnicas para determinação da biodistribuição *in vivo*

Os estudos de imagens *in vivo* são utilizados para o diagnóstico médico e monitoramento de tratamentos. Existem dois tipos, as imagens anatômicas são mais limitadas, enquanto as moleculares são destinadas a terapia personalizada, e devido a sua melhor especificidade, seu diagnóstico é mais precoce (Walia, 2016). O monitoramento por imagens é um método não invasivo, que é definido como a representação visual e quantificação dos processos de função biológica no nível celular, mantendo o organismo intacto. Existem vários métodos de imagens que são utilizados para diagnóstico e monitoramento, como por exemplo, imagem por ultrassom (US), ressonância magnética (RM), imagem óptica (OP) e tomografia computadorizada (TC) (Kastelik-Hryniewiecka, *et al.*, 2022). Por isso, o uso de equipamentos de imagem que permitam monitorar o animal vivo em tempo real, se mostram mais vantajosos. Alguns exemplos de técnicas são descritos abaixo.

A técnica de ressonância magnética tem como vantagem a alta resolução espacial, informações anatômicas e funcionais e possibilita a visualização em tecidos moles (Kastelik-Hryniewiecka, *et al.*, 2022). O ultrassom é um método interessante por ter um baixo custo e não utilizar nenhum tipo de radiação (Ma, *et al.*, 2020). Além desses métodos, existem também as imagens nucleares, estas podem ser obtidas por meio da

tomografia computadorizada por emissão de fóton único (SPECT) e tomografia por emissão de pósitrons (PET) (Livieratos, 2012).

Neste trabalho foi utilizada a técnica de imagem óptica. Esta se baseia na detecção de comprimentos de ondas na região do infravermelho próximo que emitem fluorescência, emitidos por moléculas específicas no corpo. A fluorescência acontece quando a molécula absorve a luz do infravermelho, em seu comprimento de onda específico, e atinge seu estado de excitação, dissipando parte dessa energia na forma de luz com comprimento de onda maior. Portanto, esta técnica é de grande relevância para estudos de imagem *in vivo* (Yuan, *et al.*, 2013).

Tem como vantagem ser uma técnica não invasiva, não ionizante e de alta sensibilidade. A luz de fluorescência do infravermelho próximo (NIR), vem sendo utilizada na clínica em comprimentos de onda elevados (600-900 nm). Esta luz é vantajosa em relação à luz visível por ter penetração tecidual profunda e comprimento de onda bem diferente evitando a interferência da autofluorescência de tecidos. A técnica do NIR é uma das mais promissoras por realizar o rastreamento em tempo real de detecção e liberação de fluoróforos, que são aplicáveis a vários tipos de situações no tratamento e no diagnóstico (Walia, 2016).

2.8 Estudos de biodistribuição contendo IR780

Em 2018, Uthaman e seus colaboradores, realizaram estudos com micelas à base de ácido hialurônico carregadas com IR780, utilizando a linhagem celular TC-1 para induzir o tumor, que é derivada de células epiteliais pulmonares primárias de camundongos. Yue, em 2013, juntamente com seu grupo de estudo, desenvolveram nanopartículas funcionais de ácido heparino-fólico que carregavam o IR780. O preparo ocorreu pelo método ultrassônico, a linhagem celular utilizada foi a MCF-7, adenocarcinoma metastático de mama.

Em 2015, Yuan e colaboradores modificaram um lado do IR780 com PEG e do outro lado estenderam a cadeia carbônica hidrofóbica de C3 para C16. Wang *et al* (2016) preparou nanopartículas com transferrina por um método denominado “molecular switch” para carrear o IR780. Os dois últimos artigos citados acima, utilizaram o mesmo modelo tumoral de CT26 (células cancerígenas do cólon de camundongo).

Comparando estes quatro estudos, todos eles apresentaram resultados semelhantes entre si. Apesar das nanopartículas terem sido preparadas de maneiras

distintas, em todos eles as NP demonstraram serem eficientes para o direcionamento do IR780 para o tumor. Além disso, os órgãos que tiveram maior fluorescência depois do tecido tumoral, foram o fígado e o pulmão, conforme mostrado na tabela 2.

Tabela 2. Diferentes estudos de biodistribuição em modelos tumorais murinos utilizando o IR780 encapsulado a diferentes nanocarreadores, todos administrados por via intravenosa caudal.

Tipo de nanoestrutura	Concentração de IR780 (mg/kg peso corporal)	Modelo tumoral	Órgãos > acumulação*	Tempo de estudo	Referência
HA-IR 780 micelas	10 mg/kg (1mg/kg)	TC-1	Fígado	24h	Uthaman, et al. (2018)
HF-IR-780 NPs	0,7 mg /kg IR780 equivalente	MCF-7	Fígado e pulmões	72h	Yue et al, (2013)
PEG-IR780-C13 micelas	1 mg/ kg IR780	CT26	Fígado	72h	Yuan et al. (2015)
TF-IR780 NPS	0,3 mg/ kg IR780	CT26	Fígado	72h	Wang et al. (2016)

* órgão em que houve maior fluorescência depois do tumor que foi induzido, em todos os estudos foi o tumor quem teve a maior fluorescência.

Em 2017, Li e colaboradores comprovaram um melhor direcionamento do IR780 em direção ao tumor quando este está encapsulado, através do sistema de imagem no infravermelho próximo (NIR), além disso, a inclusão nos nanossistemas resultou em aumento da sua fluorescência.

Estes estudos de biodistribuição demonstraram que o IR780 carregado por nanopartículas tem ótimo potencial para aplicações teranósticas em câncer, devido à sua capacidade de acumulação em organelas de células tumorais, boas propriedades fotofísicas na faixa do NIR e multimodalidade de ação (fototérmico, fotodinâmico e agente de imagem). As limitações do IR780 como: baixa solubilidade em água, rápida depuração, toxicidade aguda e captação insuficiente do tumor, foram superadas com sua utilização veiculados em nanocarreadores. Podendo ser utilizados como um sistema de

diagnóstico eficaz para tumores em pequenos animais *in vivo*, através da terapia medicamentosa guiada por imagem e em PDT e PTT.

3. JUSTIFICATIVA

O câncer é uma doença temida por milhões de pessoas. Entretanto, o tratamento, diagnóstico e prevenção ainda são desafiadores para a ciência. A principal limitação para os tratamentos é a falta de seletividade, fazendo com que o fármaco atue não somente contra células tumorais como também em células saudáveis, levando o paciente a diversos efeitos colaterais, dificultando sua adesão ao tratamento.

Como novas ferramentas para serem aplicadas ao diagnóstico e tratamento do câncer, o uso de moléculas fluorescente vem sendo importantes por meio da terapia fotodinâmica (PDT) e terapia fototérmica (PTT), além do monitoramento molecular, principalmente no infravermelho próximo (NIR). Neste contexto, o fotossensibilizador IR780 é utilizado em diversas pesquisas como uma molécula funcional para estas aplicações.

Em uma busca realizada na base de dados do SCOPUS (Elsevier) utilizando a palavra chave “IR780” foram encontrados 450 artigos publicados. Acrescentando a palavra “nanoparticle” foram encontrados 347 artigos publicados e ainda adicionando a palavra “biodistribution” sendo encontrados apenas 86 artigos desde o ano de 2013 até o atual. Incluindo o termo “polymeric” o número de artigos é reduzido para 61 e ainda o termo “theranostic” resulta em 45 artigos, o que demonstra o interesse pelo uso desta molécula.

Estudos recentes do nosso grupo, já avaliaram *in vitro* a diferença entre o IR780 encapsulado fisicamente com o IR780 ligado covalentemente ao polímero em nanocápsulas. Sendo assim, o foco principal desta pesquisa, foi avaliar a biodistribuição dessas associações distintas *in vivo*, em animais são para que sejam utilizadas como uma nova ferramenta teranóstica pré-clínica em futuros estudos envolvendo animais com tumor.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Avaliar comparativamente a biodistribuição em camundongos Balb/c sãos, de nanocápsulas poliméricas contendo polímero conjugado ao IR780 por ligação covalente, ou contendo o IR780 fisicamente encapsulado e o IR780 livre administrados por via intravenosa

4.2 Objetivos Específicos

- Preparar nanocápsulas poliméricas contendo IR780 ligado ao polímero (IR-PLA NC) ou encapsulado (IR780-NC), conforme já descrito por Machado *et al.*, 2020;
- Caracterizar as nanopartículas quanto ao tamanho, potencial zeta e índice de polidispersão (PDI);
- Acompanhar a biodistribuição *in vivo* das nanopartículas fluorescentes em camundongos saudáveis ao longo de 72 horas por técnica de imagem *in vivo*;
- Determinar a fluorescência média em cada órgão dos camundongos após necrópsia;
- Analisar os dados estatisticamente para comparar o efeito da ligação covalente do IR780 ao polímero que compõe a nanopartícula na biodistribuição.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Materiais

- Copolímeros em bloco Poli(D,L-láctico)-bloco-polietilenoglicol (PEG_{5k}-PLA_{20k}, Mn 22,200 g/mol, \bar{D} 1.38) (Pound-Lana *et al.*, 2017) e polilactídeo covalentemente ligado ao IR780 (IR-PLA, Mn: 4000 g/mol; \bar{D} : 1,26) (de Oliveira *et al.*, 2019) sintetizados em nosso laboratório;
- Triglicerídeos de cadeia média Miglyol®812N (Sasol);
- Lecitina de soja a 75% (Lipoid®S75, Lipoid);
- IR780 (2-[2-[2-chloro-3-[(1,3-dihydro-3,3-dimethyl-1-propyl-2H-indol-2-ylidene)ethylidene]-1-cyclohexen-1-yl]ethenyl]-3,3-dimethyl-1-propylindolium iodide, (Sigma Aldrich, 98%);
- Acetona PA (Vetec);
- Acetonitrila (LiChrosolv®);
- Água Ultrapura (Equipamento Symplicity 185 de Purificação de Água-MilliQ);
- Isoflurano (1ml/ml) (Cristália)
- Ketamina 10% (Syntec) e Xilazina 2% (Syntec)

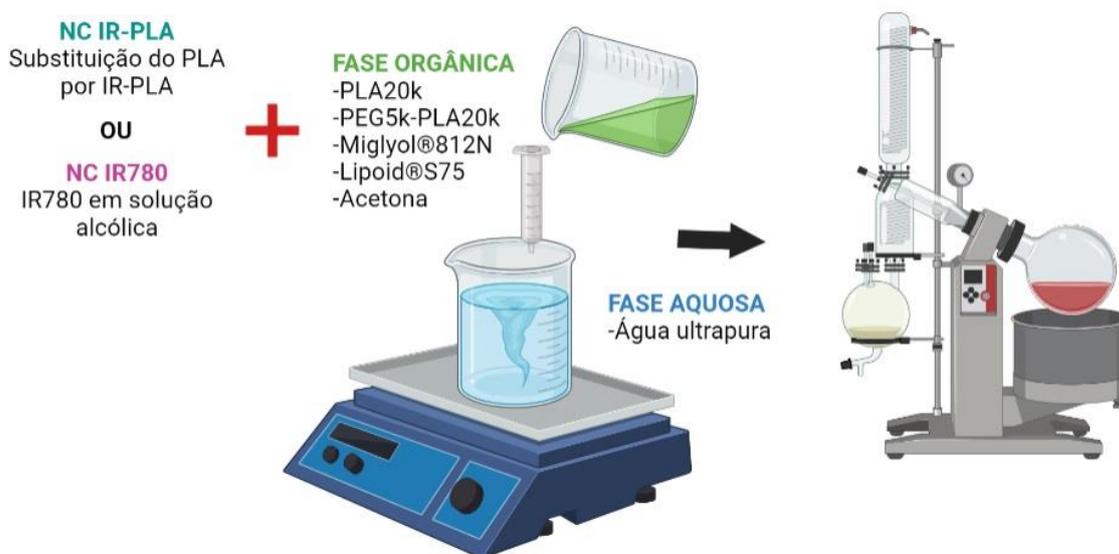
5.2 Preparo das nanocápsulas

As nanocápsulas (NC) foram preparadas pelo método de nanoprecipitação, também chamado de deposição interfacial de polímero pré-formado (FESSI *et al.*, 1989). Foram preparadas também NC brancas (ou seja, sem o IR 780) para comparar com as demais nanocápsulas.

Para o preparar as nanocápsulas (NC), os polímeros PLA-PEG (20 mg) e PLA (5 mg) foram dissolvidos em 8 mL de acetona, juntamente a 15 mg de Lipoid S75, sob agitação a 40°C. Após a completa dissolução dos constituintes, foi acrescentado 100 µL de Miglyol. Para o preparo das NC contendo IR780 encapsulado (NC IR780), foi acrescentado 108 µL da solução estoque de IR780 em etanol a 1mg/mL, e para NC contendo IR-PLA (NC IR-PLA) os 5 mg de polímero PLA foram substituídos por 5 mg do polímero IR-PLA para uma concentração final de 27 µg/mL de IR780. Esta solução foi vertida lentamente com auxílio de uma seringa em 16 mL de água MilliQ, que estava

mantida sob agitação magnética a 320 rpm, a 20°C por 10 minutos. Em seguida, a mesma foi levada ao rotavapor (Rotavapor R3, Buchi) para evaporação total da acetona e de parte da água sob pressão reduzida a 35°C, até restar um volume final de 4 mL de formulação. Todo o preparo está representado na figura 7. Para o preparo da NC branca, todos os passos foram seguidos, exceto a adição da solução de IR 780 ou IR-PLA.

Figura 7. Esquema de preparação de nanopartículas pelo método de nanoprecipitação.



5.3 Caracterização das nanocápsulas

A análise do diâmetro hidrodinâmico (D_h) foi utilizada para determinar o tamanho das partículas, enquanto o índice de polidispersão (PdI) permite avaliar quão homogênea estava a suspensão. Estes foram determinados pelo método do espalhamento dinâmico da luz (DLS) com ângulo de detecção de retro-espalhamento em 173°. Também foi determinado o potencial zeta por meio da microeletroforese associada ao laser doppler, ambos no equipamento Zetasizer Nano ZS (Malvern Instrument, UK, figura 8). Para as análises por DLS as amostras foram diluídas em água MilliQ e para as análises de potencial zeta em solução de NaCl 1mM, nas proporções de 5:1000 (Figura 9). As análises foram realizadas à 25°C, em triplicata, em alíquotas da mesma amostra e de 3 lotes diferentes. Os resultados obtidos foram expressos como média \pm desvio padrão.

Figura 8. Equipamento Zetasizer Nano ZS (Malvern Instrument, UK).



Fonte: Select Science.

Figura 9. Metodologia usada para a caracterização das nanocápsulas.



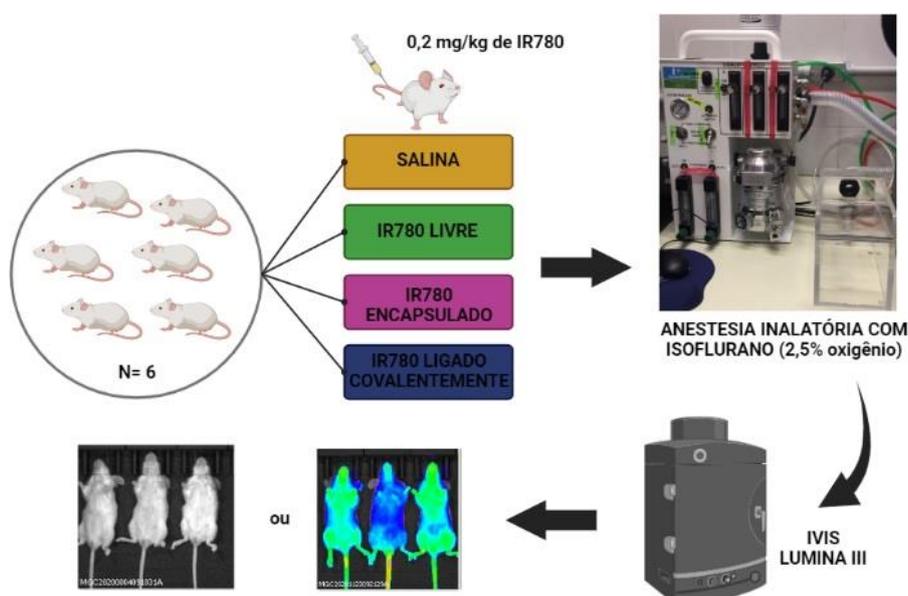
5.4 Estudo de biodistribuição *in vivo*

Esta avaliação foi realizada por meio do equipamento de imagem IVIS Lumina III (PerkinElmer®, Massachusetts, USA), (Figura 11), com filtros definidos em excitação de 740 nm e emissão de 790 nm, e sistema de anestesia de roedores RAS-4 disponível no Laboratório Multiusuário do Cipharma (Escola de Farmácia, Universidade Federal de Ouro Preto). Foram utilizados camundongos isogênicos Balb/c, fêmeas, com 5 – 6

semanas de vida, pesando entre 18 a 20g, distribuídos pelo Centro de Ciência Animal (CCA) da UFOP e mantidos em gaiolas ventiladas padrão (Alesco®), com acessos a água e alimentos *ad libitum*. As condições de luz foram mantidas no ciclo de 12 horas. Todos os testes foram realizados de acordo com protocolo aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Ouro Preto (CEUA/UFOP), sob o nº 2676151019.

Foi feito o acompanhamento da biodistribuição por 72h, através da detecção da fluorescência nos animais em intervalos de tempo pré-determinados de 20 minutos, 2, 4, 8, 12, 24, 48 e 72 horas, após a administração intravenosa por via caudal com uma única dose de suspensão de NC IR-PLA e NC IR780 (0,2 mg IR780/kg de peso corporal do animal). E os grupos controles foram: solução salina estéril e solução de IR780 livre (dissolvido em dimetilacetamida:PEG 40:60 diluída 15 vezes em solução isotônica de glicose, a partir da solução alcóolica de IR780 a 1mg/mL). Para todos os grupos o número de animais foi igual a 6. Foram utilizados sempre os mesmos animais a cada leitura. Os animais foram anestesiados com Isoflurano (2,5% em oxigênio) na câmara de anestesia e colocados em posição de decúbito ventral e dorsal sob a câmara de imagem, para a análise e obtenção das imagens. Em seguida, as imagens foram processadas utilizando o software Living Image (Perkin Elmer) e a intensidade de fluorescência de regiões de interesse (ROI) foram selecionadas, esta foi expressa como eficiência radiante média ($[\text{fótons/s/cm}^2/\text{steradian}]/[\mu\text{W/cm}^2]$). A metodologia de biodistribuição está esquematizada na Figura 10.

Figura 10. Esquema do estudo de biodistribuição *in vivo* utilizado.



Após observar as intensidades de fluorescência, foi possível determinar para quais tecidos as nanopartículas se biodistribuíram com maior facilidade e além disso comparar a biodistribuição da NC contendo o fotossensibilizador fluorescente encapsulado ou ligado ao polímero.

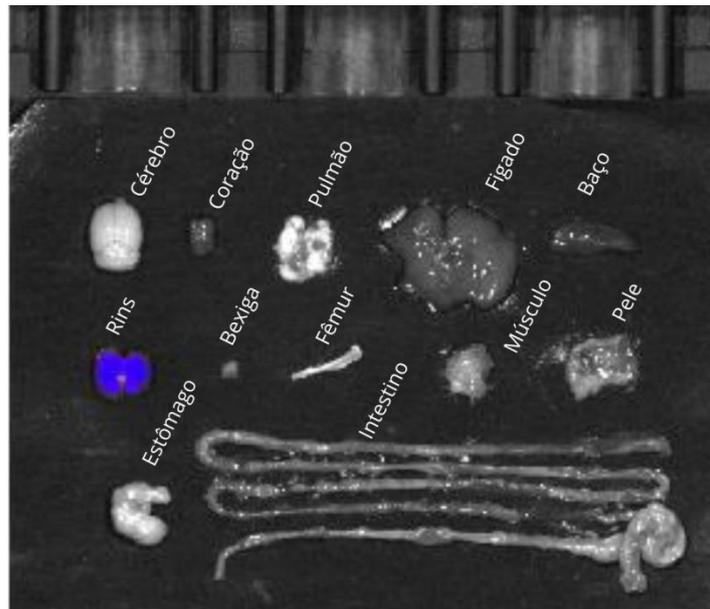
Figura 11. Equipamento IVIS Lumina III (PerkinElmer).



Fonte: Bundesministerium

Após a aquisição das imagens de corpo inteiro às 24 e 72h da administração, três animais de cada grupo foram anestesiados com sobre dose (3x) de Xilazina 2% e Ketamina 10%. Em seguida, foram retirados cérebro, coração, pulmão, fígado, baço, rins, bexiga, osso, pele, músculo, estômago e intestino, colhidos em PBS e secos em papel de filtro ao abrigo da luz. Estes foram colocados sob papel de desenho preto carvão (Artagain®) e levados para obtenção da a imagem no IVIS Lumina series III (Perkim Elmer) (figura 11), com os mesmos parâmetros descritos acima, e processadas utilizando o software Living Image (Perkin Elmer). A intensidade da fluorescência das regiões de interesse selecionadas (ROI) foi expressa como eficiência radiante média ($[\text{fótons/s/cm}^2/\text{steradian}]/[\mu\text{W/cm}^2]$). A simulação dos órgãos extraídos e prontos para a captura de imagem está representada na figura 12.

Figura 12. Órgãos selecionados, colocados sempre na mesma ordem sobre papel de desenho preto carvão (Artagain®).



5.5 Análise de dados

Os cálculos e as análises estatísticas foram realizadas com auxílio do software Living Image®, que faz a captura das imagens do IVIS Lumina, Microsoft Excel® 2010 e GraphPad Prism® 6.

6. RESULTADOS E DISCUSSÕES

6.1 Preparo e caracterização das nanocápsulas

Nanocápsulas foram preparadas, conforme Machado, 2020, e tiveram sua morfologia analisada, por meio da microscopia de força atômica (AFM). Diferentemente do método de DLS, a AFM foi realizada com amostra seca, sobre uma superfície de mica. Como resultado, obtiveram que as partículas apresentam tamanhos distribuídos homogeneamente.

Uma vez preparadas, as nanopartículas devem ser caracterizadas, para garantir a obtenção de formulações reprodutíveis e bem definidas sob o aspecto físico-químico. As preocupações quanto à segurança estão frequentemente ligadas aos aspectos: físico (tamanho da partícula, carga da superfície e forma) e químico (estabilidade do ativo associado ao nanocarreador) (Bhattacharjee *et al.*, 2010 e 2012; Favi *et al.*, 2015). Por isso a caracterização do tamanho das NP e de sua carga superficial são indispensáveis. Estes dois fatores citados acima, tamanho e potencial zeta, são os principais determinantes para efeitos biológicos das nanopartículas, incluindo absorção celular, toxicidade e dissolução (Fröhlich, 2012; Bhattacharjee *et al.*, 2013; Axson *et al.*, 2015).

Os dados obtidos sobre o tamanho médio, índice de polidispersão e potencial zeta, são apresentados na tabela 3.

Tabela 3. Tamanho médio, índice de polidispersão e potencial zeta das nanocápsulas.

	NC branca	NC IR780	NC IR-PLA
D_h (nm) \pm DP	119,0 \pm 0,2646	122,8 \pm 0,4163	117,8 \pm 0,5132
PdI	0,175	0,147	0,174
Potencial zeta (mV) \pm DP	-41,5 \pm 1,64	-42,6 \pm 1,14	-37,3 \pm 0,473

D_h : diâmetro hidrodinâmico; DP: desvio padrão (n=3); pdI: índice de polidispersão

A técnica de espalhamento dinâmico de luz, conhecida como DLS, é amplamente utilizada para fornecer a distribuição de tamanho, índice de polidispersão (PdI), de uma

amostra de nanoestruturas em meio aquoso (Bhattacharjee, 2016). O PDI é importante para determinar se o sistema está homogêneo ou não em relação ao tamanho das partículas. Sistemas monodispersos são mais adequados para a previsibilidade da cinética de liberação e biodistribuição tecidual (Bazylínska, *et al.*, 2014).

As distribuições dos tamanhos foram semelhantes entre si, já que os os valores obtidos foram: 119,0, 122,8 e 117, 8 nm para NC branca, NC IR780 e NC IR-PLA, respectivamente. As nanopartículas com tamanho médio de 200 nm conseguem permear através das fenestrações maiores dos vasos dos tumores. Ao contrário, permeiam com dificuldade nas fenestrações estreitas dos endotélios dos tecidos normais. Com isso, ocorre maior acúmulo das nanopartículas no tumor em relação aos tecidos normais, mecanismo conhecido como efeito de permeabilidade e retenção aumentada (efeito EPR) (Alves, *et al.*, 2018). Este mecanismo é favorável para ambições futuras, fazendo com que o IR 780 chegue ao seu alvo de ação principal, o tumor, e fique retido por lá, por meio das fenestrações que são capazes de reter as nanocápsulas.

O maior índice de polidispersão (PDI) foi de 0,175 (NC branca), seguido de 0,174 (NC IR-PLA) e 0,147 (NC IR780), nenhum superior a 0,3. O PDI representa a variação entre os tamanhos das nanopartículas, sendo o ideal um valor inferior a 0,3, que representa um que um sistema monodisperso foi obtido, ou seja, estas suspensões estão bem homogêneas.

O potencial zeta (ζ) está diretamente relacionado com a estabilidade coloidal da nanoformulação. Os resultados obtidos para o ζ foram de -41,5; -42,6 e -37,3 para NC branca, NC IR780 e NC IR-PLA respectivamente. Os valores negativos indicam uma dispersão eletricamente estabilizada gerando repulsão eletrostática entre as partículas conforme já demonstrado em outros estudos (Mosqueira *et al.*, 2011; Bhattacharjee, 2016). Apesar do IR780 ligado de forma covalente ao polímero (NC IR-PLA) ter um valor ligeiramente menos negativo, não houve nenhuma diferença estatística entre eles. Cada componente utilizado na formulação pode alterar o potencial zeta, de forma negativa ou positiva. Estudos realizados por Patel (2011) e Soares (2012), concluíram que potencial zeta maior que 30 mV (em módulo) confirma partículas altamente estáveis fisicamente. Fatores que podem favorecer valores negativos são: formação de ponte de hidrogênio entre os constituintes poliméricos, interação do tipo dipolo-dipolo e tensoativo utilizados (Soares *et al.*, 2012). Além disso, no preparo destas nanocápsulas, foi utilizada Lipoid®S75, lecitina composta por fosfolipídios de carga neutra e negativa. As lecitinas

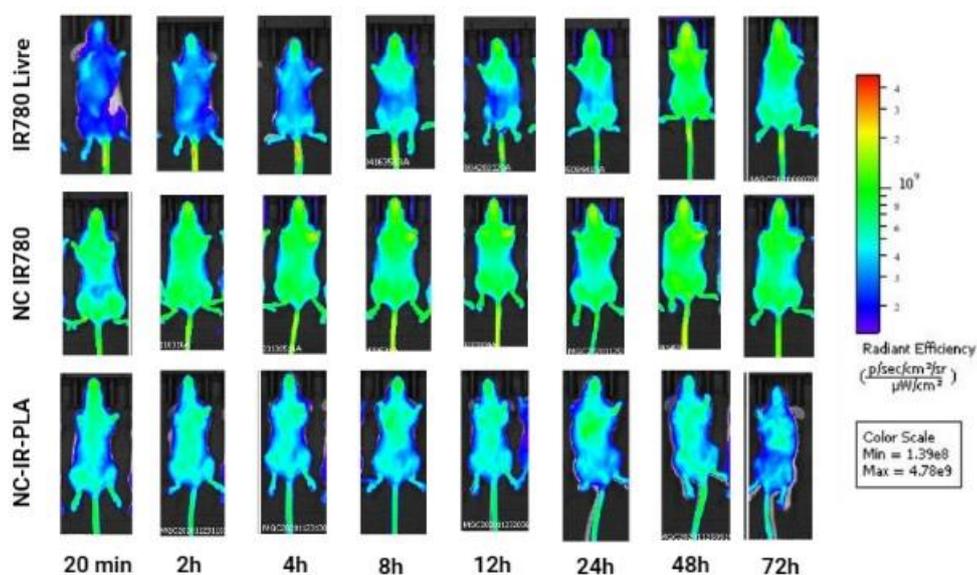
impuras são capazes de deixar o potencial zeta ainda mais negativo devido à presença de concentrações maiores de ácido fosfatídico (Mosqueira *et al.*, 2001).

6.2 Biodistribuição

O tamanho das partículas e as propriedades de superfície destes nanotransportadores são fatores determinantes no tempo de circulação sanguínea. Sabe-se que um dos maiores problemas para partículas de pequenas dimensões é a sua rápida eliminação do sangue por opsonização seguida de fagocitose pelos macrófagos do sistema fagocítico mononuclear (MPSP) (Dobrovolskaia, *et al.* 2008; Mosqueira, *et al.* 2001).

As aquisições de imagens realizadas após a administração intravenosa das nanopartículas fluorescentes revelaram primeiramente a biodistribuição no corpo inteiro do animal. Na figura 13, observamos os três diferentes tratamentos, IR780 livre, NC IR780 e NC-IR-PLA, e seus respectivos intervalos de tempo. O IR780 livre teve sua fluorescência baixa até as 4 primeiras horas, em seguida essa fluorescência aumentou muito, e sem seletividade de acumulação em relação a nenhum órgão, ou seja, se espalhou por todo o corpo do camundongo. É notório que o IR780 encapsulado já teve um início de fluorescência bem alta, desde a primeira leitura e que se manteve por prolongadas horas, também sem seletividade. Por fim, o IR780 ligado covalentemente ao polímero apresentou uma fluorescência menor em todos os tempos com acumulação forte na região de fígado e baço.

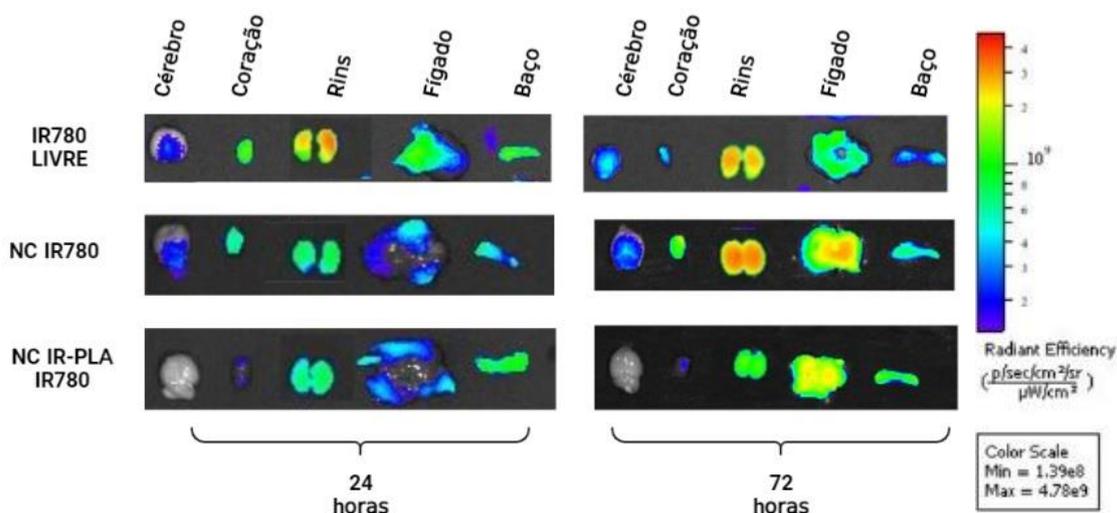
Figura 13: Imagens obtidas da biodistribuição do animal de corpo inteiro.



Para um melhor entendimento das regiões fluorescentes obtidas nas imagens de corpo interino, foi realizada a eutanásia dos animais e os órgãos foram retirados para a análise mais eficiente. Essa análise complementar *ex vivo*, confirmou o acúmulo das nanopartículas em certos órgãos.

A fluorescência abdominal chama a atenção, devido a presença dos órgãos fígado, baço e rins, que se encontram logo abaixo da região do abdome central, estes pertencem ao sistema de fagocitose mononuclear (MPS), também denominado sistema retículo endotelial (SRE), podem ser um indicativo de que as NC tenham sido retidas por eles (Fan *et al.*, 2020). Podemos ver a fluorescência deles, de forma individual, nos intervalos de 24 e 72h na figura 14.

Figura 14. Fluorescência no cérebro, coração, rins, fígado e baço, após 24 e 72h.



O fígado teve uma fluorescência mais baixa em 24h quando comparado a 72 horas. Pode ser o indicativo de que aquelas nanopartículas que passaram por ele, ficaram retidas, tendo assim maior fluorescência com o passar das horas. O mesmo, é o maior órgão do sistema fagocítico mononuclear. O metabolismo e eliminação do fígado pelo SRE são extremamente eficientes. Há a presença de células de Kupffer no córtex do seio venoso hepático. (Zang *et al.*, 2018). Essas células possuem uma capacidade fagocitária elevada, capaz de reter corpos estranhos, bactérias, corantes e outros materiais presente no sangue (Rogoff, 1981). O fígado possui células endoteliais permeáveis, chamadas de células endoteliais sinusoidais (LSECs), estas possuem uma interface entre as células sanguíneas e hepatócitos (Braet e Wisse, 2002; Hang *et al.*, 2012). Além de serem células que

possuem fenestrações, as LSECs são ausentes de diafragma e tem pouca membrana basal, se tornando a mais permeável entre os mamíferos, dentro das células endoteliais (Poisson *et al.*, 2017).

O baço manteve sua intensidade de fluorescência entre os intervalos de tempo. Nele existem células de defesa, chamadas de macrófagos. Estes revestem as trabéculas da polpa vermelha e seios venosos, podendo assim fagocitar e reter as nanopartículas (Guyton, 2017). O baço funciona como um filtro de corpos estranhos muito sensível ao tamanho desses corpos. Acredita-se que as NCs que ficam retidas no baço são as que possuem os maiores tamanhos. Existem fenestras entre as células inter-endoteliais, que tem aproximadamente 200 nm de largura, e servem para filtrar os glóbulos vermelhos envelhecidos ou danificados e outras partículas maiores do sangue (Moghimi, 2001). Além disso, em 2001, Moghimi e colaboradores realizaram novos estudos, aonde propuseram que o limite de tamanho para as NCs não estarem sujeitas às fendas inter-endoteliais, seria de 150 nm. É interessante que as NC respeitem esse limite de tamanho proposto para que elas não fiquem retidas nas fendas inter-endoteliais, a menos que o objetivo do tratamento seja especificamente contra as células do baço.

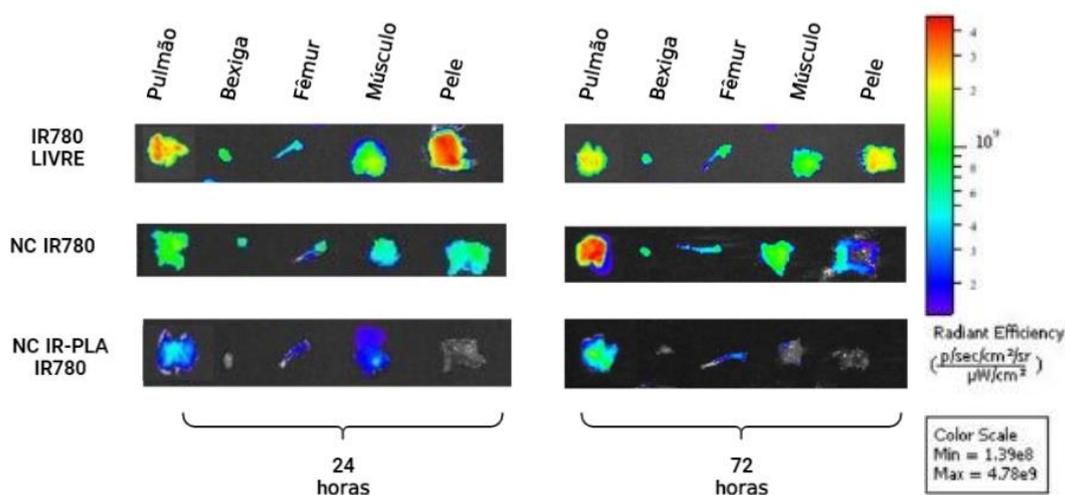
O acúmulo de nanocápsulas nos rins, é indicativo de que está ocorrendo excreção. A depuração renal pode sim eliminar as nanopartículas, mas somente aquelas com pequenos tamanhos hidrodinâmicos, com menos de aproximadamente 100 nm, sendo filtradas pela membrana capilar glomerular dos rins para os túbulos renais, sendo assim eliminadas na urina (Liu *et al.*, 2013). Como nenhuma das nossas NC tiveram um tamanho inferior a 100 nm, possivelmente elas não foram eliminadas pelos rins. O IR 780 livre e o NC IR 780 transmitiram alta fluorescência nos tecidos renais no intervalo de 72h, o que não aconteceu com o NC IR-PLA. Provavelmente a fluorescência que é vista na imagem do NC IR 780 refere-se ao fotossensibilizador que se desprende da NC, já que esta não consegue atravessar a membrana capilar glomerular. O comportamento foi semelhante ao IR 780 livre, que também teve alta fluorescência nos rins, ao contrário do NC IR-PLA, que não teve nenhuma fluorescência, mostrando que o IR 780 continua associado a nanocápsula que ficou retida na filtração renal.

Esse mecanismo também é dependente da carga da NC. Nanopartículas carregadas negativamente podem se repelir ao passar pelos poros da membrana, não sendo filtrada (Guyton, 2017; Longmire, 2008). A depuração renal de NCs poliméricas é dependente do peso molecular e a densidade do polímero utilizado (Owens, 2006).

Um ponto muito importante que pôde ser observado é que tanto para o cérebro quanto para o coração para as NC ligadas covalentemente ao polímero, não houve nenhuma fluorescência considerável. Isto é bom, caso o alvo principal não seja esses órgãos, pois eles são vitais para a sobrevivência, podendo assim prevenir uma toxicidade que pode ser ocasionada pelo IR780.

De todos os órgãos estudados, o pulmão foi o órgão que teve maior acúmulo de fluorescência (Figura 15). Han e colaboradores, 2022, realizaram estudo semelhante utilizando lipossomas co-carregados com β -elemene e IR780 (IR780-ELE-LCL), a fluorescência prevaleceu no fígado e pulmão. Entretanto, não se sabe ainda exatamente porque o IR780 tem uma afinidade tão elevada pelo pulmão.

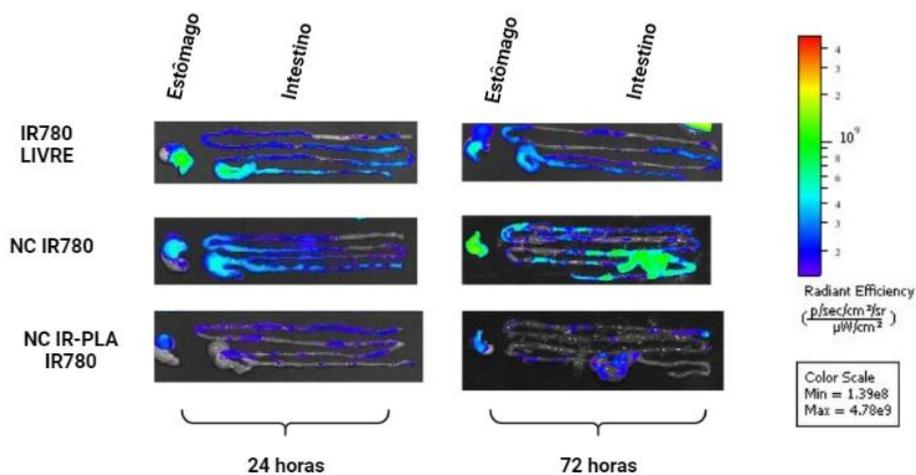
Figura 15. Fluorescência no pulmão, bexiga, fêmur, músculo e pele, após 24 e 72h.



O acúmulo no fêmur depende do tamanho da NC. No osso, encontramos a medula óssea, que também está sujeita ao efeito de EPR. Podemos observar que a pele tem um alto grau de fluorescência nas primeiras 24 horas quando o IR780 se encontra livre, isto pode ser favorável para tratamentos contra o câncer de pele, pois seu direcionamento é excelente e é excretado com o passar do tempo.

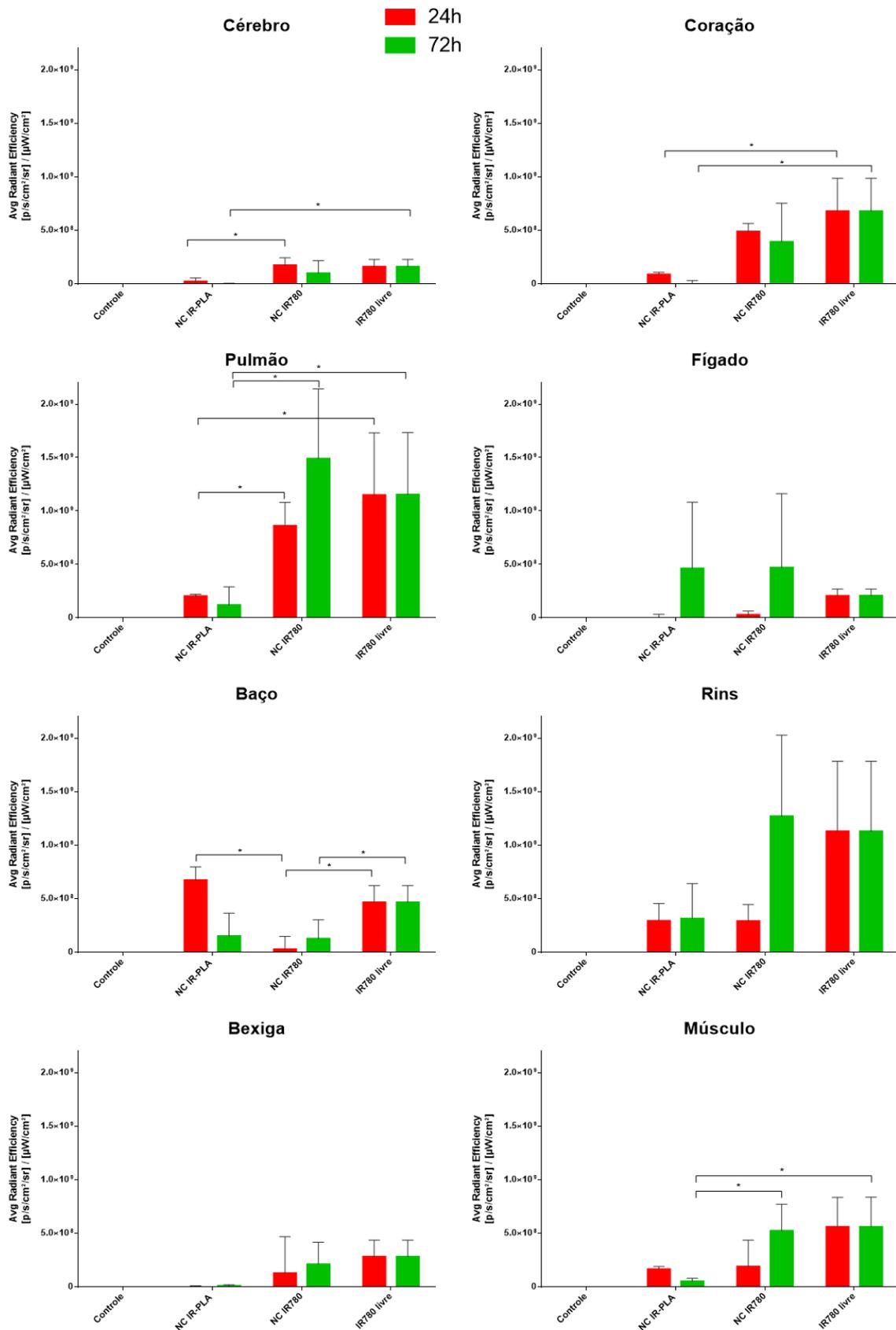
A fluorescência apresentada no intestino e no estômago (Figura 16), não tiveram relevâncias.

Figura 16. Fluorescência no estômago e intestino, após 24 e 72h.



Também foi plotado um gráfico de cada órgão (Figura 17) em que houve uma fluorescência considerada, fazendo a comparação entre as formulações e os intervalos de tempos de 24h e 72h.

Figura 17. Gráfico representativo da a biodistribuição das diferentes nanocápsulas e IR780 livre nos órgãos excisados em 24 e 72h.



Pelos gráficos podemos ver que os níveis de distribuição em ordem decrescente para o IR 780 livre foi: pulmão, rins, coração, músculo, baço, fígado, bexiga e cérebro. Já para NC IR 780 tivemos uma distribuição semelhante ao IR 780 livre, apresentando a seguinte ordem: pulmão, rins, coração, músculo, fígado, bexiga, coração e baço. E por fim, de maneira bastante diferente, a biodistribuição da NC IR-PLA: baço, rins, fígado, pulmão, músculo, coração, cérebro e bexiga.

Na maioria dos órgãos não houve uma diferença estatisticamente significativa entre o NC IR780 e IR780 livre, considerando assim que possuem um comportamento muito semelhante. Isso pode ser explicado por estudo já realizado por Machado e colaboradores (2020), confirmando que o IR780 encapsulado pode se desprender das nanocápsulas e circular livre pelo organismo, com isso, aquela fluorescência que vemos na imagem, pode não ser referente às NC em si e sim, somente ao IR780 que foi liberado das NC e circula livre pelo organismo. Sendo assim, ele ligado covalentemente ao polímero representa maior confiança para realizar o monitoramento da biodistribuição de nanopartículas.

No intervalo de tempo analisado, o IR780 livre manteve praticamente o mesmo nível entre 24 e 72h. A informação é bastante curiosa, visto que, seu log P é alto e a sua meia vida curta. Não se sabe o porquê o IR780 livre foi o único grupo em que as concentrações se mantiveram constantes em praticamente todos os órgãos. Entretanto, é possível considerar que a sua via de excreção ocorre de uma forma diferente do que as NCs, já que estas não tiveram uma concentração constante em nenhuma dos órgãos.

O IR780 encapsulado, tem um início de biodistribuição mais lenta e quando atinge 72 horas, sua fluorescência está aumentada. Um possível motivo é a liberação prolongada das drogas pelos nanocarreadores, podendo ser uma vantagem por minimizar a quantidade de doses. As NC contendo o IR780 ligado covalentemente ao polímero expressa um perfil contrário ao encapsulado, talvez ele seja degradado dentro do organismo com uma maior facilidade.

7. CONCLUSÃO

Nanocápsulas de PLA-PEG foram produzidas contendo IR780 encapsulado fisicamente ou ligado covalentemente ao polímero PLA e caracterizadas, quanto ao potencial zeta, índice de polidispersão (PDI) e tamanho hidrodinâmico (D_h). O tamanho das NC ficou entre 117,7 e 122,8 nm, os índices de polidispersão tiveram valores menores que 0,3, caracterizando um sistema monodisperso, e por fim, o potencial zeta variou entre -37,3 e -41,5 mV, indicando uma boa estabilidade coloidal.

Após o estudo da biodistribuição por meio de imagens *in vivo* destas NCs e do IR780 livre, foi possível concluir que a ligação covalente do IR780 ao polímero sugere ser mais confiável para realizar o rastreamento de nanopartículas, pois durante o percurso fisiológico o IR780 pode ser liberado do nanocarreador que estava encapsulado, e sugerir uma biodistribuição não fidedigna por meio do acompanhamento da fluorescência do IR780 desprendido.

Além disso o IR780 livre apresentou um perfil muito semelhante ao NC IR 780. Já o NC IR-PLA se mostrou mais vantajosa por não se acumular em órgãos vitais, como o coração e cérebro, podendo prevenir toxicidade nesses órgãos. Enquanto IR 780 livre teve a concentração constante com o passar das horas em quase todos os órgãos, podendo induzir toxicidade caso esse perfil se mantenha.

Com isso, o IR-PLA carreado por nanopartículas poliméricas demonstra ser mais confiável para o monitoramento de imagem gerada pela biodistribuição de NCs no organismo de camundongos. Estudos posteriores podem direcionar as NC contendo o fotossensibilizador fluorescente ligado covalentemente para órgãos/tecidos alvos por meio de ligantes, principalmente para células tumorais.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aggarwal, P. et al. Nanoparticle interaction with plasma proteins as it relates to particle biodistribution, biocompatibility and therapeutic efficacy. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 61, p. 428-437, 2009.

Alves, C. G. et al. IR780 based nanomaterials for cancer imaging and photothermal, photodynamic and combinatorial therapies. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 542, n. 1–2, p. 164–175, 2018.

Alves, C. G. et al. IR780 loaded sulfobetaine methacrylate-functionalized albumin nanoparticles aimed for enhanced breast cancer phototherapy. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 582, p. 119346, 2020.

Axson, J.L. et al. Rapid kinetics of size and pH-dependent dissolution and aggregation of silver nanoparticles in simulated gastric fluid. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 119, n. 35, p. 20632-20641, 2015.

A.Y. Rwei. et al. Photoresponsive nanoparticles for drug delivery. **Nano today**, v. 10, n. 4, p. 451-467, 2015.

Bastiat, Guillaume et al. A new tool to ensure the fluorescent dye labeling stability of nanocarriers: a real challenge for fluorescence imaging. **Journal of Controlled Release**, v. 170, n. 3, p. 334-342, 2013.

Bazylińska, U. et al. Polymeric nanocapsules and nanospheres for encapsulation and long sustained release of hydrophobic cyanine-type photosensitizer. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 442, p. 42–49, 2014.

Bhattacharjee S. DLS and zeta potential – What they are and what they are not? **Journal of Controlled Release**, v. 235, p. 337-351, 2016.

Bhattacharjee, S. et al. Cytotoxicity and cellular uptake of tri-block copolymer nanoparticles with different size and surface characteristics. **Particle and fibre toxicology**, v. 9, n. 1, p. 1-19, 2012.

Bhattacharjee, S. et al. Cytotoxicity of surface-functionalized silicon and germanium nanoparticles: the dominant role of surface charges. **Nanoscale**, v. 5, n. 11, p. 4870-4883, 2013.

Bhattacharjee, S. et al. Role of surface charge and oxidative stress in cytotoxicity of organic monolayer-coated silicon nanoparticles towards macrophage NR8383 cells. **Particle and fibre toxicology**, v. 7, n. 1, p. 1-12, 2010.

Blanco, E., et al. Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery. **Nature biotechnology**, v. 33, n. 9, p. 941-951, 2015

Braet F, Wisse E. Structural and functional aspects of liver sinusoidal endothelial cell fenestrae: a review. **Comparative hepatology**, v. 1, n. 1, p. 1-17, 2002.

Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer (INCA). O que é câncer?, 2020. Disponível em: < <https://www.inca.gov.br/o-que-e-cancer>>

Brittany L. Banik, Pouria Fattahi, Justin L. Brown. Polymeric nanoparticles: the future of nanomedicine. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology**, v. 8, n. 2, p. 271-299, 2016.

C. Yue. et al. IR-780 dye loaded tumor targeting theranostic nanoparticles for NIR imaging and photothermal therapy. **Biomaterials**, v. 34, n. 28, p. 6853-6861, 2013.

Choi HS, Frangioni JV. Nanoparticles for biomedical imaging: fundamentals of clinical translation. **Molecular imaging**, v. 9, n. 6, p. 7290.2010. 00031, 2010.

Chouly, C. et al. Development of superparamagnetic nanoparticles for MRI: effect of particle size, charge and surface nature on biodistribution. **Journal of microencapsulation**, v. 13, n. 3, p. 245-255, 1996.

Chrastina, A. et al. Overcoming in vivo barriers to targeted nanodelivery. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology**, v. 3, n. 4, p. 421-437, 2011.

Conceição, D. S.; Ferreira, D. P.; Viera, Luis F. Photochemistry and cytotoxicity evaluation of heptamethinecyanine near infrared (NIR) dyes. **International journal of molecular sciences**, v. 14, n. 9, p. 18557-18571, 2013.

De Oliveira, MA. et al. IR780-polymer conjugates for stable near-infrared labeling of biodegradable polyester-based nanocarriers. **European Polymer Journal**, v. 120, p. 109-255, 2019.

Dobrovolskaia Ma. et al. Preclinical studies to understand nanoparticle interaction with the immune system and its potential effects on nanoparticle biodistribution. **Molecular pharmaceutics**, v. 5, n. 4, p. 487-495, 2008.

Dormont, F.; Varna, M.; Couvreur, P. Nanoplumbers: biomaterials to fight cardiovascular diseases. **Materials Today**, v. 21, n. 2, p. 122-143, 2018.

Fröhlich, E. The role of surface charge in cellular uptake and cytotoxicity of medical nanoparticles. **International journal of nanomedicine**, v. 7, p. 5577, 2012.

Fan, Wufa et al. Effect of particle size on the pharmacokinetics and biodistribution of parenteral nanoemulsions. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 586, p. 119551, 2020.

Favi, P. M. et al. Shape and surface effects on the cytotoxicity of nanoparticles: Gold nanospheres versus gold nanostars. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 103, n. 11, p. 3449-3462, 2015.

Garbayo, E. et al. Nanomedicine and drug delivery systems in cancer and regenerative medicine. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology**, v. 12, n. 5, p. e1637, 2020.

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

Guyton, A.C. e Hall J.E. **Tratado de Fisiologia Médica**. Editora Elsevier. 13^a ed., 2017.

Han, H. et al. Biomimetic drug nanocarriers prepared by miniemulsion polymerization for near-infrared imaging and photothermal therapy. **Polymer**, v. 82, p. 255-261, 2016.

Hang, TC. et al. Lipids promote survival, proliferation, and maintenance of differentiation of rat liver sinusoidal endothelial cells in vitro. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 302, n. 3, p. G375-G388, 2012.

Henrikson, R.C.; Mazurkiewicz, J. E. **Histology**. Lippincott Williams & Wilkins, 1997.

Jiang, C. et al. Hydrophobic IR780 encapsulated in biodegradable human serum albumin nanoparticles for photothermal and photodynamic therapy. **Acta Biomaterialia**, v. 14, p. 61–69, 2015.

Karmali, PP.; Simberg, D. Interactions of nanoparticles with plasma proteins: implication on clearance and toxicity of drug delivery systems. **Expert opinion on drug delivery**, v. 8, n. 3, p. 343-357, 2011.

Kastelik-hryniewiecka, A. et al. Targeted PET/MRI Imaging Super Probes: A Critical Review of Opportunities and Challenges. **International Journal of Nanomedicine**, v. 16, p. 8465, 2021.

Kuang, Y. et al. Hydrophobic IR-780 dye encapsulated in cRGD-conjugated solid lipid nanoparticles for NIR imaging-guided photothermal therapy. **ACS applied materials & interfaces**, v. 9, n. 14, p. 12217-12226, 2017.

Kumari A., Yadav S. K., Yadav S. C. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. **Colloids and surfaces B: biointerfaces**, v. 75, n. 1, p. 1-18, 2010.

L'azou B. et al. In vitro effects of nanoparticles on renal cells. **Particle and fibre toxicology**, v. 5, n. 1, p. 1-14, 2008.

Lesniak, A. et al. Effects of the presence or absence of a protein corona on silica nanoparticle uptake and impact on cells. **ACS nano**, v. 6, n. 7, p. 5845-5857, 2012.

LI, M. et al. Physiologically based pharmacokinetic modeling of nanoparticles. **ACS nano**, v. 4, n. 11, p. 6303-6317, 2010.

Li, H. et al. Dual-function nanostructured lipid carriers to deliver IR780 for breast cancer treatment: Anti-metastatic and photothermal anti-tumor therapy. **Acta Biomaterialia**, v. 53, p. 399-413, 2017a.

Li, S. et al. Near infrared fluorescent imaging of brain tumor with IR780 dye incorporated phospholipid nanoparticles. **Journal of translational medicine**, v. 15, n. 1, p. 18, 2017b.

Liu, J. et al. Renal clearable inorganic nanoparticles: a new frontier of bionanotechnology. **Materials Today**, v. 16, n. 12, p. 477-486, 2013.

Livieratos, L. Basic principles of SPECT and PET imaging. In: **Radionuclide and Hybrid Bone Imaging**. Springer, Berlin, Heidelberg, 2012. p. 345-359.

Longmire M, Choyke PL, Kobayashi H. Clearance properties of nano-sized particles and molecules as imaging agents: considerations and caveats. 2008. **Nanomedicine**, v. 3, n. 5, p. 703-717, 2008.

Luiz, Marcela Tavares. **Desenvolvimento e caracterização de nanopartículas de PLGA funcionalizadas com folato contendo paclitaxel para a otimização da terapia do câncer de ovário**. 2018. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

Luo, S. et al. A review of NIR dyes in cancer targeting and imaging. **Biomaterials**, v. 32, n. 29, p. 7127-7138, 2011.

Ma Y. et al. Cetuximab-conjugated perfluorohexane/gold nanoparticles for low intensity focused ultrasound diagnosis ablation of thyroid cancer treatment. **Science and technology of advanced materials**, v. 21, n. 1, p. 856-866, 2020.

Machado, M. G. C. et al. Labeling PLA-PEG nanocarriers with IR780: physical entrapment versus covalent attachment to polylactide. **Drug Delivery and Translational Research**, v. 10, n. 6, p. 1626-1643, 2020.

Machado, M. G. C. et al. Photodynamic therapy with the dual-mode association of IR780 to PEG-PLA nanocapsules and the effects on human breast cancer cells. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 145, p. 112464, 2022.

Mallakpour, S.; behranvand, V. Polymeric nanoparticles: Recent development in synthesis and application. **Express Polymer Letters**, v. 10, n. 11, p. 895, 2016.

Moghimi, SM; Hunter, A. C.; Andresen, T. L. Factors controlling nanoparticle pharmacokinetics: an integrated analysis and perspective. **Annual review of pharmacology and toxicology**, v. 52, n. 1, p. 481-503, 2012.

Moghimi, SM; Hunter, A. C.; Murray, J. C. Long-circulating and target-specific nanoparticles: theory to practice. **Pharmacological reviews**, v. 53, n. 2, p. 283-318, 2001.

Mosqueira VCF. et al. Relationship between complement activation, cellular uptake and surface physicochemical aspects of novel PEG-modified nanocapsules. **Biomaterials**, v. 22, n. 22, p. 2967-2979, 2001.

Neckel, G. L.; Lemos-Senna, E. Preparação e caracterização de nanocápsulas contendo camptotecina a partir do ácido poli (D,L-lático) e de copolímeros diblocos do ácido poli (D,L-lático) e polietilenoglicol. *Acta Farmaceutica Bonaerense*, v. 24, n. 4, p. 504–511, 2005.

Owens DE, Peppas NA. Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. **International journal of pharmaceutics**, v. 307, n. 1, p. 93-102, 2006.

Pais-Silva, C.; De Melo-Diogo, D.; Correia, I. J. IR780-loaded TPGS-TOS micelles for breast cancer photodynamic therapy. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 113, p. 108–117, 2017.

Patel, VR.; Agrawal, YK. Nanosuspension: An approach to enhance solubility of drugs. **Journal of advanced pharmaceutical technology & research**, v. 2, n. 2, p. 81, 2011.

Peer, D. et al. Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. **Nano-Enabled Medical Applications**, p. 61-91, 2020.

Peng, CL et al. Multimodal image-guided photothermal therapy mediated by 188Re-labeled micelles containing a cyanine-type photosensitizer. **ACS nano**, v. 5, n. 7, p. 5594-5607, 2011.

Perrault, SD. et al. Mediating tumor targeting efficiency of nanoparticles through design. **Nano letters**, v. 9, n. 5, p. 1909-1915, 2009.

Poisson, J. et al. Liver sinusoidal endothelial cells: Physiology and role in liver diseases. **Journal of hepatology**, v. 66, n. 1, p. 212-227, 2017.

Rogoff, TM.; Lipsky, PE. Role of the Kupffer cells in local and systemic immune responses. **Gastroenterology**, v. 80, n. 4, p. 854-860, 1981.

Saha, K. et al. Regulation of macrophage recognition through the interplay of nanoparticle surface functionality and protein corona. **ACS nano**, v. 10, n. 4, p. 4421-4430, 2016.

SILVA, Vera Lúcia Domingues. **Micelas poliméricas e nanopartículas de lípidos sólidos, contendo paclitaxel, para terapêutica de cancro da mama**. 2013. Tese de Doutorado.

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

Tanaka, T. et al.. Nanotechnology for breast cancer therapy. **Biomed Microdevices**, v. 11, p. 49–63, 2009.

Thakor, A. S.; Gambhir, S. S. Nanooncology: the future of cancer diagnosis and therapy. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 63, n. 6, p. 395-418, 2013.

Truong, N. P. et al. The importance of nanoparticle shape in cancer drug delivery. **Expert opinion on drug delivery**, v. 12, n. 1, p. 129-142, 2015.

Uthaman, S. et al. IR 780-loaded hyaluronic acid micelles for enhanced tumor-targeted photothermal therapy. **Carbohydrate polymers**, v. 181, p. 1-9, 2018.

Walia, S.; Acharya, A. Theragnosis: nanoparticles as a tool for simultaneous therapy and diagnosis. In: **Nanoscale materials in targeted drug delivery, theragnosis and tissue regeneration**. Springer, Singapore, 2016. p. 127-152.

Wang, K. et al. Self-assembled IR780-loaded transferrin nanoparticles as an imaging, targeting and PDT/PTT agent for cancer therapy. **Scientific reports**, v. 6, n. 1, p. 1-11, 2016.

Wang, N. et al. Nanocarriers and their loading strategies. **Advanced healthcare materials**, v. 8, n. 6, p. 1801002, 2019.

Wei, Y. et al. Factors relating to the biodistribution & clearance of nanoparticles & their effects on in vivo application. **Nanomedicine**, v. 13, n. 12, p. 1495-1512, 2018.

Yang, Z. et al. Defeating relapsed and refractory malignancies through a nano-enabled mitochondria-mediated respiratory inhibition and damage pathway. **Biomaterials**, v. 229, p. 119580, 2020.

Yang, W. et al. Functionalizable and ultra stable nanoparticles coated with zwitterionic poly (carboxybetaine) in undiluted blood serum. **Biomaterials**, v. 30, n. 29, p. 5617-5621, 2009.

Yeh, CS. et al. Tumor targeting and MR imaging with lipophilic cyanine-mediated near-infrared responsive porous Gd silicate nanoparticles. **Biomaterials**, v. 34, n. 22, p. 5677-5688, 2013.

Yi, X. et al. IR-780 dye for near-infrared fluorescence imaging in prostate cancer. **Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research**, v. 21, p. 511, 2015.

Yuan, A. et al. Application of near-infrared dyes for tumor imaging, photothermal, and photodynamic therapies. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 102, n. 1, p. 6-28, 2013.

Yuan, A. et al. Self-assembled PEG-IR-780-C13 micelle as a targeting, safe and highly-effective photothermal agent for in vivo imaging and cancer therapy. **Biomaterials**, v. 51, p. 184-193, 2015.

Yue, C. et al. IR-780 dye loaded tumor targeting theranostic nanoparticles for NIR imaging and photothermal therapy. **Biomaterials**, v. 34, n. 28, p. 6853-6861, 2013.

Zang, X. Y. et al. Proteome analysis of the liver in the Chinese fire-bellied newt *Cynops orientalis*. **Genet. Mol. Res**, v. 15, n. 3, p. 15037993, 2016.

Zhang, E. et al. Mechanistic study of IR-780 dye as a potential tumor targeting and drug delivery agent. **Biomaterials**, v. 35, n. 2, p. 771-778, 2014.